

№ Фарм-18

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 дисциплине - микробиология

основной профессиональной образовательной программы высшего образования –  
программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация,  
утвержденной 30.03.2022 г.

Составители:

Третьякова Ирина Евгеньевна,

Черткоева Майя Гивиевна

Владикавказ

## ПЕРЕЧЕНЬ МЕТОДИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ:

1. Учебно-методические пособия для студентов по специальности «Фармация» (часть 1).
4. Учебно-методические пособия для студентов по специальности «Фармация» (часть 2).
3. Учебно-методические пособия для преподавателей по специальности «Фармация» (часть 1).
4. Учебно-методические пособия для преподавателей по специальности «Фармация» (часть 2)
5. Тестовые задания для студентов фармацевтического факультета по общей микробиологии.
6. Тестовые задания для студентов фармацевтического факультета по частной микробиологии.

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

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ  
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

***ОСЕННИЙ СЕМЕСТР***

**Владикавказ**

## Лабораторная работа №1.

### Тема: Морфология прокариотов (бактерий).

#### Учебная цель:

1. Изучить морфологию отдельных представителей бактерий.
2. Освоить технику микроскопирования.
3. Освоить простой метод окраски микроорганизмов.

#### Студент должен знать:

1. Устройство и оборудование микробиологической лаборатории, режим работы и назначение.
2. Классификацию бактерий.
3. **Строение микроскопа.**
4. **Методы микроскопического исследования.**
5. Технику микроскопического исследования.

#### Студент должен уметь:

1. Приготовить мазок из чистой культуры, окрасить простым способом.
2. Микроскопировать с иммерсионной системой.

#### План занятия:

1. Знакомство с правилами работы и основами техники безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Устройство и оборудование микробиологической лаборатории, режим работы и назначение.
3. Классификация бактерий.
4. Морфология бактерий, методы изучения (световая, темнопольная, фазовоконтрастная, электронная микроскопия).
5. Этапы приготовления мазка.
6. Простой метод окраски бактерий.
7. Приготовление мазков из культуры стафилококка и кишечной палочки, окраска простым методом.
8. Демонстрация препаратов из микрококков, диплококков, тетракокков, сарцин, стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, бацилл, вибрионов.

#### Самостоятельная работа студентов

1. Приготовление мазка и окраска простым методом (под руководством преподавателя).
2. Освоение техники микроскопирования. Микроскопическое изучение морфологии бактерий:
3. Просмотр демонстрационного мазка из чистой культуры стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Окраска генциан-виолетом.
4. Просмотр демонстрационного мазка из чистой культуры кишечной палочки (*E. coli*). Окраска — водным фуксином.
5. Оформление протокола исследования.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

#### 1. Техника приготовления мазков.

Мазки готовят на обезжиренных предметных стеклах, предварительно обрисовав карандашом по стеклу место будущего мазка с противоположной стороны предметного стекла. При росте бактерий на жидкой питательной среде, материал берут стерильной бактериальной петлей, наносят на стекло и растирают над очерченной площадкой. В случае роста бактерий на плотной питательной среде, на предметное стекло предварительно наносят петлей каплю воды и материал растирают.

2. Бактериальную петлю перед использованием с оставшейся культурой стерилизуют в пламени горелки. Приготовленный мазок высушивают на воздухе или держа высоко над пламенем спиртовки.

3. После этого препарат фиксируют, для чего мазок стороной, где нет материала, троекратно проводят через середину пламени горелки. Фиксация позволяет убить микробы, прикрепить их к стеклу и, наконец, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.

#### 2. Техника простых методов окраски

Окраска бактерий преследует цель сделать их резко отличными от фона, что позволяет изучить под микроскопом их морфологию и структуру. В микробиологии используют простые и сложные методы окраски препаратов.

При ПРОСТОМ СПОСОБЕ окраски, мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным фуксином (2-3 мин.) или метиленовой синью (2-3 мин.), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

### 3. Техника микроскопирования

В связи с очень малыми размерами бактерий изучение их морфологии возможно только при большом увеличении, достигаемом при помощи иммерсионного масла, которое позволяет создать единую систему между предметным стеклом и особым, х 90- кратным (с черной полоской) объективом.

При микроскопии окрашенных объектов необходимо создать яркое освещение с помощью вогнутого зеркала, поднятого конденсора и полностью открытой диафрагмы.

Каплю иммерсионного масла наносят на область мазка на стекле, лежащем на столе. Затем стекло переносят на столик микроскопа. Иммерсионный объектив погружают в масло осторожно, под контролем глаза до явного контакта объектива с маслом. Затем объектив поднимают, не выводя из капли масла и глядя в окуляр для нахождения объекта исследования («поля зрения»). Четкое изображение препарата достигается регулировкой сначала макровинтом (для обнаружения объекта), а затем микровинтом для регулировки резкости изображения.

### Морфология основных форм бактерий

Известны четыре основные формы бактерий:

1. **Кокки**- микробы округлой формы, имеющие в диаметре 1-2ц. Они отличаются между собой по взаимному расположению отдельных клеток, которое зависит от способа их деления. Если по окончании деления кокки разъединяются на отдельные шарики, получают одиночные клетки кокков -*Micrococcus*.

2. Группа из двух кокков носит название диплококка -*Diplococcus* (менингококк, гонококк имеют сходство с бобами, и ланцетовидную форму — пневмококк).

3. Если деление кокков происходит лишь в одном направлении и образующиеся кокки не разъединяются, то получается нить из шариков в виде цепи, более или менее длинной в зависимости от числа кокков-*Streptococcus*.

4. При делении в двух взаимно перпендикулярных направлениях возникают сочетания по четыре кокка-*Tetrads*.

5. Если деление происходит в трех взаимно перпендикулярных направлениях, кокки соединяются в виде пакетов (кубиков) и получают название — *Sarcina*.

6. Делясь в различных направлениях без особой правильности, кокки образуют беспорядочные скопления клеток, напоминающие виноградные грозди, почему они и получили название *Staphylococcus*.

*Палочковидные микроорганизмы* представлены самой многочисленной и разнообразной группой бактерий. В классификации палочковидных форм принято именовать бациллами и клостридиями те палочки, которые способны образовывать споры, а палочки неспособные к спорообразованию, называются бактериями. Палочковидные формы различаются по величине, расположению — поодиночке, парами, цепочкой, беспорядочно и под углом. Очертанию концов — закругленные, обрубленные, утолщенные, заостренные.

*Извитые формы*-спираллы и спирохеты имеющие вид штопорообразно извитых клеток. К патогенным спираллам относятся возбудитель содоку (болезнь укуса крыс). К извитым также относятся кампилобактерии, имеющие изгибы как у крыла летящей чайки.

Спирохеты — тонкие, длинные, изогнутые (спиралевидной формы) бактерии, отличающиеся от спиралл подвижностью, обусловленной сгибательными изменениями клеток. Спирохеты представлены тремя родами патогенными для человека: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*.

### Методы диагностики инфекционных заболеваний

1. *Микроскопический метод* заключается в приготовлении препаратов (нативных или окрашенных простыми или сложными методами) из исследуемого материала и их микроскопии с применением различных видов микроскопической техники (световая, темнопольная, фазово-контрастная, электронная). В бактериологии микроскопический метод получил название бактериоскопический, в вирусологии — вирусоскопический.

2. *Культуральный метод* заключается в посеве исследуемого материала на искусственные питательные среды с целью выделения и идентификации чистой культуры возбудителей. В бактериологии культуральный метод получил название бактериологического, а в вирусологии — вирусологического.

3. *Биологический метод* (экспериментальный или биопроба) заключается в заражении исследуемым материалом чувствительных или других биологических объектов (куриные эмбрионы, культуры клеток). Его используют для выделения чистой культуры возбудителя, определения типа токсина, определение активности антимикробных химиотерапевтических препаратов.

4. *Серологический метод* — заключается в определении титра антител в сыворотке крови больного, реже — в обнаружении микробного антигена в исследуемом материале. С этой целью используются реакции иммунитета.

5. *Аллергический метод* заключается в выявлении инфекционной аллергии (ГЗТ) на диагностический микробный препарат — аллерген. С этой целью ставят кожные аллергические пробы с соответствующими аллергенами.

*Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий — патогенные биологические агенты — патогенные для человека микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы, простейшие). В соответствии с типами микроорганизмов выделяют: бактериологические, вирусологические, микологические, протозоологические лаборатории. Регламентация условий работы с возбудителями инфекционных заболеваний произведена в соответствии со степенью опасности микроорганизмов для человека. Выделяют четыре группы возбудителей.*

Группа 1: возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадки Ласса, Эбола.

Группа 2: возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: сибирская язва, холера, лихорадка, сыпной тиф, бешенство.

Группа 3: возбудители бактериальных, вирусных и протозойных нозологических форм (коклюш, малярия, полиомиелит, лейшманиозы).

Группа 4: возбудители бактериальных, вирусных, грибковых заболеваний (синегнойной инфекции, амёбиоза, аспергиллеза).

Микробиологические лаборатории работают с ПБА с возбудителями особо опасных инфекций (группа 1 и 2). Особый режим максимально изолированные индивидуальным и общественным риском.

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

**Укажите один правильный ответ:**

1. С именем какого ученого связано открытие сущности брожения (1857), микробной обусловленности и заразности инфекционных болезней (1881), методов изготовления вакцин и способов профилактики куриной холеры, сибирской язвы и бешенства (1882-1885)?

- а) Левенгук
- б) Мечников
- в) Кох
- г) Пастер

2. Микроб — это:

- а) доклеточное живое существо;
- б) организм определённого вида;
- в) одноклеточное существо, невидимое невооружённым глазом;
- г) инфекционная белковая частица;
- д) одноклеточный организм.

3. Бактерия — это:

- а) вирус;
- б) одноклеточное существо определённого вида, относящееся к прокариотам;
- в) одноклеточное существо определённого вида, относящееся к эукариотам;
- г) организм определённого вида;
- д) одноклеточный организм.

4. Бациллы — это:

- а) кокки, образующие споры;
- б) палочки, не образующие спор;
- в) палочки, образующие споры;
- г) извитые формы.

5. Живой может считаться система, способная к:

- а) обмену веществ с окружающей средой;
- б) сохранению своей структурной организации;
- в) умножению своих структурных компонентов;
- г) воспроизведению и реализации генетической программы;
- д) метаболизму.

## Лабораторная работа №2.

### Тема: Морфология прокариотов (бактерий).

#### Учебная цель:

1. Изучить отдельные структуры прокариотической клетки.
2. Освоить сложные методы окраски микробов.

#### Студент должен знать:

1. Особенности строения бактериальной клетки.
2. Функциональное значение различных компонентов прокариотической клетки.
3. Сложные методы окраски (Грама, Циля-Нельсена, Ожешко, Бурри -Гинса, Нейссера).

#### Студент должен уметь:

1. Приготовить мазок с чистой культуры бактерий *E. coli*, *S. aureus* и окрасить по методу Грама.
2. Микроскопировать мазок.
3. Уметь приготовить препараты «висячей» и «раздавленной» капли.

#### План занятия:

1. Строение и химический состав бактериальной клетки.
2. Особенности строения бактериальной клетки.
3. Сложные методы окраски, цели их использования (методы Грама, Циля-Нельсена, Ожешко, Гинса-Бурри, Нейссера).
4. Демонстрация окрашенных препаратов по методам Грама, Бурри-Гинса, Нейссера, Ожешко, Цилю-Нильсену.
5. Изучение подвижности бактерий, приготовление препаратов «висячая» и «раздавленная» капля.

#### Самостоятельная работа студентов

1. Приготовить смешанный мазок из чистых культур стафилококка и кишечной палочки. Окраска водным фуксином.
2. Приготовить смешанный мазок из чистой культуры стафилококка и кишечной палочки. Окраска по Граму.
3. Приготовить препараты «висячая» и «раздавленная» капля.
4. Оформление протокола исследования.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

#### Техника сложных методов окраски

*Сложные способы* окраски включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет предварительно дифференцировать микробы (*дифференциально-диагностические способы*) и выявлять определенные структуры клеток (*специальные способы*).

#### 1. Способ окраски по Граму

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком идентификации бактерий. В результате окраски по Граму все бактерии делятся на две группы; грам-положительные (синего цвета) и грам-отрицательные (красного цвета).

#### Техника окраски по методу Грама

1. Фиксированный мазок кладут на бактериологический мостик и покрывают полоской фильтровальной бумаги, пропитанной раствором генциан -виолета на бумажную полоску наносят воду. Через 2 минуты полоску удаляют.
2. Не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя на 1 минуту. Затем раствор сливают.
3. Препарат обесцвечивают спиртом 20-30 секунд (до отхождения фиолетовых струек краски).
4. Препарат промывают водой.
5. Окрашивают водным фуксином — 2 минуты.
6. Препарат промывают водой.
7. Высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

#### 2. Способ окраски по Цилю-Нельсену

Применяется для обнаружения некоторых микробов, богатых липидами (например, возбудитель туберкулеза, лепры и др.)

1. Для окрашивания используют концентрированный раствор карболового фуксина Циля. С целью улучшения проникновения красителя в клетку препарат с наложенной на него полоской фильтровальной бумаги и красителем подогревают над пламенем горелки троекратно до появления пара.
2. Затем препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислоты, предварительно удалив фильтровальную бумагу.
3. Промывают водой.
4. Докрашивают метиленовым синим в течении 3-5 минут.
5. Препарат промывают водой.
6. Высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

Обесцвечивание кислотой приводит к потере красителя кислотоподатливыми микробами, и они окрашиваются в синий цвет. Кислотоустойчивые микробы остаются красными.

### **3.Способ окраски по Бурри-Гинсу**

1. Смешивают каплю культуры капсульных бактерий с каплей туши на конце предметного стекла. Затем готовят мазок как обычно его готовят из капли крови.
2. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки.
3. Для обнаружения бактерий мазок окрашивают водным фуксином.

При этом способе окраски бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются как ободок на черно-коричневом фоне вокруг бактерий.

### **4.Способ окраски по методу Нейссера**

1. На фиксированный мазок наносят синьку Нейссера 2-3 мин.
2. Не промывая водой, наносят раствор Люголя 10-30 сек.
3. Мазок промывают водой.
4. Докрашивают раствором везувина — 1 мин.

В культуре дрожжеподобных грибов много зерен волютина. Они представляют собой соединения, имеющие, в отличие от цитоплазмы, щелочную реакцию и потому окрашиваются в темно-синий цвет. Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель везувин и окрашивается в желтый цвет.

### **5.Способ окраски по методу Ожешко**

1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор HCl и подогревают на пламени горелки в течение 2 мин. До появления паров.
2. Препарат промывают водой, высушивают и фиксируют.
3. Докрашивают по методу Циля-Нельсена.

Споры бактерий после данной окраски приобретают красный цвет, а тело бактерий-синий.

## **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ**

1. Если условно выбирать три главных функционально-структурных компонента бактерий, то это будут:

- а) ядро, цитоплазма, оболочка;
- б) ДНК, цитоплазматическая мембрана, включения;
- в) клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, ядро;
- г) оболочка, цитоплазма, ДНК;
- д) рибосомы, цитоплазма, ядро.

2. В отличие от эукариотических клеток бактерии имеют:

- а) гаплоидный набор хромосом;
- б) диплоидный набор хромосом;
- в) клеточный центр;
- г) гистоновые белки.

3. Структурно цитоплазматическая мембрана бактерий отличается от мембран других живых существ тем, что:

- а) является трёхслойной;
- б) в её состав входит холестерин;
- в) способна формировать эндоплазматическую сеть;
- г) способна формировать мезосому;
- д) способна формировать веретено деления.

4. Жёсткость структуры бактериальной клетки обеспечивается:

- а) капсулой;
- б) клеточной стенкой;
- в) цитоплазматической мембраной;
- г) жгутиками;
- д) пилями.

5. Форма бактерий определяется строением её:

- а) пилей;
- б) цитоплазматической мембраной;
- в) клеточной стенкой;
- г) всех трёх компонентов;
- д) неизвестно науке

### **Лабораторная работа №3.**

#### **Тема: Морфология эукариотов (грибов, простейших).**

**Учебная цель:** Изучить морфологию и строение грибов и простейших.

#### **Студент должен знать:**

1. Отличительные признаки прокариотических и эукариотических микроорганизмов.
2. Морфологию ультраструктуру и методы обнаружения грибов.
3. Морфологию ультраструктуру и методы обнаружения простейших.

#### **Студент должен уметь:**

1. Приготовить мазки из дрожжевых грибов, окрасить их простым методом (метиленовой синью) и микроскопировать.
2. Приготовить нативные препараты из культур плесневых грибов («раздавленная капля») и микроскопировать.

#### **План занятия:**

1. Морфология и ультраструктура патогенных простейших.
2. Классификация, морфология, ультраструктура и способы размножения грибов.
3. Приготовление нативных препаратов из культур плесневых грибов. Окраска дрожжевых грибов метиленовой синью.
4. Демонстрация морфологических и культуральных свойств плесневых и дрожжевых грибов.

#### **Самостоятельная работа студентов:**

1. Приготовление мазков из дрожжевых грибов, окрасить их простым методом (метиленовой синью) и микроскопировать.
2. Приготовление и микроскопирование нативных препаратов из культур плесневых грибов.
3. Просмотр и зарисовка демонстрационных препаратов:
  - а) актиномицетов, окрашенных по Граму;
  - б) нативных препаратов из культур плесневых грибов (мукор, аспергилл, пеницилл);
  - в) дрожжевых грибов, окрашенных метиленовой синей;

### **ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ**

**Грибы** (Fungi, Mycetes) — разнородная группа эукариотических микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану (которая содержит фосфолипиды и стеролы) и мощную клеточную стенку, состоящую из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др. Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов — фикомицетов — не имеют перегородок. У высших грибов — эумицетов — гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный. Грибы размножаются спорами, половым и бесполом способами, а также вегетативным путем (почкование или фрагментация гиф). Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным. Несоввершенными называют грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения. Бесполое размножение осуществляется у грибов с помощью эндогенных спор, созревающих внутри круглой структуры — спорангия, и экзогенных спор — конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

Грибы можно разделить на 7 классов: хитридиомицеты, гифохитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты. Подавляющее большинство грибов, вызывающие заболевания у

человека (микозы), относятся к несовершенным грибам. Для диагностики микозов могут быть использованы микроскопические (культуральные), аллергические, серологические, биологические и гистологические методы исследования. Материалом для исследования могут быть гной, мокрота, пораженные волосы, ногти, чешуйки кожи, пунктаты костного мозга, лимфатических узлов, внутренних органов, кровь, желчь, испражнения, биоптаты тканей и т. п. Для окраски мазков чаще всего используют методы Грама, Циля-Нильсена, Романовского-Гимзы.

### **Плазмодии малярии.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Haemosporina.

К роду Plasmodium относятся более 100 видов простейших, паразитирующих на различных позвоночных: рептилиях, птицах и млекопитающих. Паразитами человека являются 4 вида малярийных плазмодиев. Plasmodium vivax-возбудитель трехдневной малярии, Plasmodium malariae - возбудитель четырехдневной малярии, Plasmodium falciparum – возбудитель тропической малярии и Plasmodium ovale – возбудитель – возбудитель малярии-овале.

Малярийные плазмодии – паразиты со сложным гетероксическим развитием, включающим фазу полового размножения, в течение которого они облигатно связаны с двумя хозяевами (окончательным и промежуточным). Человек является промежуточным хозяином малярийных плазмодиев, так как в его организме происходит бесполовая фаза жизненного цикла паразитов. Окончательный хозяин малярийных паразитов – кровососущий комар рода Anopheles, в организме которого проходит половая фаза их жизненного цикла, которая завершается образованием в теле комара большого количества длинных тонких одноядерных клеток – спорозоитов. Они концентрируются в огромных количествах в слюнных железах комара. При укусе комара спорозоиты из слюнных желез попадают в кровь позвоночного хозяина.

Лабораторная диагностика проводится путем микроскопического исследования мазков крови больного, окрашенных красной Романовского – Гимзе. При этом дифференциация видов плазмодиев основана на морфологических особенностях паразитов, а также пораженных эритроцитов. В ряде случаев используется серодиагностика (реакция иммунофлюоресценции, пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ).

### **Токсоплазма.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Eimeriina, семейства Eimeriidae.

Возбудитель токсоплазмоза представлен единственным видом Toxoplasma gondii.

Возбудитель токсоплазмоза -Toxoplasma gondii-внутриклеточный паразит, поражающий практически все органы и ткани теплокровных животных, птиц и человека. В соответствии с отечественной классификацией его относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности (условно-патогенные микроорганизмы).

Паразиты обладают гетероксическим развитием, включающим половое и бесполое размножение со сменой хозяев. Основным хозяином токсоплазмы является кошка, в эпителиальных клетках кишечника которой образуются ооцисты. Промежуточные хозяева паразита – многочисленные виды птиц и млекопитающих, в том числе и человек. Жизненный цикл токсоплазм включает несколько морфологических стадий: 1) эндозоиты (трофозоиты) и цистозоиты – вне и внутриклеточные стадии, во время которых паразит находится в разных органах и тканях промежуточных хозяев (включая человека) и размножается бесполом путем (эндодигонии и эндополигонии), 2) мерозоиты – внутри- и внеклеточные формы, паразитирующие в эпителиальных клетках кишечника основного хозяина – кошки. Размножаются посредством шизогонии; 3) микро- и макрогаметы-половые стадии развития, образующиеся в основном хозяине – кошке. При слиянии мужских и женских клеток (соответственно, микрогамет и макрогамет) возникает зигота, которая затем превращается в покоящуюся стадию –ооцисту. Ооцисты выводятся во внешнюю среду вместе с фекалиями кошки; 4) спорозоиты – инвазионная стадия, образующаяся в результате спорогонии внутри ооцисты вне организма основного хозяина.

В качестве материала для исследования используют пунктат лимфатических узлов, спинномозговую жидкость, кровь, гистологические срезы, лимфатических узлов, миндалин, кусочки органов трупа, головной мозг, печень, селезенку, легкие, а в случае патологической беременности – плаценту и околоплодную жидкость.

Микроскопия. Исследование мазков и гистологических препаратов требует внимания и опыта, так как количество токсоплазм в материале невелико и их можно спутать с другими образованиями. Токсоплазмы имеют полулунную или аркообразную форму длиной 4-7 мкм, шириной 2-4 мкм. Один конец возбудителя заострен, а другой – несколько закруглен. При окраске по Романовскому-Гимзе цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около 1/3-1/4 его тела, - рубинного красного.

### **Амебиаз.**

Тип Sarcomastigophora, подтип Sarcodina, класс Lobosea, отряд Amoebida.

Дизентерийная амеба Entamoeba histolytica (микроорганизмы 4 группы патогенности) открыта Ф.А. Лешем в 1875 г. Она является обитателем толстой кишки человека и в своем развитии (жизненный цикл) проходит 2 стадии – вегетативную и стадию покоя. На вегетативной стадии развития амеба существует в четырех формах: 1) тканевой; 2) большой вегетативной (форма magna), просветной-мелкой вегетативной (форма minuta) и 4)предцистной.

При остром амебиазе обнаруживают тканевую и большую вегетативную, а у реконвалесцентов и цистовыделителей – просветную и предцистную форму.

Материалом для исследования служат испражнения, гной из пораженных органов, мокрота и др.

*Микроскопия.* Исследуют нативные препараты и мазки, окрашенные раствором Люголя, смесью Сафарлиева, а также препараты, обработанные железным гематоксилином по Гейдегайну или другими красителями.

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какие микроорганизмы относят к эукариотам?  
а) бактерии;  
б) грибы;  
в) спирохеты;  
г) микоплазмы;  
д) простейшие.
2. Какие микроорганизмы относят к прокариотам?  
а) актиномицеты;  
б) грибы;  
в) спирохеты;  
д) микоплазмы.
3. Грибы размножаются:  
а) почкованием;  
б) спорами;  
в) фрагментацией мицелия;  
г) половым способом.
4. К методам обнаружения грибов относят:  
а) окраска метиленовой синью;  
б) исследование нативных препаратов («раздавленная капля»);  
в) электронная микроскопия;  
г) окраска по методу Гинса-Бурри.
5. Грибы из рода *Candida* относят:  
а) к плесневым грибам;  
б) к лучистым грибам;  
в) к дрожжеподобным грибам;  
г) к дрожжевым грибам.

### Лабораторная работа №4.

**Тема: Морфология неклеточных форм микробов.**

**Сдача модуля по теме: «Морфология прокариотов, эукариотов, неклеточных форм микробов».**

#### **Учебная цель:**

1. Изучить морфологию и ультраструктуру вирусов.
2. Изучить строение и морфологию бактериофагов.

#### **Студент должен знать:**

1. Морфологию, ультраструктуру, классификацию вирусов.
2. Морфологию, ультраструктуру, классификацию бактериофагов.

#### **Студент должен уметь:**

1. Обнаруживать вирусные включения методом световой микроскопии.
2. Обнаруживать вирусные включения методом люминисцентной микроскопии.

#### **План занятия:**

1. Особенности биологии вирусов.
2. Принципы классификации вирусов.
3. Типы взаимодействия вирусов с клеткой.
4. Морфология и строение бактериофагов, их практическое применение в медицине.
5. Сдача модуля.

### Самостоятельная работа студентов:

- Изучение демонстрации феномена бактериофагии на плотных и жидких питательных средах.
- Изучение демонстрации внутриклеточных включений (тельца Бабеша-Негри).

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

### ВИРУСЫ

Вирусы обладают свойствами, не позволяющими применить для их изучения обычные методы микробиологического исследования.

#### Отличительные свойства вирусов:

1. Мельчайшие размеры, измеряемые тысячными долями микрона - миллимикронами - от 8-10 нм до 300-400 нм.
2. Фильтруемость через специальные мелкопористые фильтры, не пропускающие другие микроорганизмы.
3. Неклеточная структура.
4. Абсолютный паразитизм, т.е. способность жить и размножаться только в живых клетках.

#### Форма вирусных частиц имеет несколько типов:

1. Палочковидная
2. Сферическая (шаровидная)
3. Кубоидальная
4. Головчатая (сперматоидообразная)
5. Нитевидная

Зрелые вирусные частицы, называемые *вирионами*, имеют следующую схему строения: в центральной части находится молекула ДНК или РНК, которая образует *нуклеоид*. Вокруг располагается защитная белковая оболочка, называемая *капсидом*, построенная из морфологических единиц, называемых *капсомерами*. Некоторые сложноустроенные вирионы имеют внешнюю оболочку, называемую *суперкапсидом*.

Для микробиологической диагностики вирусных инфекций в настоящее время применяют три основных методических подхода:

**1. Вирусологическая диагностика** - основана на выделении из исследуемого материала вируса и его последующей идентификации.

**2. Серологическая диагностика** - определение специфических иммунологических изменений в организме под действием вирусов (чаще всего с помощью диагностикумов выявляют в сыворотке крови противовирусные антитела).

**3. Молекулярно-биологическая диагностика** - обнаружение в клиническом материале фрагментов нуклеиновых кислот вирусов-возбудителей с помощью зондов (гибридизация НК) или ПЦР.

Отдельные вирусы, размером более 200 нм, могут быть окрашены по Романовскому - Гимзе; вирусы меньших размеров (вирусы оспы) удается обнаружить только при помощи особых способов обработки.

Бактериофаги различаются по химической структуре, типу нуклеиновой кислоты, морфологии и характеру взаимодействия с бактериями. По размеру бактериальные вирусы в сотни и тысячи раз меньше микробных клеток.

Типичная фаговая частица (вирион) состоит из головки и хвоста. Длина хвоста обычно в 2 — 4 раза больше диаметра головки. В головке содержится генетический материал — одноцепочечная или двуцепочечная РНК или ДНК с ферментом транскриптазой в неактивном состоянии, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой — капсидом, сохраняющим геном вне клетки.

Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют нуклеокапсид. Бактериофаги могут иметь икосаэдральный капсид, собранный из множества копий одного или двух специфичных белков. Обычно углы состоят из пентамеров белка, а опора каждой стороны из гексамеров того же или сходного белка. Более того, фаги по форме могут быть сферические, лимбовидные или плеоморфные. Хвост представляет собой белковую трубку — продолжение белковой оболочки головки, в основании хвоста имеется АТФаза, которая регенерирует энергию для инъекции генетического материала. Существуют также бактериофаги с коротким отростком, не имеющие отростка и нитевидные.

Фаги, как и все вирусы, являются абсолютными внутриклеточными паразитами. Хотя они переносят всю информацию для запуска собственной репродукции в соответствующем хозяине, у них отсутствуют механизмы для выработки энергии и рибосомы для синтеза белка. У некоторых фагов в геноме содержится несколько тысяч оснований, тогда как фаг G, самый крупный из секвенированных фагов, содержит 480 000 пар оснований — вдвое больше среднего значения для бактерий, хотя всё же недостаточного количества генов для важнейшего бактериального органоида как рибосомы.

Большое количество выделенных и изученных бактериофагов определяет необходимость их систематизации. Классификация вирусов бактерий претерпевала изменения: основывалась на характеристике хозяина вируса, учитывались серологические, морфологические свойства, а затем строение и физико-химический состав вириона.

В настоящее время согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов бактериофаги, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты разделяют на ДНК- и РНК- содержащие.

По морфологическим характеристикам ДНК-содержащие фаги выделены в следующие семейства: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Lipothrixviridae, Plasmaviridae, Corticoviridae, Fuselloviridae, Tectiviridae, Microviridae, Inoviridae Plectovirus и Inoviridae Inovirus.

РНК-содержащие: Cystoviridae, Leviviridae

По характеру взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги могут только увеличиваться в количестве посредством литического цикла. Процесс взаимодействия вирулентного бактериофага с клеткой складывается из нескольких стадий: адсорбции бактериофага на клетке, проникновения в клетку, биосинтеза компонентов фага и их сборки, выхода бактериофагов из клетки.

Первоначально бактериофаги прикрепляются к фagosпeцифическим рецепторам на поверхности бактериальной клетки. Хвост фага с помощью ферментов, находящихся на его конце (в основном лизоцима), локально растворяет оболочку клетки, сокращается и содержащаяся в головке ДНК инъецируется в клетку, при этом белковая оболочка бактериофага остается снаружи. Инъецированная ДНК вызывает полную перестройку метаболизма клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, РНК и белков. ДНК бактериофага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, который после попадания в бактериальную клетку активируется. Синтезируются сначала ранние, а затем поздние иРНК, которые поступают на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются ранние (ДНК-полимеразы, нуклеазы) и поздние (белки капсида и хвостового отростка, ферменты лизоцим, АТФаза и транскриптаза) белки бактериофага. Репликация ДНК бактериофага происходит по полуконсервативному механизму и осуществляется с участием собственных ДНК-полимераз. После синтеза поздних белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс — созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц.

Продолжительность этого процесса может составлять от нескольких минут до нескольких часов. Затем происходит лизис клетки, и освобождаются новые зрелые бактериофаги. Иногда фаг инициирует лизирующий цикл, что приводит к лизису клетки и освобождению новых фагов. В качестве альтернативы фаг может инициировать лизогенный цикл, при котором он вместо репликации обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в виде плазмиды. Таким образом, вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК хозяина и делением клетки, а подобное состояние фага называется профагом. Бактерия, содержащая профаг, становится лизогенной до тех пор, пока при определенных условиях или спонтанно профаг не будет стимулирован на осуществление лизирующего цикла репликации. Переход от лизогении к лизису называется лизогенной индукцией или индукцией профага. На индукцию фага оказывает сильное воздействие состояние клетки хозяина предшествующее индукции, также как наличие питательных веществ и другие условия, имеющие место в момент индукции. Скудные условия для роста способствуют лизогенному пути, тогда как хорошие условия способствуют лизирующей реакции.

Очень важным свойством бактериофагов является их специфичность: бактериофаги лизируют культуры определенного вида, более того, существуют так называемые типовые бактериофаги, лизирующие варианты внутри вида, хотя встречаются поливалентные бактериофаги, которые паразитируют в бактериях разных видов.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

1. Что такое бактериофаги?

- а) бактерии;
- б) вирусы;
- в) клетки фагоциты;
- г) грибы.

2. Какие микробы не имеют клеточного строения?

- а) вирусы;
- б) микоплазмы;
- в) хламидии;
- г) грибы.

3. Что содержит сложно организованный вирус?

- а) два типа нуклеиновой кислоты;
- б) один тип нуклеиновой кислоты (либо ДНК, либо РНК);
- в) суперкапсид;
- г) капсид

4. Вирусы открыл:

- а) Л. Пастер;
- б) Р. Кох;
- в) И. Ивановский;
- г) И. Мечников.

5. Внеклеточная форма существования вирусов

- а) вирион;
- б) капсид;
- в) капсомер;
- г) суперкапсид;
- д) элементарные тельца.

### **Лабораторная работа №5.**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

#### **Учебная цель:**

1. Освоить бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
2. Изучить типы питания бактерий, принципы культивирования микроорганизмов, классификацию питательных сред.
3. Изучить методику получения чистых культур бактерий из исследуемого материала.

#### **Студент должен знать:**

1. Принципы культивирования микроорганизмов.
2. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
3. Питательные среды, требования, предъявляемые к питательным средам
4. Классификация питательных сред, состав и приготовление.

#### **Студент должен уметь:**

1. Выполнить первый этап выделения чистой культуры аэробных бактерий.

#### **План занятия:**

1. Питание бактерий: типы, механизмы поступления питательных веществ в микробную клетку.
2. Принципы культивирования микроорганизмов.
3. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
4. Питательные среды: требования, предъявляемые к питательным средам; классификация, состав, приготовление.
5. Демонстрация питательных сред.
6. Посев исследуемого материала (взвеси микроорганизмов) на МПА методом Дригальского (1 этап).

#### **Самостоятельная работа студентов:**

1. Посев исследуемого материала по методу Дригальского.
2. Ознакомление с приготовлением питательных сред.

#### **ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ**

**Микробиологическое исследование** проводится с целью выделения чистых культур микроорганизмов, культивирование и изучения их свойств. Оно необходимо при диагностике инфекционных болезней, для определения видовой принадлежности микробов, в исследовательской работе, для получения продуктов жизнедеятельности микробов (токсинов, антибиотиков, вакцин и т. п.). Для выращивания микроорганизмов в искусственных условиях необходимы особые субстраты — питательные среды. Они являются основой микробиологической работы и определяют результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные условия для жизнедеятельности микробов.

#### **ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К СРЕДАМ:**

1. Должны быть питательными, т. е. содержать в легкоусвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей микроорганизмов.
2. Иметь оптимальную концентрацию водородных ионов.
3. Быть изотоничными для микробной клетки.
4. Быть стерильными.
5. Быть влажными.
6. Обладать определённым окислительно-восстановительным потенциалом.

7. Быть по возможности унифицированными.

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

| Группа классификации    | Класс                                                                                                                                                                        | Примеры                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>По составу</b>       | <b>Простые</b>                                                                                                                                                               | <i>Жидкие — МПБ, пептон-ная вода Плотные — МПА</i>                                                                                                                                                 |
|                         | <b>Сложные</b>                                                                                                                                                               | <i>Жидкие — сахарный бульон Плотные — сахарный агар, кровяной агар</i>                                                                                                                             |
| <b>По происхождению</b> | <b>Естественные</b>                                                                                                                                                          | <i>Молоко, свёрнутая сыворотка, срез сырого картофеля</i>                                                                                                                                          |
|                         | <b>Искусственные</b>                                                                                                                                                         | <i>Молочно-солевой агар Сывороточный агар Асцит-агар Кровяной агар</i>                                                                                                                             |
|                         | <b>Синтетические</b>                                                                                                                                                         | <i>Среда Игла, среда 199</i>                                                                                                                                                                       |
| <b>По назначению</b>    | <b>Селективные (элективные)</b><br>-для стафилококка:<br>-для грам(-) кокков и дифтероидов:<br>-для энтеробактерий:<br>-для холерного вибриона:<br>-для лактобацилл и грибов | <i>Молочно-солевой агар, жел-точно-солевой агар Сывороточные среды Среды с солями теллура Среды с солями желчных кислот Пептонный бульон и щелочной агар Томат-агар, рисовый агар, агар Сабуро</i> |
|                         | <b>Дифференциально-диагностические</b><br><b>Универсальные</b><br><b>Среды обогащения</b><br><b>Консервирующие</b>                                                           | <i>Эндо, Плоскирева, Левина, Ресселя, Гисса МПБ, МПА, кровяной агар Среда Мюллера Среды с глицерином</i>                                                                                           |
| <b>По консистенции</b>  | <b>Жидкие</b><br><b>Полужидкие</b><br><b>Плотные</b>                                                                                                                         | <i>МПБ, пептонная вода, сахарный МПБ МПЖеле, желатиновая МПА, кровяной агар</i>                                                                                                                    |

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

**Укажите правильные ответы:**

1. Какие питательные среды являются простыми?

- а) среда Эндо;
- б) МПА;
- в) кровяной агар;
- г) МПБ;
- д) пептонная вода.

2. Плотность питательных сред зависит от содержания в них:

- а) хлорида натрия;
- б) пептона;
- в) агар-агара;
- г) сахарозы;
- д) сыворотки крови.

3. На 1 этапе бактериологического метода исследования решаются следующие задачи:

- а) идентификация чистой культуры микробов;
- б) определение чувствительности к антибиотикам;
- в) получение изолированных колоний;
- г) определение вида микроба;
- д) получение чистой культуры.

4. Преимущественный рост одних видов микробов при одновременном подавлении других можно получить на следующих видах питательных сред:

- а) селективных (элективных);
- б) простых;
- в) сложных;
- г) консервирующих;
- д) дифференциально-диагностических;
- е) универсальных.

5. В понятие «культуральные свойства» микроба входит:

- а) характер роста на питательных средах;
- б) макроскопическая характеристика колоний;
- в) морфология микробных клеток при микроскопии;
- г) ферментация углеводов на средах Гисса;
- д) цвет пигмента колоний или культуры;
- е) отношение возбудителя к окраске по Граму.

### **Лабораторная работа №6.**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

#### **Учебная цель:**

- 1. Освоить методы выделения чистых культур аэробов.
- 2. Изучить типы дыхания бактерий, способы создания условий анаэробноз.
- 3. Освоить методы выделения чистых культур анаэробов.

#### **Студент должен знать:**

- 1. Принципы культивирования микроорганизмов.
- 2. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
- 3. Питательные среды для культивирования анаэробов

#### **Студент должен уметь:**

- 1. Выполнить второй этап выделения чистой культуры аэробных бактерий.

#### **План занятия:**

- 1. Типы дыхания бактерий.
- 2. Способы создания условий анаэробноз.
- 3. Методы выделения чистой культуры аэробов и анаэробов.
- 4. Посев почвенной болтушки на среду Китта-Тароцци.
- 5. Питательные среды для анаэробов, методы культивирования и выделение чистой культуры анаэробов.
- 6. Изучение культуральных свойств бактерий.
- 7. Изучение колоний, выросших на чашках, засеянных методом Дригальского.
- 8. Посев микроорганизмов из изученной колонии на скошенный агар для получения чистой культуры (2 этап).
- 9. Демонстрация пигментообразования бактерий.
- 10. Демонстрация характера роста бактерий на плотных и жидких питательных средах.

#### **Самостоятельная работа студентов**

1. Завершение 1-го этапа бактериологического метода. Изучение культуральных свойств бактерий.
2. Из выросших колоний на МПА приготовить мазок, окрасить по Граму.
3. Посев из исследуемых изолированных колоний на скошенный агар для накопления чистой культуры.
4. Демонстрация техники анаэробного культивирования и сред для анаэробов: высокий столбик агара, среда Китта-Тароцци, тиогликолевая, Стюарта. Демонстрация микроанаэрозоата. Способы: Фортнера, Вейнберга.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

#### **Дыхание бактерий. Классификация бактерий по типу дыхания.**

Сущность дыхания у микроорганизмов — получение энергии, образующейся в процессе прямого биологического окисления веществ кислородом или путем дегидрирования субстрата. Накопление энергии происходит в специальных структурах бактерий, называемых мезосомами.

В соответствии с потребностями в кислороде бактерии подразделяют на следующие основные группы:

1. Облигатные (строгие) аэробы- микроорганизмы, которые растут и размножаются только в присутствии кислорода. Например: *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Облигатные анаэробы — микроорганизмы, которые растут и размножаются только без доступа кислорода. Например: *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*.
3. Факультативные анаэробы — микроорганизмы, которые могут расти и размножаться как в присутствии кислорода, так и в бескислородных условиях. Например: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*.
4. Микроаэрофилы бактерии — микроорганизмы, которые лучше растут и размножаются при повышенном содержании  $CO_2$  и низком содержании кислорода. Например: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*.

#### **Методы культивирования анаэробов**

##### **Способы создания анаэробных условий**

а) механический — удаление (откачивание) воздуха из анаэрозоата с помощью вакуумного отсоса. Затем анаэрозоат заполняют газовой смесью, которая состоит из 80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа;

б) химический — поглощение кислорода за счет химических веществ (щелочной раствор пирогаллола, двууглекислая сода);

в) биологический (метод Фортнера) — совместное культивирование анаэробов и аэробов. При этом на одну чашку Петри с плотной питательной средой (чаще используют среду Цейсслера) засевают культуру анаэробов, на другую — культуру аэробов, способных энергично поглощать кислород. В качестве аэробов используют культуру чудесной палочки (*Serratia marcescens*). Края чашки Петри парафинируют;

г) физико-химический — посев исследуемого материала на специальные среды для анаэробов, например, среды Китта-Тароцци и Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар). Среда перед посевом регенерируют (кипятят на водяной бане в течение 15 минут) для удаления кислорода.

Состав среды Китта-Тароцци:

- кусочки печени — для адсорбции кислорода;
- 1% глюкозы — для осуществления анаэробного гликолиза;
- полужидкий агар — не допускает кислород в толщу среды.

#### **Получение чистой культуры анаэробов**

##### **1. Метод Вейнберга (метод разведений)**

Для получения изолированных колоний анаэробов из среды Китта-Тароцци с ростом анаэробных бактерий забирают культуру пастеровской пипеткой с запаянным концом и последовательно опускают эту пипетку вначале в 3 пробирки с физиологическим раствором, а затем — 3 пробирки с растопленным полужидким сахарным МПА. После термостатирования при 37°C в последних наблюдается рост изолированных колоний анаэробов.

##### **2. Метод Перетца.**

Одно из последних разведений по Вейнбергу в полужидком агаре выливают в крышку чашки Петри и закрывают ее дном так, чтобы удалить воздух. Края чашки Петри парафинируют. Посев исследуемого материала на среду Цейсслера секторами с последующим культивированием в анаэрозоате.

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

#### **Укажите все правильные ответы:**

1. Для культивирования анаэробов без анаэрозоата используется среда:
  - а) кровяной агар;
  - б) желточно-солевой агар;
  - в) Эндо;
  - г) Китта-Тароцци;

д) Клауберга.

2. При анаэробном типе дыхания у бактерий отсутствует группа ферментов:

- а) дегидрогеназ;
- б) флавопротеинов;
- в) цитохромоксидаз;
- г) децитиназ;
- д) нуклеаз.

3. Конечным акцептором электронов при аэробном типе дыхания у бактерий является:

- а) молекулярный кислород;
- б) неорганические соединения;
- в) органические соединения;
- г) одновременно органические и неорганические соединения;
- д) митохондриальные белки.

4. Среда тиогликолевая служит для выделения:

- а) облигатных аэробов;
- б) облигатных анаэробов;
- в) факультативных аэробов;
- г) факультативных анаэробов;

5. Среда Китта-Тароцци служит для выделения:

- а) облигатных аэробов;
- б) облигатных анаэробов;
- в) факультативных аэробов;
- г) факультативных анаэробов;

### **Лабораторная работа №7.**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

**Учебная цель:** Освоить бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.

**Студент должен знать:**

- 1. Этапы бактериологического метода диагностики.
- 2. Идентификацию чистой культуры по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.
- 3. Питательные среды для изучения ферментативной активности.
- 4. Бактериофаги и их применение.
- 5. Классификацию ферментов.

**Студент должен уметь:**

- 1. Сделать посев исследуемого материала на среды Гисса и МПБ.
- 2. Определять антибиотикочувствительность методов стандартных дисков.
- 3. Проверить чистоту выделенной культуры.

#### **План занятия:**

- 1. Ферменты, классификация. Ферменты, расщепляющие углеводы, белки, жиры, ферменты патогенности. Питательные среды, используемые для изучения ферментативной деятельности микроорганизмов.
- 2. Проверка чистоты выделенной культуры макро- и микроскопически.
- 3. Идентификация чистой культуры бактерий по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, фаголизательным свойствам (3 этап).
- 4. Бактериофаги, их применение для идентификации бактерий.
- 5. Определения антибиотикочувствительности методом стандартных дисков.

#### **Самостоятельная работа**

- 1. Приготовление мазка, окраска по Граму.
- 2. Посев культуры на среды Гисса и МПБ.

3. Определение антибиотикочувствительности.
4. Демонстрация питательных сред для изучения ферментативной активности микроорганизмов.
5. Демонстрация феномена бактериофагии на плотных и жидких питательных средах.
6. Демонстрация выделения чистой культуры подвижных микроорганизмов по методу Шукевича.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

**III этап исследования.** Через 24 часа на скошенном МПА обнаружен однородный рост в виде сплошного налета желтоватого цвета. С целью проверки чистоты выделения культуры из пробирки приготавливают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для оценки чистоты культуры необходимо просматривать не менее 10 полей зрения. Нахождение в мазках со скошенного МПА только гроздьевидно расположенных грамположительных кокков, свидетельствует о чистоте выделенных культур.

Для определения биохимических бактерий производят посев выделенной культуры в среды цветного ряда (глюкоза, лактоза, маннит, сахароза, мальтоза и в МПБ для определения индола и сероводорода), или определяют эти свойства с помощью Системы Индикаторных Бумажных дисков (СИБ).

Посевы помещают в термостат при температуре 37°C на 24 часа.

#### ферменты бактерий

Ферменты являются высокоспецифичными биологическими катализаторами, без которых невозможны жизнь и размножение. Большое количество реакций, происходящих при жизни бактериальной клетки, указывает на существование у бактерий значительного количества ферментов. Ферменты — вещества белковой природы с большим молекулярным весом. Некоторые из них относятся к протеинам, другие являются сложными белками. Они построены из двух частей белка и небелковой части, называемой простетической группой. В состав ее могут входить витамины, нуклеотиды, атомы железа и пр. Связь между белковой частью фермента и его простетической группой может быть прочной и непрочной. При наличии непрочной связи в растворах наступает диссоциация фермента и при этом может освобождаться свободная простетическая группа.

Легко диссоциирующие простетические группы ферментов называются коферментами. Обычно ферменты подразделяются на следующие основные группы:

1. Оксидоредуктазы, все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.
2. Трансферазы, катализирующие перенос тех или иных групп (например аминогрупп, фосфатных остатков и т. д.).
3. Гидролазы, расщепляющие путем гидролиза ГТ или иные соединения; к этому классу относятся также фосфатазы и дезампназы — ферменты, отщепляющие соответственно гидролитическим путем фосфат или аммонийные группы от различных органических соединений.
4. Лиазы, ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенные группы (например, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SH<sub>2</sub> и т. д.).
5. Изомеразы, катализирующие внутримолекулярные перестройки в субстрате.
6. Лигазы (синтетазы) — класс ферментов, катализирующих присоединение друг к другу двух молекул с одновременным разрывом пиррофосфатной связи в трифосфатах (например, образующие C — O, C — N или C — S связи).

Наиболее высокой ферментативной активностью обладают сапрофиты; в меньшей степени это свойство выражено у патогенных бактерий. Изучение ферментов патогенных бактерий имеет исключительно важное значение, так как на основании определения ферментативной активности микробов можно дифференцировать различные виды и определять природу того или иного возбудителя заболеваний. Наряду с этим ферментативная активность микробов определяет патогенез и клиническую картину инфекционного заболевания.

Ферменты дифференцируют на экзо и эндоферменты. Экзоферменты выделяются клеткой во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции.

Ферменты бактерий подразделяются на конститутивные и индуцибельные. К первой группе относятся те ферменты, которые синтезируются бактериальной клеткой вне зависимости от того, на какой среде бактерия выращивается. Индуцибельные ферменты продуцируются данной бактерией лишь в ответ на действие специфического индуктора, присутствующего в среде.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

**Укажите все правильные ответы:**

1. Сахаролитические свойства микробов изучают на средах:

- а) МПЛ, МПБ;
- б) Гисса;
- в) Ресселя;
- г) кровяном агаре;
- д) в тест-системе API;
- е) в тест-системе Lachema.

2. Биохимическая активность микробов на плотных средах Гисса учитывается по:

- а) изменению цвета среды;
- б) образованию осадка;
- в) образованию газа;
- г) разрыву среды.

3. Протеолитические ферменты микробов изучаются на средах:

- а) с углеводами;
- б) МПБ;
- в) молоком;
- г) желатиной.

4. Ферменты в химическом отношении содержат:

- а) субстрат;
- б) апофермент;
- г) кофермент;
- д) метаболит

5. Основные цели применения дифференциально-диагностических сред:

- а) изучение биохимической активности микробов;
- б) изучения культуральных свойств микробов;
- в) определения чувствительности к антибиотикам;
- г) дифференциация различных видов микробов;
- д) транспортировка материала в лабораторию.

### Лабораторная работа №8

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

**Сдача модуля по теме «Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов».**

#### **Учебная цель:**

- 1. Изучить методику выделения чистых культур бактерий из исследуемого материала.
- 2. Изучить методы индикации вирусов, риккетсий и хламидий.

#### **Студент должен знать:**

- 1. Методы выделения чистых культур бактерий.
- 2. Способы заражения лабораторных животных, куриного эмбриона.

#### **Студент должен уметь:**

- 1. Сделать заключение по выделению чистой культуры микроорганизма.
- 2. Определить строение куриного эмбриона в овоскопе
- 3. Ввести исследуемый материал в аллантоисную полость куриного эмбриона под контролем овоскопа.
- 4. Обнаруживать вирусные включения методом световой микроскопии.

5. Обнаруживать вирусные включения методом люминисцентной микроскопии.

#### План занятия:

1. Выделение чистой культуры аэробных и анаэробных бактерий (заклучение).
2. Культивирование риккетсий, хламидий, вирусов.
3. Строеение куриного эмбриона.
4. Классификация клеточных культур.
5. Способы заражения лабораторных животных, куриного эмбриона.
6. Изменения, происходящие в организме зараженных животных, куриного эмбриона, тканевых культурах (цитопатическое действие).
7. Методы индикации вирусов, риккетсий, хламидий.
8. Сдача модуля.

#### Самостоятельная работа студентов:

##### IV этап исследования. Учет биохимических свойств.

| глюкоза | лактоза | маннит | сахароза | мальтоза | индол | сероводород |
|---------|---------|--------|----------|----------|-------|-------------|
| К       | К       | К      | К        | К        | +     | -           |

- к — кислота

**ВЫВОД:** из смеси бактерий выделена и идентифицирована *Staphelococcus* spp. на основании морфологических, тинкториальных (грамположительные, гроздьевидно-расположенные кокки) и культуральных (гладкие выпуклые колонии золотистого цвета) и биохимических свойств.

#### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

Риккетсии и хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами. В отличие от вирусов размножаются простым делением и содержат оба типа нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) и многие ферменты, необходимые для энергетического и пластического метаболизма. По типу дыхания риккетсии относятся к аэробам, но в отличие от последних, активно окисляют глютаминовую кислоту и индифферентны к глюкозе. Наличие у риккетсий высокопроницаемой оболочки позволяет им получать из клеток, в которых они размножаются, необходимые ферменты и метаболиты.

Хламидии являются энергетическими паразитами клетки-хозяина, так как у них отсутствуют собственные энергодающие ферментные системы. Вследствие этого искусственные питательные среды даже самого сложного состава не могут удовлетворить потребности риккетсий и хламидий. Для их размножения необходимы живые, метаболизирующие клетки.

Для выделения и культивирования риккетсий и хламидий применяются тканевые культуры, куриные эмбрионы и восприимчивые лабораторные животные.

Вирусы выделены в отдельное «царство»-Vira. Они содержат только один тип нуклеиновой кислоты, не имеют клеточной структуры, не имеют самостоятельного обмена веществ, являясь внутриклеточными паразитами, репродукция вирусов осуществляется разобленным способом.

По международной классификации все вирусы подразделяются по типу нуклеиновой кислоты на 2 подтипа - РНК- и ДНК-содержащие. Дальнейшее разделение вирусов проводится на основании размеров вирусов, типа симметрии при формировании капсидов, наличия или отсутствия внешних оболочек и количества содержащихся в них капсомеров.

**ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ** является основным и наиболее достоверным, позволяет выделить вирус из исследуемого материала с последующей его идентификацией. С целью накопления вирусосодержащего материала используются куриные эмбрионы и культуры тканей (искусственно культивируемые клетки той или иной ткани). Культуры тканей поддерживаются на естественных (среда 27, Эндерса) и синтетических (среда 199, Игла, Мельника-Риордана) питательных средах, приготовленных на основе растворов Хенкса и Эрла. Культивируются они в обычных пробирках, чашках Карреля, пробирках Барского.

#### Методика заражения куриного эмбриона

Существует несколько способов заражения куриного эмбриона. Чаще всего материал вводят в аллантоисную и амниотическую полости, на хорионаллантоисную оболочку и в желточный мешок. Перед заражением скорлупу яйца над воздушной камерой обрабатывают 70% спиртом, обжигают на пламени, смазывают 2% йодной настойкой, вторично протирают спиртом и обжигают.

При заражении в аллантоисную полость в скорлупе над воздушной камерой (границы которой заранее обводят карандашом при просвечивании яйца в овоскопе) продельвают небольшое отверстие с помощью ножиц или скальпеля. Туберкулиновым шприцем вводят 0,1-0,2 мл вирусосодержащего материала на глубину 2-3 мм ниже границы воздушной камеры. Прокол в скорлупе заливают расплавленным парафином. Вскрытие

зараженных эмбрионов производят в сроки максимального накопления вируса (через 48-72 ч инкубации при температуре 37 °C) после обработки скорлупы спиртом и 2% раствором йода ее рассекают и сбрасывают, снимают осторожно подскорлупную оболочку и рассматривают хорионаллантоисную оболочку вокруг места заражения на наличие очагов поражений (геморрагий, белесоватых очагов поражений).

Классификация клеточных культур:

- **первичные** получают непосредственно из тканей животного и человека путем разрушения протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа) межклеточного вещества. Разобщенные клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя монослой - слой толщиной в одну клетку. С помощью специальных реактивов клетки можно снять с поверхности одного сосуда и пересадить в другой. Такая манипуляция называется **пассажем**. Первичные культуры выдерживают не более 5-10 пассажей.

- **перевиваемые** (пассажные) клеточные культуры способны выдерживать неограниченное количество пассажей. Они происходят из опухолевых клеток, утративших дифференциацию и не имеющих ограничений роста.

- **полуперевиваемые** (диплоидные) культуры - фибробластоподобные клетки, которые способны к быстрому размножению, выдерживают до 30-60 пассажей и сохраняют исходный набор хромосом.

Вирусы могут репродуцироваться только в клетках живого организма. В связи с этим вирусы культивируются путем заражения куриных эмбрионов или культур тканей, а также животных-сосунков.

## **Выявление (индикация) вирусов**

### ***Обнаружение вируса в курином эмбрионе***

1. Гибель
2. Появление запаха при вскрытии
3. Помутнение жидкости в полости
4. Образование язвочек и кровоизлияний на оболочках

**Биологический метод исследования** заключается в заражении чувствительного к вирусу животного исследуемым материалом, изучении клинической и патологоанатомической картины заболевания. В рамках этого метода используются различные животные: обезьяны, кролики, морские свинки, собаки, мыши, крысы. Способы заражения: субдуральный, внутримозговой, интраназальный и другие.

Способы обнаружения вируса в организме лабораторных животных различаются в зависимости от вида животного и типа вируса.

### ***Обнаружение вирусов в культуре клеток***

Выявление по цитопатическому действию (ЦПД). ЦПД представляет собой дегенеративные изменения в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов.

Различают полную и частичную дегенерацию клеток монослоя.

При полной дегенерации, вызываемой, например вирусами полиомиелита, Коксаки и ЕСНО, клетки монослоя подвергаются значительным изменениям, большее их количество слущивается со стекла. Оставшиеся единичные клетки сморщены

Частичная дегенерация имеет несколько разновидностей:

1. По типу гроздьобразования (аденовирусы);
2. По типу очаговой деструкции (оспа, грипп);
3. По типу симпластообразования (корь, паротит, парагрипп, герпес, ВИЧ).

Пролиферативный тип изменений характерен для некоторых онкогенных вирусов, трансформирующих клетки в злокачественные.

**Внутриклеточные включения** образуются при репродукции некоторых вирусов в цитоплазме и ядре клеток (оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др.) Их обнаруживают при микроскопии после окраски монослоя по Романовскому - Гимзе, а также при люминесцентной микроскопии.

**Цветная проба Солка.** В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты. В результате этого цвет входящего в состав среды индикатора (фенолового красного) становится оранжевым. При заражении культуры клеток такими цитопатогенными вирусами, как энтеровирусы или реовирусы, метаболизм клеток подавляется, pH среды и ее цвет не меняются (среда остается красной).

**Реакция гемагглютинации.** В основе этой реакции лежит способность вирусов, содержащих рецепторы-гемагглютинины, «склеивать» эритроциты. Если есть гемагглютинины - РГА+(зонтик), если нет - РГА - (пуговка).

**Реакция гемадсорбции.** Механизм сходен с РГА.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Для микробиологической диагностики вирусных инфекций применяют следующие основных методических подходы  
А) бактериологическая диагностика;  
б) вирусологическая диагностика;  
в) серологическая диагностика;  
г) молекулярно-биологическая диагностика.
2. Вирусы размножаются только:  
а) в живых системах;  
б) на мясопептонном агаре;  
в) на дифференциально-диагностических средах;  
г) на элективных средах.
3. Первым этапом вирусологической диагностики является получение и подготовка  
а) культур клеток;  
б) куриных эмбрионов;  
в) чувствительных лабораторных животных;  
г) дифференциально-диагностических сред.
4. Выявляют вирусы:  
А) По цитопатическому действию;  
б) По образованию бляшек;  
в) По цветной пробе;  
г) По биохимическим свойствам.
5. Обнаруживают вирус в куриных эмбрионах  
А) по изменению хорионаллантоисной оболочки;  
б) РГА (Реакция агглютинации);  
в) РСК (Реакция связывания комплемента);  
г) РП (Реакция преципитации).

## Лабораторная работа №9

**Тема: Экология микробов. Нормальная микрофлора организма человека.**

### **Учебная цель:**

1. Освоить закономерности синергизма и антагонизма в мире микробов.
2. Изучить нормальную микрофлору организма человека.

### **Студент должен знать:**

1. Роль микробов в круговороте веществ в природе.
2. Этапы и факторы симбиоза человека с микробами.
3. Микрофлору тела человека.
4. Условия формирования ассоциации резидентов.
5. Отличия патогенов от резидентов.
6. Понятие: эубиоз, дисбиоз и дисбактериоз.

### **Студент должен уметь:**

1. Проводить посев материала с пальцев рук на чашку с МПА (метод отпечатков).
2. Взять мазок из зева и посеять на кровяной агар.

### **План занятия:**

1. Природные микробиоценозы. Экологические связи в микробиоценозах.
2. Симбиоз, мутуализм, комменсализм, конкуренция, антагонизм, паразитизм.
3. Роль микробов в круговороте веществ в природе.
4. Этапы и факторы симбиоза человека с микробами.
5. Условия формирования ассоциации резидентов.
6. Как происходит регуляция резидентной микрофлоры?
7. Отличия патогенов от резидентов.
8. Состав резидентной микрофлоры кожных покровов человека.

9. Нормальная микрофлора организма человека.
10. Аутохтонная и аллохтонная микрофлора. Понятие об экотопах (стерильные и нестерильные экотопы организма).
11. Какими методами можно изучать микрофлору человека?
12. Факторы, оказывающие влияние на количественный и видовой состав микрофлоры организма человека.
13. Понятия: эубиоз, дисбиоз и дисбактериоз.
14. Медицинские иммунобиологические препараты для коррекции дисбиоза (пре-, про- и синбиотики).

### Самостоятельная работа студентов

1. Изучить рост колоний на кровяном агаре.
2. Приготовить мазок из выросших колоний на кровяном агаре, окрасить его по Граму, изучить под микроскопом.
3. Посев материала с пальцев рук на чашку с МПА (метод отпечатков).
4. Провести подсчет количества колоний микробов, выросших в отпечатках кожи пальцев рук (отпечаток пальца немытого, вымытого с мылом и обработанного спиртом).
5. Провести макроскопическое и микроскопическое изучение колоний, выросших в отпечатках кожи пальцев рук.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

Микроорганизмы находятся в различных взаимоотношениях друг с другом. Совместное существование двух различных организмов называется *симбиозом*. Различают несколько вариантов полезных взаимоотношений: метабиоз, мутуализм, комменсализм, сателлитизм.

*Антагонистические взаимоотношения* выражаются в виде неблагоприятного воздействия одного вида микроорганизма на другой, приводящего к повреждению и даже гибели последнего. Формы антагонизма: конкуренция, хищничество, паразитизм.

#### Микрофлора организма человека

Организм человека заселен примерно 500 видами микробов, составляющими его нормальную микрофлору, в виде сообщества микроорганизмов (*микробиоценоз*). Они находятся в состоянии равновесия (*эубиоза*) друг с другом и организмом человека. Различают нормальную микрофлору различных биотопов: кожи, слизистых оболочек полости рта, верхних дыхательных путей, ЖКТ и мочеполовой системы. В организме выделяют постоянную и транзитную микрофлору. *Постоянная* микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. *Транзитная* микрофлора не способна к длительному существованию в организме. Постоянную микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. Облигатная микрофлора (бифидо-бактерии, лактобактерии, пептострептококки, кишечная палочка и др.) является основой микробиоценоза, а факультативная микрофлора (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.) включает меньшую часть микробиоценоза. Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, заключены в высокогидратированный экзополисахаридно-муциновый матрикс, образуя биологическую пленку, устойчивую к различным воздействиям.

### Протокол исследования

| № | Исследуемый материал | Результаты исследования | Графическое изображение |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------------|
|   |                      |                         |                         |

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Представителями резидентной микрофлоры кожи человека являются
  - а) стафилококки;
  - б) стрептококки;
  - в) лактобактерии;
  - г) дрожжеподобные грибы.
2. У здорового человека стерильными являются следующие органы
  - а) почки;
  - б) матка;
  - в) бронхи, легкие;
  - г) желудок.
3. При ослаблении организма на коже возрастает количество
  - а) Гр – бактерий;

б) Гр + бактерий

4. Нормальная микрофлора тела человека выполняет следующие функции

- а) защитную;
- б) транспортную;
- в) иммунную ;
- г) дыхательную.

5. К полезным вариантам взаимоотношений между микроорганизмами относятся

- а) метабиоз;
- б) конкуренция;
- в) комменсализм;
- г) паразитизм.

### **Лабораторная работа №10**

**Тема: Микрофлора лекарственных растений, лекарственного сырья и объектов окружающей среды.**

#### **Учебная цель:**

1. Изучить фитопатогенные микроорганизмы, роль микрофлоры в порче растительного лекарственного сырья и лекарственных средств, санитарно-показательные микроорганизмы.
2. Изучить принципы санитарно-микробиологических исследований почвы, воды, воздуха; санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук аптечных работников, посуды и оборудования.

#### **Студент должен знать:**

1. Болезни лекарственных растений, вызываемые фитопатогенными бактериями, грибами и вирусами.
2. Источники и пути попадания паразитических микробов в почву, воду и воздух.
3. Значение санитарно-микробиологических исследований в оценке санитарного состояния аптечных помещений, производственных цехов в соответствии с требованиями нормативных документов.

#### **Студент должен уметь:**

1. Провести санитарно-микробиологических исследований почвы, воды, воздуха.
2. Провести санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук аптечных работников, посуды и оборудования.

#### **План занятия:**

1. Роль микробов ризосферы в жизни растений.
2. Болезни лекарственных растений, вызываемые фитопатогенными бактериями, грибами и вирусами.
3. Роль микрофлоры в порче растительного лекарственного сырья и лекарственных средств.
4. Источники и пути попадания паразитических микробов в почву, воду и воздух.
5. Источники и пути микробного загрязнения (контаминации) растительного лекарственного сырья и готовых лекарственных средств.
6. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.
7. Принципы санитарно-микробиологических исследований почвы, воды, воздуха.
8. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук аптечных работников, посуды и оборудования.
9. Значение санитарно-микробиологических исследований в оценке санитарного состояния аптечных помещений, производственных цехов в соответствии с требованиями нормативных документов.

### Самостоятельная работа

1. Санитарно-бактериологическое исследование воды.
2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха
3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с аптечной посуды

### Методические указания к выполнению самостоятельной работы

#### 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 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.

#### 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 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<br>Число микробов в 1 м <sup>3</sup> |
|--------------------------------------------|--------------|------------|------------------------------------------------|
| Метод седиментации (по Коху), посев на МПА |              |            |                                                |

|                                                          |  |  |  |
|----------------------------------------------------------|--|--|--|
| Аспирационный метод<br>(аппарат Кротова) посев на<br>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.

Оснащение: исследуемый флакон, пробирка со стерильным р-ром NaCl, чашка с ЖСА.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

### МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ, ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Растительное лекарственное сырье может обсеменяться микроорганизмами в процессе его получения: инфицирование происходит через воду, нестерильную аптечную посуду, воздух производственных помещений и руки персонала. Обсеменение происходит также за счет нормальной микрофлоры растений и фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей заболеваний растений. Фитопатогенные микроорганизмы способны распространяться и заражать большое количество растений.

Микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растений, относятся к эпифитам (греч. ері – над, phyton – растение). Они не наносят вреда, являются антагонистами некоторых фитопатогенных микроорганизмов, растут за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Эпифитная микрофлора препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, усиливая тем самым иммунитет растений. Наибольшее количество эпифитной микрофлоры составляют грамотрицательные *Erwinia herbicola*, образующие на мясопептонном агаре золотисто-желтые колонии. Эти бактерии являются антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей. Обнаруживают в норме и другие бактерии – *Pseudomonas fluorescens*, реже *Bacillus mesentericus* и небольшое количество грибов. Микроорганизмы находятся не только на листьях, стеблях, но и на семенах растений. Нарушение поверхности растений и их семян способствует накоплению на них большого количества пыли и микроорганизмов. Состав микрофлоры растений зависит от вида, возраста растений, типа почвы и температуры окружающей среды. При повышении влажности численность эпифитных микроорганизмов возрастает, при понижении влажности уменьшается.

В почве, около корней растений, находится значительное количество микроорганизмов. Эта зона называется *ризосферой* (от греч. rhiza-корень, sphaîra- шар). В ризосфере часто присутствуют неспорообразующие бактерии (псевдомонады, микобактерии и др.), встречаются также актиномицеты, спорообразующие бактерии и грибы. Микроорганизмы ризосферы переводят различные субстраты в соединения доступные для растений, синтезируют биологически активные соединения (витамины, антибиотики и др.), вступают в симбиотические взаимоотношения с растениями, обладают антагонистическими свойствами против фитопатогенных бактерий.

Микроорганизмы поверхности корня растений (микрофлора ризоплан) в большей степени, чем ризосфера, представлены псевдомонадами. Симбиоз мицелия грибов с корнями высших растений называют микоризой (т.е. грибокорнем) (от греч. mykes –гриб, rhiza- корень). Микориза улучшает рост растений.

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, вирусы и грибы. Болезни, вызываемые бактериями называют бактериозами. Среди возбудителей бактериозов встречаются псевдомонады, микобактерии, эрвинии, кориниебактерии, агробактерии и др. К бактериозам относятся различные виды гнилей, некрозы тканей, увядание растений, развитие опухолей и др.

Различают общие и местные бактериозы. Общие бактериозы вызывают гибель всего растения или его отдельных частей. Они могут проявляться на корнях (корневые гнили) или в сосудистой системе растений. Местные бактериозы ограничиваются поражением отдельных участков растений, проявляясь на паренхимных тканях.

Род *Erwinia* включает виды, вызывающие болезни типа ожога, увядания, мокрой или водянистой гнили, например *E.amylovora* – возбудитель ожога яблонь и груш, *E.carotovora* – возбудитель мокрой бактериальной гнили.

К роду *Pseudomonas* относят различные виды, в частности вызывающие бактериальную пятнистость (*P.syringae*), при этом на листьях образуются пятна разной окраски и размеров в зависимости от видов растений.

Бактерии рода *Xanthomonas* поражают листья, вызывая пятнистость; проникая в сосудистую систему растения, закупоривая ее элементы, они вызывают гибель растения. Различают возбудителей сосудистого бактериоза – *X.campestris*, туберкулеза – *X.betica*, черной бактериальной пятнистости – *X.vesicatoria* и др.

Представители рода *Corynebacterium* вызывают сосудистые и паренхиматозные заболевания растений. Гликопептиды этих бактерий повреждают клеточные мембраны сосудов, в результате чего происходит

закупорка сосудов и гибель растений. Они поражают растения из семейства разноцветных и бобовых (*C.fascians*), вызывают увядание растений семейства бобовых (*C.insidiosum*), бактериальный рак (*C.michidanense*).

Агробактерии способствуют развитию различных опухолей у растений. Образование опухолей вызывается онкогенной плазмидой, передающейся агробактериями в растительные клетки. Эти бактерии вызывают у растений образование корончатых галлов – опухолей. После развития опухоли агробактерии в тканях обычно отсутствуют.

Передача возбудителей бактериозов происходит через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух, путем переноса насекомыми, моллюсками, нематодами. Бактерии проникают в растения через устьица, нектарники и другие части растений, а также даже через небольшие повреждения. При проникновении бактерий внутрь растений происходит повреждение растительных клеток, они мацерируются и отслаиваются друг от друга. Такой путь проникновения называется интрацеллюлярным и межклеточным, а заболевания – паренхиматозными. В случаях распространения и размножения бактерий в сосудистых пучках происходит как бы закупоривание их просвета бактериальной массой. В результате этого процесса и действия бактериальных токсинов растения увядают.

Вирусы, вызывающие болезни растений, делят на возбудителей мозаики и желтухи. При мозаичной болезни растений появляется мозаичная (пятнистая) расцветка пораженных листьев и плодов, растения отстают в росте. Желтуха проявляется карликовостью растений, измененными многочисленными боковыми побегами, цветками и т.д.

Грибы, поражающие растения, могут в случае приготовления из пораженного зерна продуктов питания вызывать пищевые отравления – микотоксикозы. Примером микотоксикоза является эрготизм – заболевание, возникающее при употреблении продуктов, приготовленных из зерна, зараженного спорыньей (гриб *Claviceps purpurea*). Гриб поражает в поле колоски злаковых: образуются склероции гриба, называемые рожками.

#### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ:

1. Какие микроорганизмы находятся в норме на поверхности растений?

1. *Erwinia herbicola*
2. *Pseudomonas fluorescens*
3. *Bacillus mesentericus*
4. Грибы
5. Вирусы
6. Микобактерии

2. Какие возбудители вызывают ожоги, увядание и гниль растений?

1. *E.amyiovora*
2. *E.carotovora*
3. *P.syringae*
4. *xanthomonas*

3. Какие микроорганизмы вызывают сосудистые и паренхиматозные заболевания растений?

1. Род *Corynebacterium*
2. *C.fascians*
3. *C. insidiosum*
4. *C. michidonense*

4. Какие среды необходимы для микробиологического контроля лекарственных средств и аптечной посуды?

1. МПА
2. Среда Эндо
3. ЖСА
4. Сабуро.
5. Тиогликолевая среда

## Лабораторная работа №11

### Тема: Основы генетики микробов.

**Учебная цель:** Изучить материальную основу наследственности, формы изменчивости микроорганизмов, генетические рекомбинации.

**Студент должен знать:**

1. Материальную основу наследственности микроорганизмов.
2. Формы изменчивости микроорганизмов.
3. Условия возникновения изменчивости микроорганизмов. Мутагены.
4. Практическое значение изменчивости микроорганизмов.

**Студент должен уметь:**

1. По культуральным свойствам определить принадлежность бактерий к патогенным штаммам (R-S диссоциация).
2. Объяснить механизм возникновения антибиотикоустойчивости бактерий.

**План занятия:**

1. Материальная основа наследственности микроорганизмов.
2. Понятие о генотипе и фенотипе.
3. Бактериальная хромосома. Функции хромосомы.
4. Плазмиды бактерий. Разновидности плазмид: трансмиссивные, нетрансмиссивные, интегративные, неинтегративные. Плазмиды вирулентности.
5. Изменчивость микроорганизмов. Модификации. Мутации, их классификация.
6. Использование достижений генетики в разработке новых лечебно-профилактических средств и диагностических препаратов.

**Самостоятельная работа студентов:**

1. Просмотр и зарисовка демонстрационных препаратов:
  - а) R-S диссоциация бактерий.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Изменчивость представляет собой явление, при котором изменяются отдельные признаки и свойства живого организма в процессе его развития. Изменчивость свойственна каждому виду микробов и возникает в определенных условиях внешней среды или в результате переноса генетического материала от одной клетки к другой.

Существующие формы изменчивости микроорганизмов подразделяются на две группы: первую группу составляет фенотипическая изменчивость, которая включает модификации, описанные в литературе под названием диссоциации с характерными изменениями морфологических, культуральных, ферментативных и некоторых других биологических свойств микробов; вторую группу составляет генотипическая изменчивость, которая включает: 1) мутации, т. е. наследуемую изменчивость микробов, не связанную с поступлением новой генетической информации, 2) рекомбинации — наследуемую изменчивость, связанную с поступлением новой генетической информации.

### *Модификационная изменчивость*

Модификации представляют собой фенотипические ненаследуемые изменения, которые возникают у бактерий в результате воздействия факторов внешней среды.

Фенотип — форма выражения генотипа, проявляющаяся комплексом новых признаков и свойств микроорганизма в определенных условиях внешней среды. Для фенотипа характерны появление нитевидных, шаровидных форм штаммов, образование споры, капсулы и атипичная ферментация углеводов. Примером может служить штамм *E. coli* с генотипом *lac* +, который синтезирует фермент р-галактозидазу, катализирующий ферментацию лактозы, но этот генотип проявляется в фенотипе при условии их культивирования на среде с лактозой. Переход типичной формы микробов в атипичные затрудняет микробиологический диагноз болезни.

Впервые сообщения об изменении культуральных свойств микробов появились в работах Поль де Крайфа (1921), наблюдавшего расщепление культуры кроличьей септицемии на вирулентные и авирулентные штаммы. Сущность этого явления состоит в том, что при расщепе на плотной питательной среде бактериальной культуры из одного типичного штамма (вида) в основном появляются два типа колоний, отличающихся друг от друга определенными формами. S-форма (гладкая) является нормальным типом колоний для многих

грамотрицательных бактерий, кишечной и других групп; R-форма (шероховатая)—измененный тип колоний. Бактерии ки-шечно-тифозно-дизентерийной группы вирулентны в S-форме колоний, а в R-форме не обладают вирулентными свойствами. Бактерии чумы, туберкулеза, сибирской язвы вирулентны в R-форме, а бру-целлы — в S-форме.

В условиях культивирования микробов возможен переход от S-формы к R-форме. При этом капсульные бактерии теряют капсулы, лишаются биохимической активности и становятся неполноценными в антигенном отношении, приобретая неспецифические антигены. Подвижные бактерии теряют жгутики.

Переход S-формы в R-форму происходит в основном через промежуточные O и слизистые M-колонию. В процессе расщепления культур еще наблюдаются карликовые (D-dwarf), G-колонию (gonidial), появляющиеся как дочерние колонии на поверхности или на краю нормально развивающихся.

В условиях нарушения температурного режима, старения культуры, повышенной концентрации солей, применения антибиотиков и фагов понижается вирулентность, изменяются антигенные и иммуногенные свойства, появляются антибиотикоустойчивые и фаго-устойчивые штаммы, аэробы становятся факультативными анаэробами, утрачивают некоторые имеющиеся ферменты или приобретают новые ферменты. Если культивировать кишечные палочки на среде с добавлением лактозы, то у нее появляется новый, фермент р-галактоза. Изменение метаболизма у бактерий можно вызвать ультрафиолетовым облучением и рентгеновскими лучами. Изменяя параметры среды обитания, можно установить пределы и границы отклонения микробных клеток. Таким образом, широк диапазон фенотипических изменений. В основе этих изменений лежит прежде всего приспособительная активность обменных функций. Адаптация—это закон живого, и по этому закону живут и развиваются микроорганизмы.

Историческое наблюдение и экспериментальные исследования показывают, что наследственность и изменчивость представляют собой как бы две стороны одного и того же явления, т. е. в природе происходит закономерный процесс не только изменчивости, но и передачи наследственных свойств. Живой организм, находясь в условиях внешней среды, в одном случае приспосабливается к новым условиям, изменяя свой обмен веществ, а в другом — погибает, если происходит резкое изменение внешней среды.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

**Указать правильные ответы:**

1. Что относят к внехромосомным генетическим структурам?
  - а) рибосомы
  - б) полисомы
  - в) плазмиды
  - г) мезосомы
  - д) транспозоны
2. Что такое мутагены?
  - а) гены, обеспечивающие мутацию
  - б) факторы, вызывающие мутацию
  - в) факторы, передающие генетическую информацию
  - г) факторы, восстанавливающие ДНК
3. Что такое экзон?
  - а) вирулентный бактериофаг
  - б) профаг
  - в) участок гена, несущий определенную генетическую информацию
  - г) умеренный бактериофаг
4. Что такое инверсия?
  - а) способ генетической рекомбинации
  - б) исправление поврежденных участков ДНК
  - в) хромосомная мутация
  - г) точечная мутация
5. Что такое модификация?
  - а) исправление поврежденных участков ДНК
  - б) фенотипические изменения, не затрагивающие генома клетки
  - в) передача генетического материала при помощи бактериофага
  - г) наследственное скачкообразное изменение признака

## Лабораторная работа №12

### Тема: Основы генетической инженерии и медицинской биотехнологии.

#### Учебная цель:

1. Изучить способы передачи генетической информации между бактериями: трансдукция, трансформация и конъюгация.
2. Изучить основы биотехнологии и генетической инженерии.

#### Студент должен знать:

1. Формы изменчивости микроорганизмов.
2. Условия возникновения изменчивости микроорганизмов, их практическое значение.
3. Сущность биотехнологий, цели и задачи.
4. Микроорганизмы и процессы, применяемые в медицинской биотехнологии.
5. Применение генетической инженерии в биотехнологии.
6. Генетические рекомбинации микроорганизмов.

#### Студент должен уметь:

1. Учесть результаты опыта трансформации.
2. Учесть результаты опыта трансдукции.
3. Учесть результаты опыта конъюгации.

#### План занятия:

1. Медицинская биотехнология.
2. Генетические рекомбинации: трансдукция, конъюгация, трансформация
3. Роль генетических рекомбинаций в генетической инженерии и медицинской биотехнологии.
4. Использование плазмид в генно-инженерных исследованиях.
5. Применение генетических и молекулярно-биологических методов в диагностике инфекционных заболеваний: ПЦР, метод молекулярных зондов.
6. Биопрепараты, получаемые методом генной инженерии (вакцины, моноклональные антитела, гормоны, диагностикумы).

#### Самостоятельная работа студентов

1. Учет результатов опыта трансформации.
2. Учет результатов опыта трансдукции.
3. Учет результатов опыта конъюгации.
4. Указать правильные ответы в тестовых заданиях.
5. Зарисовка таблиц.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

### Постановка опыта трансформации

Реципиент — штамм *Bacillus subtilis* Str (сенная палочка, чувствительная к стрептомицину); донор — ДНК, выделенная из штамма *B. Subtilis* Str (устойчивого к стрептомицину). Селективная среда для отбора рекомбинантов (трансформантов) питательный агар, содержащий 100 ЕД/мл стрептомицина.

К 1 мл бульонной культуры *B. Subtilis* добавляют 1 мкг/мл раствора ДНКазы в 0,5 мл раствора хлорида магния для разрушения ДНК, не проникшей в бактериальные клетки реципиентного штамма, и выдерживают в течение 5 мин. Для определения количества образовавшихся стрептомицинустойчивых рекомбинантов (трансформантов) 0,1 мл неразведенной смеси высевают на селективную среду в чашку Петри. Для определения количества клеток реципиентной культуры в изотоническом растворе хлорида натрия готовят 10-кратные разведения до  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  (для получения сосчитываемого количества колоний), высевают по 0,1 мл на питательный агар без стрептомицина, а для контроля — на агар со стрептомицином. На последней среде реципиентная культура не должна расти, поскольку она чувствительна к стрептомицину. Посев инкубируют, при 37° С. На следующий день учитывают результаты опыта и определяют частоту трансформации по отношению количества выросших рекомбинантных клеток к числу клеток реципиентного штамма.

Допустим, что при высеве 0,1 мл культуры реципиентного штамма в разведении  $10^{-5}$  выросло 170 колоний, а при высеве 0,1 мл неразведенной смеси — 68 колоний рекомбинантного штамма. Поскольку каждая колония образовалась в результате размножений только одной бактериальной клеткой, то в 0,1 мл засеянной культуры реципиента содержится  $170 \times 10^5$  жизнеспособных клеток, а в 1 мл —  $170 \times 10^6$ , или  $1,7 \times 10^8$ . В то же время в 0,1 мл смеси находится 68 рекомбинантных клеток, а в 1 мл — 680, или  $6,8 \times 10^2$ .

Таким образом, частота трансформации в данном опыте будет равна:

$$\frac{6,8 \cdot 10^{-2}}{1,7 \cdot 10^8} = 4,0 \cdot 10^{-6}$$

#### Постановка опыта специфической трансдукции

Реципиент — штамм *E. coli lac<sup>-</sup>*, лишенный 3-галактозидазного оперона, контролирующего ферментацию лактозы. Трансдуцирующий фаг — фаг X dgal, в геноме которого часть генов замещена (3-галактозидазным опероном *E. coli*). Он является дефектным, т. е. не способен вызывать продуктивную инфекцию, заканчивающуюся лизисом кишечной палочки, и обозначается буквой d (фаг dgal) с названием содержащегося в геноме бактериального оперона gal. Селективная среда — среда Эндо, на которой лактозоотрицательные бактерии реципиентного штамма образуют бесцветные колонии, а лактозоположительные колонии рекомбинантного штамма приобретают красный цвет с металлическим оттенком. К 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиентного штамма добавляют 1 мл трансдуцирующего фага dgal в концентрации  $10^6$ - $10^7$  частиц в 1 мл. Смесь инкубируют в течение 60 мин при 37°C, после чего готовят ряд 10-кратных разведений (в зависимости от предполагаемой концентрации бактерий) для получения сосчитываемого количества колоний. Из пробирки с разведением  $10^{-6}$  делают высев по 0,1 мл культуры на 3 чашки Петри со средой Эндо и равномерно распределяют жидкость шпателем по поверхности среды.

Посевы инкубируют в течение 1 суток, после чего отмечают результаты опыта и вычисляют частоту трансдукции по отношению количества клеток рекомбинантов (транс-дуктантов), обнаруженных на всех чашках, к числу клеток реципиентного штамма.

Например, после посева 0,1 мл смешанной культуры в разведении  $10^{-6}$  на 3 чашках со средой Эндо выросло соответственно 138, 170 и 160 бесцветных колоний реципиентного штамма, на первой и последней чашках — 5 и 1 колонии трансдуктантов красного цвета. Следовательно, частота трансдукции в этом случае будет равна:

$$\frac{(5+1) \cdot 10 \cdot 10^{-6}}{(138+170+160) \cdot 10 \cdot 10^{-6}} = \frac{6}{486} = 1,3 \cdot 10^{-2}$$

#### Постановка опыта конъюгации с целью передачи фрагмента хромосомы, который содержит ген *leu*, контролирующий синтез лейцина.

Донор — штамм *E. coli* K12 Hfr *leu<sup>S</sup>*; реципиент — штамм *E. coli* K12 F<sup>-</sup> *leu<sup>+</sup>* Str<sup>R</sup>. Hfr — обозначение состояния, для которого характерна высокая частота рекомбинации. Селективная среда для выделения рекомбинантов -минимальная глюкозосолевая среда:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,5 г,  $\text{MgSO}_4$  — 0,1 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1 г,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,001 г,  $\text{FeSO}_4$  — 0,0005 г, глюкозы — 2 г, стрептомицина — 200 ЕД/мл, дистиллированной воды — 1 л.

К 2 мл 3-часовой культуры реципиента добавляют 1 мл бульонной культуры донора. Посевы инкубируют при 37°C в течение 30 мин. Затем смесь разводят до  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  и высевают по 0,1 мл на селективную агаровую среду в чашки Петри, на которой вырастут только колонии рекомбинантов. В качестве контроля на ту же среду высевают донорский и реципиентный штаммы, которые не будут расти на ней, т. к. первый штамм чувствителен к стрептомицину, а второй ауксотрофен по лейцину. Кроме того, культуру донорского штамма высевают на селективную среду без стрептомицина, а культуру реципиентного штамма — на полную среду (питательный агар) с антибиотиками для определения числа жизнеспособных клеток. Посевы инкубируют при 37°C до следующего дня. После подсчета числа выросших колоний определяют частоту рекомбинаций по отношению количества рекомбинантных клеток к реципиентным.

Например, после посева 0,1 мл смеси донорских и реципиентных культур в разведении  $10^{-2}$  выросло 150 колоний рекомбинантов, а после посева 0,1 мл культуры реципиента из разведения  $10^{-6}$  75 колоний. Таким образом, частота рекомбинации будет равна:

$$\frac{150 \cdot 10 \cdot 100}{75 \cdot 10 \cdot 10^6} = \frac{1,5 \cdot 10^5}{7,5 \cdot 10^8} = 2,0 \cdot 10^{-4}$$

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — один из современных молекулярно-генетических методов, основанный на принципе многократного копирования (амплификации) определенного участка ДНК или РНК. В результате этого процесса количество определяемой ДНК в пробе возрастает в десятки миллионов раз, что делает возможной последующую детекцию амплифицированной ДНК. Таким образом, ПЦР позволяет выявить ничтожно малые фрагменты ДНК, характерные для определенного вида микробов, и точно идентифицировать этот вид.

ПЦР в клетке была открыта более 30 лет назад Нобелевскими лауреатами А.Кронбергом и Д.Ледебергом. Принцип метода ПЦР *in vitro* был разработан К.Мюлисом в 1983 году, также ставшим Нобелевским лауреатом. Почти немедленно появились сообщения о его практическом применении. Однако в этот период из-за отсутствия необходимого оборудования ПЦР проводили путем ручного переноса пробирок в термостаты с нужной температурой. Необходимый для синтеза ДНК фермент ДНК-полимераза разрушался после каждого этапа денатурации (при 95°C), поэтому требовалось постоянное добавление его новых порций.

В 1988 г была получена термостабильная ДНК-полимераза из бактерии *Thermophilus aquaticus*, живущей в горячих источниках. Были разработаны специальные приборы для амплификации (термоциклеры). Созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это привело к тому, что ПЦР стал доступным для широкого применения в лабораторной практике.

**В настоящее время наиболее быстро развиваются пять основных направлений геномной диагностики:**

- инфекционных заболеваний (туберкулез, гонорея, вирусные инфекции — гепатиты В и С, ВИЧ, ЦМВ и др.),
- онкологических заболеваний,
- генетических заболеваний,
  - идентификация личности (трансплантация органов и тканей, судебная медицина, определение отцовства),
- диагностика патогенов в пище.

**Исследуемый материал:** кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы.

**Постановка ПЦР включает следующие этапы:**

**1. Выделение ДНК (РНК) из исследуемого материала (пробоподготовка).**

Клетки лизируют детергентами или высокой температурой. Затем отделяют ДНК от клеточных обломков и разрушают клеточные нуклеазы. Все это обеспечивают приборы: миницентрифуги, развивающие скорость 12000 -14000 оборотов в минуту, вортексы для перемешивания, минитермостаты для пробирок, обеспечивающие быстрое изменение температуры от +30°C до +100°C.

**2. Непосредственная амплификация выделенных участков (копий) нуклеиновых кислот.**

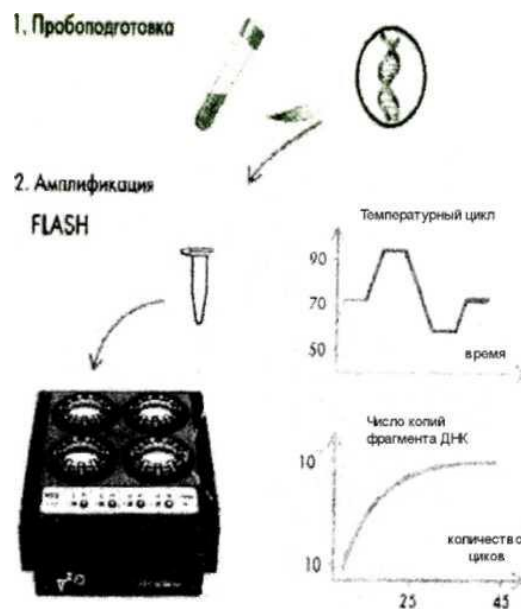
ПЦР обеспечивает быстрое и многократное умножение, амплификацию (*amplification* — усиление, увеличение) количества фрагментов генома. Для этого в пробирку с выделенной ДНК добавляют необходимые реактивы и помещают в амплификатор (термоциклер). Этот прибор позволяет циклически изменять и поддерживать перепады температур в пробирке на несколько десятков градусов за несколько секунд. Если в пробирке есть искомая ДНК, то в ней происходит ряд процессов:

- В результате нагревания до 94 -95°C двойная цепь ДНК разделяется на две отдельные цепи.
- К одноцепочечной ДНК-мишени присоединяется праймер.

Праймер — это последовательность из 15 — 30 нуклеотидов, комплементарная маркерному фрагменту ДНК. При создании оптимальной температуры (45-70°C) происходит связывание (отжиг) праймера с соответствующим участком ДНК: один праймер — на одной нити, другой — на второй нити ДНК. Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина — цитозин.

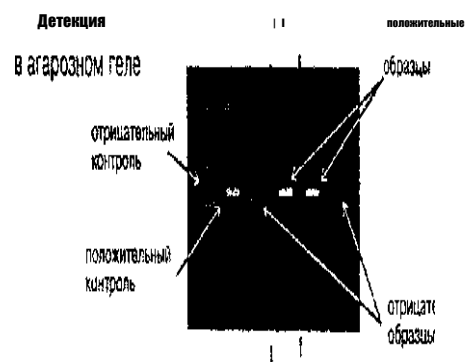
- Синтез (элонгация) — достраивание второй цепи ДНК.

ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к праймерам, достраивая двухцепочечные фрагменты ДНК (~ при 72°C). Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат матрицей для синтеза новых цепей в следующем цикле амплификации — это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируется  $10^6$  копий фрагмента. Через 30 — 40 циклов синтезируется такое количество ДНК, которое можно визуально учитывать после электрофореза в агарозном геле или другими способами.



### 3. Определение (детекция) продуктов ПЦР, полученных на втором этапе.

Выявление наработанного продукта чаще всего проводят при помощи электрофореза в 2-3% агарозном геле, содержащем бромид этидия (специфический флюоресцентный краситель ДНК). Поглощая ультрафиолетовый свет краситель, связанный с ДНК, флюоресцирует. В результате видна оранжевая полоска на уровне контрольной ДНК. Кроме того, используют ферментно-гибридизационный метод или ПЦР в режиме «реального времени» с помощью флюоресцентных красителей.



**Под генной (генетической) инженерией** подразумевают целый комплекс технологий, методов, процессов, посредством которых получают рекомбинантные (созданные благодаря биотехнологии на основе ДНК) РНК и ДНК, а также гены из клеток организмов, осуществляют различные манипуляции с генами и вводят их в другие организмы. Генная инженерия не является наукой – это только набор инструментов, использующий современные достижения клеточной и молекулярной биологии, генетики, микробиологии и вирусологии

Учёные, биохимики и молекулярные биологи научились модифицировать гены или создавать совершенно новые, комбинируя гены различных организмов. Они научились также синтезировать гены, причём точно по заданным схемам. Они научились вводить такие искусственные гены в живые организмы и заставили их там работать. Это было начало генетической инженерии. Задумавшись над следующим обстоятельством.

Основа микробиологической, биосинтетической промышленности — бактериальная клетка. Необходимые для промышленного производства клетки подбираются по определённым признакам, самый главный из которых — способность производить, синтезировать, при этом в максимально возможных количествах, определённое соединение — аминокислоту или антибиотик, стероидный гормон или органическую кислоту.

Иногда надо иметь микроорганизм, способный, например, использовать в качестве «пищи» нефть или сточные воды и перерабатывать их в биомассу или даже вполне пригодный для кормовых добавок белок. Иногда нужны организмы, способные развиваться при повышенных температурах или в присутствии веществ, безусловно смертельных для других видов микроорганизмов. Задача получения таких промышленных штаммов очень важна, для их видоизменения и отбора разработаны многочисленные приёмы активного воздействия на клетку — от обработки сильно действующими ядами до радиоактивного облучения.

**Медицинская биотехнология** - объединение области биотехнологии, медицинских приложений, в частности в области здравоохранения.

Большинство фармацевтических препаратов относительно так называемых *simple molecules* найдены путем проб и ошибок для лечения симптомов болезни или заболевания. Биофармацевтика *large biological molecules*, белков, - это относительно молодая отрасль. Ее продукция взаимодействует с недоступными традиционным лекарствам проблемами организма. Пациент обычно принимает *small molecule* в качестве таблетки, в то время как *large molecule* вводят.

Малые молекулы производят химическим путем, большие же выращивают из живых клеток подобных тем, что находятся в организме человека: например, клеток бактерий, дрожжевых, животных или растительных.

Фармакогеномика - это изучение того, как индивидуальное генетическое наследие организма реагирует на различные лекарства. То есть изучение взаимосвязи между фармацевтическими препаратами и генетикой. Задача фармакогеномики в разработке и производстве лекарственных препаратов, генетически подходящих любому человеку. Фармакогеномика ведет разработки по следующим направлениям:

1. Развитие индивидуальных лекарств. Благодаря фармакогеномике фармацевтические компании могут создавать препараты на основе белков, ферментов и РНК молекул, связанных с конкретными генами и заболеваниями.

2. Более точные методы определения необходимой дозы препарата. Знание генетики пациента позволит врачам определить насколько хорошо его тело может переносить медицинское воздействие. Это позволит максимально увеличить стоимость медикаментов и уменьшить возможность передозировки.

3. Совершенствование лекарств. Находить возможные методы лечения проще, зная генетическую структуру цели. Гены связаны с возникновением многочисленных заболеваний и расстройств, с современной биотехнологией они могут быть использованы в качестве мишеней для разработки новых эффективных методов лечения, которые значительно сократили бы процесс открытия новых лекарств.

4. Повышение качества вакцин. Безопасные вакцины могут быть изготовлены организмом, измененном при помощи генной инженерии. Эти вакцины будут вызывать иммунный ответ без соответствующего инфекционного риска. Такие вакцины будут недорогими, стабильными, легко хранящимися, и могут быть настроены на несколько патогенов одновременно.

Генетическое тестирование включает в себя непосредственно изучение ДНК молекулы. И для определения мутировавшей последовательности ученые сканируют ДНК пациента.

Существует два типа генетического тестирования. В первом, исследователь может определять короткие отрезки ДНК, чьи последовательности дополняют мутировавшие. Во втором, проводить путем генной терапии сравнение последовательности ДНК в геноме пациента со здоровым образцом.

Генетическое тестирование в настоящее время может обнаружить мутации, связанные с редкими генетическими нарушениями, такими как кистозный фиброз или серповидно-клеточная анемия. Однако генетические тесты не могут обнаруживать каждую мутацию, связанную с определенным условием, поскольку многие из них еще не открыты.

### **Тестовый контроль:**

1. Что такое трансформация?
  - а) восстановление поврежденной ДНК;
  - б) передача генетической информации при контакте бактериальных клеток разной «половой» направленности;
  - в) передача генетической информации с помощью фрагмента ДНК;
  - г) передача генетической информации от клетки донора клетке реципиента с помощью бактериофага.
2. Для конъюгации характерно:
  - а) передача генетического материала при помощи бактериофага;
  - б) необходим контакт клеток донора и реципиента;
  - в) передача генетического материала с помощью РНК;
  - г) передача генетического материала с помощью полового фактора.
3. Для трансдукции характерно:
  - а) передача генетического материала при помощи бактериофага;
  - б) необходим контакт клеток донора и реципиента;
  - в) передача генетического материала с помощью РНК;
  - г) передача генетического материала с помощью полового фактора.
4. У каких микроорганизмов материальной основой наследственности является РНК?
  - а) у бактерий;
  - б) у спирохет;
  - в) у РНК-содержащих вирусов;
  - г) у ДНК-содержащих вирусов;
  - д) у микоплазм.
5. Что относят к внехромосомным генетическим структурам?
  - а) рибосомы;
  - б) полисомы;
  - в) плазмиды;
  - г) мезосомы;
  - д) ранспозоны.

### **Лабораторная работа №13**

**Тема: Влияние физических факторов окружающей среды на жизнедеятельность микробов.**

#### **Учебная цель:**

- 1. Изучить методы стерилизации (физические, механические, химические).**
- 2. Изучить методы контроля эффективности стерилизации.**

#### **Студент должен знать:**

1. Методы стерилизации
2. Механизм действия стерилизующих факторов на молекулярную структуру микроорганизмов.
3. Понятия контаминации и деонтаминации, дезинфекции и стерилизации, асептики и антисептики.
4. Современные технологии стерилизации и аппаратуру.
5. Способы контроля эффективности стерилизации и дезинфекции
6. Контроль качества стерилизации.

#### **Студент должен уметь:**

1. Оценить эффективность стерилизации и дезинфекции.

#### **План занятия:**

1. Методы стерилизации: физические, химические, биологические, механические.
2. Устройство и применение печи Пастера, автоклава, аппарата Коха.

3. Стерилизация различных лекарственных средств в зависимости от их природы, формы, лабильности к физическим факторам.
4. Контроль качества стерилизации.
5. Понятие об асептике, антисептике и дезинфекции.
6. Антисептики и дезинфектанты.
7. Принципы контролирования качества дезинфекции.
8. Демонстрация антисептических и дезинфицирующих средств.

#### Самостоятельная работа студентов:

1. Провести и учесть результаты опыта по определению действия высокой температуры (80°C) на спорообразующие (антракоид) и аспорогенные (кишечная палочка и стафилококк) микроорганизмы.

- Заполнить протокол по форме:

| Учет роста культуры | Стафилококк | Кишечная палочка | Антракоид |
|---------------------|-------------|------------------|-----------|
| до прогрева         |             |                  |           |
| после прогрева      |             |                  |           |

Вегетативные формы патогенных микроорганизмов погибают при 50-60°C в течении 30 минут, а при температуре 70° С в течении 5-10 минут. Споры бактерий обладают большей устойчивостью к высоким температурам, что объясняется содержанием в них воды в связанном состоянии, большим содержанием солей кальция, липидов и плотностью, многослойностью оболочки. Следовательно, стафилококк и кишечная палочка после прогрева погибают, а споры антракоида выживают. Это и надо учитывать в оценке результатов посева.

- Заполнить самостоятельно таблицу:

| №   | Способ стерилизации                              | Аппарат | Надёжность | Стерилизуемый материал |
|-----|--------------------------------------------------|---------|------------|------------------------|
| 1.  | Стерилизация в пламени                           |         |            |                        |
| 2.  | Плазменная Стерилизация                          |         |            |                        |
| 3.  | Сухой жар                                        |         |            |                        |
| 4.  | Паром под давлением                              |         |            |                        |
| 5.  | Текущим паром                                    |         |            |                        |
| 6.  | Тиндализация                                     |         |            |                        |
| 7.  | Фильтрация                                       |         |            |                        |
| 8.  | Физические факторы (УФЛ, гамма-лучи, ультразвук) |         |            |                        |
| 9.  | Газовая стерилизация                             |         |            |                        |
| 10. | Пастеризация                                     |         |            |                        |

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

#### СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Стерилизация-это обеспложивание, т. е. полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор.

Стерилизацию производят различными способами:

1. **Физическими** (воздействие высокой температуры, УФ-лучей, повышенного давления, пара, гамма-лучей, ультразвука).
2. **Химическими** (использование различных дезин-фектантов, антисептиков).
3. **Биологическим** (применение антибиотиков).
4. **Механическими** (фильтрация).

В лабораторной практике обычно применяют физические способы стерилизации.

Возможность и целесообразность использования того или иного способа стерилизации обусловлена особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими и химическими свойствами.

К *физическим* способам стерилизации можно отнести прокаливание в пламене, стерилизацию сухим жаром в печи Пастера, кипячение, стерилизацию текучим паром в аппарате Коха, паром под давлением в автоклаве, тиндализацию, пастеризацию, стерилизацию УФЛ, ультразвуком.

*Механическая* стерилизация осуществляется фильтрованием с помощью бактериальных фильтров, изготовленных из различных мелкопористых материалов, поры фильтров должны быть достаточно мелкими, чтобы обеспечить механическую задержку бактерий. Этим методом стерилизуют питательные среды, содержащие белок, сыворотки, антибиотики; отделяют бактерии от вирусов, фагов, экзотоксинов.

В микробиологической практике используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные фильтры (свечи) Шамберлана и Беркефельда.

а) *фильтры Зейтца* — диски из смеси асбеста с целлюлозой, толщина их 3-5 мм, диаметр 35-140 мм;

б) *мембранные* фильтры — из нитроцеллюлозы, толщиной 0,1 мм и диаметром 35 мм. В зависимости от размера пор обозначают 1,2,3,4,5;

в) *свечи Шамберлана и Беркефельда* — полые цилиндры, закрытые с одного конца, готовят их из каолина с примесью песка и кварца.

*Химические* способы стерилизации применяют ограниченно, но они служат для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов (вакцин и сывороток).

*Биологическая* стерилизация основана на применении антибиотиков, иногда фагов.

*Дезинфекция* — использование химических веществ (фенол, лизол, хлорамин, перекись водорода, сулема, спирт, и т. д.) для уничтожения патогенных бактерий в обработанном патологическом материале.

#### Систематизация приборов, процессов обработки и средств для дезинфекции и стерилизации

| Классификация инструментов                                                                                                               | Основные типы инструментов                                                                                                                                                    | Характер обработки и виды воздействий                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Критические</b><br>- проникают в стерильные ткани или сосуды                                                                          | Все инвазивные хирургические инструменты, имеющие контакт с кровоснабжаемыми тканями, скальпели, иглы шприцов, имплантаты, боры, корневые иглы, экскаваторы, зонды, гладилки. | <b>Стерилизация</b> - вирулицидные, спороцидные, ту-беркулоцидные, бактерицидные воздействия.<br><b>Длительная экспозиция:</b> гамма-лучи, плазма, длительная газовая и химическая стерилизация, автоклавирование (2 атм. 15 мин), сухой жар (максим. режим, 2 часа)      |
| <b>Полукритические</b> - соприкасаются со слизистыми оболочками (за исключением ряда стоматологических инструментов, перечисленных выше) | Гибкие эндоскопы, катетеры, инструменты аналогичные гибким эндоскопам, зеркала, коронки, наконечники турбин, а также оттиски (слепки) зубов.                                  | <b>Дезинфекция высокого уровня</b> - вирулицидные, спороцидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.<br><b>Кратковременная экспозиция:</b> гамма-лучи, плазма, кратковременная газовая и химическая стерилизация, автоклавирование (1-1,5 атм. 15 мин), сухой жар. |
|                                                                                                                                          | Термометры для измерения температуры слизистой оболочки, ванны для гидротерапии.                                                                                              | <b>Дезинфекция среднего уровня:</b> вирулицидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                          | УЗ-ванночки и УФ-лампы стоматологов, физиотерапевтические инструменты, ложки для слепков.                                                                                     | <b>Средства для химической дезинфекции</b> с указанием на маркировке туберкулоцидной активности.                                                                                                                                                                          |
| <b>Некритические</b> соприкасаются с неповрежденной кожей                                                                                | Термометры для измерения температуры кожных покровов, стетоскопы, манжетки аппаратов для измерения давления, настольные приборы и т. п.                                       | <b>Дезинфекция уровня:</b> бактерицидные воздействия. <b>Средства для химической дезинфекции</b> без указания на маркировке наличия туберкулоцидной активности.                                                                                                           |

#### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите правильные ответы:

- Что такое стерилизация?
- а) полное обеспложивание объектов от всех видов микробов и их спор
- б) уничтожение патогенных микроорганизмов

- в) уничтожение вегетативных форм микроорганизмов
  - г) предотвращение попадания микроорганизмов в рану
  - д) уничтожение на объектах конкретных видов микробов
2. Какие факторы используются при автоклавировании?
- а) температура
  - б) фильтры
  - в) пар
  - г) давление
3. Какие факторы используются в печи Пастера?
- а) давление
  - б) пар
  - в) сухой жар
  - г) антибиотики
4. К физическим методам стерилизации относятся:
- а) ультразвук
  - б) ультрафиолетовые лучи
  - в) антибиотики
  - г) фильтрование
  - д) паровая стерилизация
  - е) сухожаровая стерилизация
5. Перечислите способы стерилизации, освобождающие объект от споровых форм микробов:
- а) облучение ультрафиолетом
  - б) автоклавирование
  - в) пастеризация
  - г) сухим жаром
  - д) гамма-облучение

#### **Лабораторная работа №14**

**Тема: Противомикробные химиотерапевтические средства.**

**Сдача модуля по теме: «Влияние факторов окружающей среды на жизнедеятельность микробов.**

**Генетика.Противомикробные препараты».**

#### **Учебная цель:**

1. Изучить механизм действия антибиотиков на микробную клетку.
2. Изучить методику определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

#### **Студент должен знать:**

1. Спектр действия антибиотиков на микробную клетку.
2. Определение чувствительности (методы индикаторных дисков и кассетный).

#### **Студент должен уметь:**

1. Описать результаты чувствительности чистой культуры к антибиотикам.
2. Определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом индикаторных дисков.

#### **План занятия:**

1. Антибиотики, определение, классификация по химической структуре, спектру, типам и механизму действия.
2. Химиотерапевтические препараты, механизм их действия на микробную клетку.
3. Механизмы лекарственной устойчивости бактерий.
4. Побочное действие антибиотиков и синтетических противомикробных лекарственных средств.

5. Методы и единицы измерения антимикробной активности.
6. Противовирусные химиотерапевтические препараты.
7. Демонстрация антибиотиков с различным механизмом и спектром действия.
8. Сдача модуля.

### Самостоятельная работа студентов

1. Учесть результаты дисковой антибиотикограммы.
2. Учесть результаты кассетного микрометода.
3. Оформить протокол исследования.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Все антибиотики обладают избирательностью действия. Их относительная безвредность для человека определяется, прежде всего, тем, что они специфически подавляют такие метаболические процессы в микробной клетке или вируса, которые отсутствуют в эукариотной клетке или недоступны для них. В этом отношении уникальным является механизм действия бета-лактамов. Мишенями для них являются транспептидазы, которые завершают синтез пептидогликана клеточной стенки. Поскольку клеточная стенка есть только у прокариот, в эукариотной клетке нет мишени для бета-лактамов. Транспептидазы представляют собой набор белков-ферментов, локализованных в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Отдельные бета-лактамы различаются по степени родства к тому или иному ферменту, которые получили название пеницил-линсвязывающих белков. Поэтому биологический эффект бета-лактамов различен: бактериостатический, бактерицидный, литический.

Кроме бета-лактамов, синтез клеточной стенки поражают такие антибиотики, как бацитрацин, фосфомицин, циклосерин, ванкомицин, ристомин, однако иным путем, чем пенициллин. Все они, кроме циклосерина, вызывают бактерицидный эффект.

Механизм действия таких антибиотиков, как хлорамфеникол, тетрациклины, стрептомицин, аминогликозиды, эритромицин, олеандромицин, спирамицин и другие макролиды, линкозамиды, фузидиевая кислота, связан с угнетением синтеза белка на уровне рибосом 70S. Хотя бактериальные рибосомы 70S имеют такую же в принципе структуру, как рибосомы 80S эукариотных клеток, их белки и белковые факторы, участвующие в работе белоксинтезирующей системы, отличаются от таковых рибосом 80S. Этим объясняется избирательность действия указанных антибиотиков на белковый синтез бактерий.

Разные антибиотики по-разному блокируют синтез белка. Тетрациклины блокируют связывание ат-РНК на А-участке рибосомы 70S. Хлорамфеникол подавляет пептидилтрансферазную реакцию. Стрептомицины препятствуют превращению инициаторного комплекса в функционально активную рибосому. Эритромицин блокирует реакцию транслокации. Пуромицин, присоединяясь к растущему концу синтезируемой полипептидной цепи, вызывает преждевременное отделение ее от рибосомы. Механизм действия фторхинолонов связан с их избирательным подавлением бактериальных ферментов ДНК-гираз, участвующих в репликации ДНК. Фторхинолоны связываются со специфическими участками ДНК, которые создаются воздействием ДНК-гиразы, и подавляют ее активность.

Рифампицины угнетают активность ДНК-зависимых РНК-полимераз, вследствие чего у бактерий подавляются процессы транскрипции.

Активность противоопухолевых антибиотиков связана с тем, что они либо являются ингибитором синтеза ДНК (брунеомицин), либо подавляют активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы, т. е. блокирует транскрипцию (антрациклины, актиномицины, оливомицин).

Учет результатов определения чувствительности выделенных из исследуемого материала микроорганизмов к антибиотикам проводится следующим способом: на рабочем столе находится чашка Петри, на которой был высеван выделенный из исследуемого материала микроб и были нанесены на равном расстоянии друг от друга диски с антибиотиками (методика этой работы изложена в практическом руководстве).

Студенту необходимо сделать вывод о степени чувствительности выделенной культуры к антибиотикам. Смысл данного исследования сводится к следующему: поверхность питательной среды на чашке смачивают взвесью выделенной чистой культуры в физ. растворе и таким образом достигается равномерное распределение культуры по всей чашке. «Поверх» посева накладываются диски с антибиотиками и чашки инкубируют в термостате. С дисков, пропитанных каждый отдельным антибиотиком, происходит диффузия антибиотиков в толщу агар. Чем чувствительнее культура к антибиотику, тем меньше его эффективность концентрации и тем больше диаметр зоны задержки роста культуры вокруг определенного диска. При этом результат учитывается по следующей схеме (таблица).

|                                  |                                                       |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Культура<br>высокочувствительна  | диаметр зоны угнетения роста бактерий 30 и более мм.  |
| Культура<br>средне чувствительна | диаметр зоны угнетения роста бактерий не менее 20 мм. |

|                                 |                                                       |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Культура<br>слабо чувствительна | диаметр зоны угнетения роста бактерий не более 10 мм. |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|

### Тестовый контроль

1. Синтез клеточной стенки подавляют антибиотики:
  - а) полимиксин
  - б) аминогликозиды
  - в) цефалоспорины
  - г) тетрациклины
  
2. Нарушение функции цитоплазматической мембраны отмечается под действием:
  - а) цефалоспорины
  - б) макролидов
  - в) левомецитина
  - г) нистатина
  
3. Антибиотики, ингибирующие синтез белка на рибосомах бактериальных клеток:
  - а) пенициллин
  - б) полимиксин
  - в) аминогликозиды
  - г) амфотерицин В
  
4. Антибиотики, действующие на синтез нуклеиновых кислот
  - а) эритромицин
  - б) олеандомицин
  - в) рифампицин
  - г) линкомицин
  
5. Чувствительность к антибиотикам определяют:
  - а) методом мембранных фильтров
  - б) методом бумажных дисков
  - в) двухфазным бродильным методом
  - г) седиментационным методом
  - д) аспирационным методом.

## Лабораторная работа №15

### Тема: Учение об инфекции. Медицинская иммунология. Физиологические механизмы иммунитета.

#### Учебная цель:

1. Изучить вопросы условий возникновения, формы и характеристики инфекций.
2. Изучить периоды инфекционных болезней.
3. Изучить патогенность, вирулентность, токсичность, факторы патогенности бактерий.

#### Студент должен знать:

1. Роль микроорганизмов в развитии инфекционного процесса и условия возникновения инфекционного процесса.
2. Значение свойств микробов и состояние макроорганизма в развитии инфекционного процесса.

#### Студент должен уметь:

1. Производить посев на кровяной агар с целью определения токсинообразования.
2. Приготовить мазок и окрасить его по Бурри-Гинсу.
3. Определить фагоцитарный показатель и фагоцитарное число.

#### План занятия:

1. Определение понятия «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь». Условия возникновения инфекционного процесса.
2. Формы инфекции. Источники инфекции. Механизмы и пути передачи инфекции. Периоды инфекционной болезни.
3. Патогенность, вирулентность, токсичность микробов.
4. Факторы патогенности бактерий, их характеристика. Характеристика бактериальных токсинов.
5. Патогенетические особенности вирусных инфекций.
6. Иммунная система человека. Иммуногенез.
7. Понятие о механических, физико-химических и биологических барьерах.
8. Фагоцитоз. Методы определения фагоцитарной активности.

#### Самостоятельная работа студентов:

Просмотр и зарисовка демонстрационного материала. Факторы патогенности микроорганизмов:

- Токсинообразование (гемолизин, гистотоксин дифтерийной палочки).
- Ферменты патогенности (плазмакоагулаза, лецитиназа, ферментация маннита в анаэробных условиях).
- Капсулообразование (окраска по Бурри — Гинсу).
- Дать правильные ответы на тестовые задания.
- Зарисовать таблицы.

#### Методические рекомендации

Термин «**инфекция**» (infectio- заражать) или синоним **инфекционный процесс** обозначает совокупность физиологических восстановительно-приспособительных реакций, возникающих в восприимчивом макроорганизме при определенных условиях окружающей внешней среды в результате его взаимодействия с проникшими и размножающимися в нем патогенными или условно-патогенными бактериями, грибами и вирусами и направленных на поддержание постоянства внутренней среды макроорганизма (гомеостаза). Сходный процесс, но вызванный простейшими, гельминтами и насекомыми — носит название **инвазия**.

Любое инфекционное заболевание характеризуется последовательной сменой разных периодов. Различают следующие периоды: инкубационный, продромальный, клинический (разгар болезни), реконвалесценции (выздоровления):

-инкубационный период-время, которое проходит с момента заражения до начала клинических проявлений болезни;

-продромальный период-время появления первых клинических симптомов общего характера, неспецифических для данного заболевания;

-период острых проявлений заболевания в разгар болезни;

-период реконвалесценции-период угасания и исчезновения типичных симптомов и клинического выздоровления.

**Формы инфекции:** протекает в разнообразной форме в зависимости от происхождения, локализации возбудителя и других факторов. Экзогенная инфекция возникает в результате поступления микроорганизмов из окружающей среды с пищей, водой, воздухом, выделениями человека, реконвалесцента и носителя. При эндогенной инфекции возбудитель находится в организме в составе облигатной или транзитной микрофлоры. Довольно часто такая форма вызывается условно-патогенными микроорганизмами при ослаблении защитных свойств макроорганизма в случае переохлаждения, ранее перенесенных заболеваний. В зависимости от локализации возбудителя различают очаговую инфекцию, при которой микроорганизмы локализуются в местном очаге и не распространяются по организму. В случае проникновения возбудителя из первичного очага в кровь и распространения его гематогенным путем по организму развивается бактериемия или вирусемия.

**Патогенность, вирулентность:** возникновение инфекционного заболевания зависит от многих факторов: патогенности и вирулентности микроорганизма, его дозы, способа проникновения, состояния макроорганизма.

Фенотипическим признаком патогенного микроорганизма является его вирулентность, свойство штамма проявляется в определенных условиях. Вирулентность можно повышать, понижать, измерять, т.е. является мерой патогенности. Количественные показатели вирулентности могут быть выражены в DLM (минимальная летальная доза), DL50 (доза вызывающая гибель 50 % экспериментальных животных). При этом учитывают вид животных, пол, массу тела.

Патогенность видовой признак, передающийся по наследству закрепленный в геноме микроорганизма. Потенциальная возможность микроорганизма проникать и инфицировать, размножаться, инвазировать.

**Факторы патогенности:** факторы вирулентности определяют способность микроорганизмов прикрепляться (адсорбироваться) на клетках (адгезия), размножаться на их поверхности (колонизация), проникать в клетки (пенетрация), противостоять факторам неспецифической резистентности и иммунной защиты организма (агрессия).

Начальной стадией инфекционного процесса является проникновение микроорганизмов во внутреннюю среду организма путем преодоления ими механических барьеров (кожа, слизистые оболочки бактериостатические вещества кожи, пищеварительного тракта — ферменты, соляная кислота желудка и т.д.). Адгезия и колонизация, связанные с прикреплением микроорганизмов на чувствительные клетки с последующим размножением возбудителя на поверхности этих клеток. У каждого вида или штамма микроорганизма имеются свои адгезины, обладающими уникальными структурами, что обеспечивает высокую специфичность взаимодействия бактериальной клетки с клеткой хозяина.

Патогенные бактерии могут пенетрировать (проникать) внутрь клеток макроорганизма.

Агрессия осуществляется за счет структур бактериальной клетки: капсулы, клеточной стенки, липополисахаридов грамотрицательных бактерий, которые подавляют миграцию лейкоцитов, препятствуют фагоцитозу. Для подавления иммунитета патогенные микроорганизмы продуцируют ферменты: протеазы, разрушают иммуноглобулины; коагулазу, свертывающую плазму крови; фибринолизин, растворяющий сгустки фибрина; лецитиназу, растворяющую лецитин в оболочках клеток человека.

Токсические вещества — синтезируемые бактериальной клеткой, делят на две группы-экзотоксины и эндотоксины. Бактериальные токсины могут быть секретирруемыми (экзотоксин) и несекретирруемыми (эндотоксин). Экзотоксины делятся на четыре типа.

Цитотоксины блокируют синтез белка на субклеточном уровне. Мембранотоксины повышают проницаемость поверхностной мембраны эритроцитов (гемолизин) и лейкоцитов (лейкоцидины) разрушая их.

Функциональные блокаторы — токсины, блокирующие функции определенных тканевых систем.

Энтеротоксины (холероген и др.) активируют аденилатциклазу, что приводит к повышению проницаемости стенки тонкой кишки и повышению выхода жидкости в ее просвет, т.е. диарею. Экзофолитины и эритрогенины образуются некоторыми штаммами золотистого стафилококка, скарлатинозного стрептококка. Эндотоксины отличаются от экзотоксинов меньшей специфичностью действия, меньшей токсичностью и большей термостабильностью.

#### Характеристика бактериальных экзо-и эндотоксинов

| Свойства                         | Экзотоксины                                                              | Эндотоксины                                                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Химическая природа               | Белки (9-19 аминокислот)                                                 | ЛПС с белком                                                                                       |
| Происхождение                    | Выделяются в процессе жизнедеятельности. Чаще грамположительные бактерии | Связаны со структурами бактерий; выделяются при разрушении клетки. Чаще грамотрицательные бактерии |
| Отношение к температуре          | Термолабильны                                                            | Термостабильны                                                                                     |
| Степень ядовитости               | Очень токсичны                                                           | Менее ядовиты                                                                                      |
| Скорость действия                | После инкубации 18-72 часа                                               | Довольно быстро                                                                                    |
| Специфичность действия           | Выражена                                                                 | Лишена тропизма                                                                                    |
| Отношение к химическим веществам | Чувствительны к спирту, кислотам, щелочам, пищеварительным ферментам     | Мало чувствительны к химическим веществам, не переходят в анатоксины                               |

|                   |                   |                 |
|-------------------|-------------------|-----------------|
| Линейные свойства | Активные антигены | Слабые антигены |
|-------------------|-------------------|-----------------|

Возбудителями инфекционных болезней являются вирусы, прионы, бактерии, грибы, простейшие, гельминты. Все они являются паразитами. Паразитизм-форма отношений между двумя организмами разных видов, из которых один, называется паразитом, использует другого, именуемого хозяином, как источник питания. К паразитам относятся все возбудители инфекционных и инвазионных болезней человека.

Под видовым иммунитетом понимают невосприимчивость, обусловленную врожденными биологическими особенностями, присущими данному виду животных или человеку. По сути дела это видовой признак, передающийся по наследству, подобно любому другому признаку вида. Примером подобной формы невосприимчивости может служить иммунитет человека к чуме рогатого скота, животных — к брюшному тифу, дизентерии и т. д. Видовой иммунитет может проявляться у животных одного и того же вида ко многим инфекционным агентам и у разных видов к одному и тому же возбудителю, например, к полиомиелиту невосприимчивы все млекопитающие, кроме обезьян, человека и некоторых видов грызунов. В основе видовой невосприимчивости лежат различные механизмы естественной неспецифической резистентности. В связи с этим многие ученые предполагают, что данную форму невосприимчивости правильней называть не иммунитетом, естественной неспецифической резистентностью. Характерными особенностями ее являются наследственная передача и отсутствие специфичности.

К неспецифическим факторам защиты организма человека относятся следующие:

- механические (кожа и слизистые оболочки);
- физико-химические (ферменты, реакция среды и др.);
- иммунобиологическую защиту, осуществляемую нормальными неиммунными клетками (фагоциты, естественные киллеры) и гуморальными компонентами (комплемент, интерферон, некоторые белки крови).

**Механические факторы.** Кожа и слизистые оболочки механически препятствуют проникновению микроорганизмов и других антигенов в организм. Последние все же могут попадать в организм при заболеваниях и повреждениях кожи (травмы, ожоги, воспалительные заболевания, укусы насекомых, животных и т.д.), а в некоторых случаях и через нормальную кожу и слизистую оболочку, проникая между клетками или через клетки эпителия (например, вирусы). Механическую защиту осуществляет также реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей, так как движение ресничек постоянно удаляет слизь вместе с попавшими в дыхательные пути инородными частицами и микроорганизмами.

**Физико-химические факторы.** Антимикробными свойствами обладают уксусная, молочная, муравьиная и др. кислоты, выделяемые потовыми и сальными железами кожи; соляная кислота желудочного сока, а также протеолитические и др. ферменты, имеющиеся в жидкостях и тканях организма. Особая роль в антимикробном действии принадлежит ферменту лизоциму. Этот проте-олитический фермент, открытый в 1909 г. П. Л. Лашенко и выделенный в 1922 г. А Флемингом, получил название «мурамидаза», так как разрушает клеточную стенку бактерий и других клеток, вызывая их гибель и способствуя фагоцитозу. Лизоцим вырабатывают макрофаги и ней-трофилы. Содержится он в больших количествах во всех секретах, жидкостях и тканях организма (кровь, слюна, слёзы, молоко, кишечная слизь, мозг и др.) Снижение уровня фермента приводит к возникновению инфекционных и других воспалительных заболеваний. В настоящее время осуществлен химический синтез лизоцима, и он используется как медицинский препарат для лечения воспалительных заболеваний.

**Иммунобиологические факторы.** В процессе эволюции сформировался комплекс гуморальных и клеточных факторов неспецифической резистентности, направленных на устранение чужеродных веществ и частиц, попавших в организм. Гуморальные факторы неспецифической резистентности состоят из разнообразных белков, содержащихся в крови и жидкостях организма. К ним относятся белки системы комплемента, интерферон, трансферрин, (З-лизины, белок пропердин, фибронектин и др. Белки системы комплемента обычно неактивны, но приобретают активность в результате последовательной активации и взаимодействия компонентов комплемента. Интерферон оказывает иммуномодулирующий, пролифе-ративный эффект и вызывает в клетке, инфицированной вирусом, состояние противовирусной резистентности. (З-лизины вырабатываются тромбоцитами и обладают бактерицидным действием. Трансферрин конкурирует с микроорганизмами за необходимые для них метаболиты, без которых возбудители не могут размножаться. Белок пропердин участвует в активации комплемента и других реакциях. Сывороточные ингибиторы крови, например (З-ингибиторы ((З-липопротеины), инактивируют многие вирусы в результате неспецифической блокады их поверхности.

Большое значение в неспецифической резистентности имеют клетки, способные к фагоцитозу, а также клетки с цитотоксической активностью, называемые естественными киллерами, или НК-клетками. НК-клетки представляют собой популяцию лимфоцитоподобных клеток (большие гранулосодержащие лимфоциты), обладающие цитотоксическим действием против чужеродных клеток (раковых, клеток простейших и клеток, пораженных вирусом). Видимо, НК-клетки осуществляют в организме противоопухолевый надзор.

Фагоцитоз, процесс активного захватывания и поглощения живых и неживых частиц одноклеточными организмами или особыми клетками (фагоцитами) многоклеточных животных организмов. Явление фагоцитоза было открыто И. И. Мечниковым, который проследил его эволюцию и выяснил роль этого процесса в защитных реакциях организма высших животных и человека, главным образом при воспалении и иммунитете.

Большую роль фагоцитоз играет при заживлении ран. Способность захватывать и переваривать частицы лежит в основе питания примитивных организмов. В процессе эволюции эта способность постепенно перешла к отдельным специализированным клеткам, вначале пищеварительным, а затем – к особым клеткам соединительной ткани. У человека и млекопитающих животных активными фагоцитами являются нейтрофилы (микрофаги, или специальные лейкоциты) крови и клетки ретикуло-эндотелиальной системы, способные превращаться в активных макрофагов. Нейтрофилы фагоцитируют мелкие частицы (бактерии и т.п.), макрофаги способны поглощать более крупные частицы (погибшие клетки, их ядра или фрагменты и т.п.). Макрофаги способны также накапливать отрицательно заряженные частицы красителей и коллоидных веществ. Поглощение мелких коллоидных частиц называют ультрафагоцитозом, или коллоидопексией.

Фагоцитоз требует затраты энергии и связан прежде всего с активностью клеточной мембраны и внутриклеточных органоидов – лизосом, содержащих большое количество гидролитических ферментов. В ходе фагоцитоза различают несколько стадий. Вначале фагоцитируемая частица прикрепляется к клеточной мембране, которая затем обволакивает её и образует внутриклеточное тельце – фагосому. Из окружающих лизосом в фагосому попадают гидролитические ферменты, переваривающие фагоцитируемую частицу. В зависимости от физико-химических свойств последней переваривание может быть полным или неполным. В последнем случае образуется остаточное тельце, которое может оставаться в клетке длительное время.

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Возбудители инфекционных заболеваний человека, животных называются  
А) патогенные  
Б) сапрофитные  
В) условно-патогенные
2. Генетический контроль вирулентности осуществляется следующими структурами  
А) хромосомы  
Б) транспозоны  
В) плазмиды  
Г) рибосомы
3. К факторам патогенности относятся  
А) ворсинки,  
Б) жгутики  
С) Б) капсула  
Д) цитоплазма  
Г) ферменты, токсины
4. Пути передачи инфекции  
А) воздушно-капельный  
Б) контактно-бытовой  
В) фекально-оральный  
Г) трансмиссивный
5. Факторы, влияющие на возникновение инфекционного процесса:  
А) факторы внешней среды  
Б) стресс  
В) применение лекарственных препаратов  
Г) снижение иммунитета

### Лабораторная работа №16

**Тема: Физиологические механизмы иммунитета. Реакции иммунитета (агглютинации и преципитации).**

**Учебная цель:**

1. Изучит физиологические механизмы иммунитета.
2. Изучить серологические методы лабораторной диагностики.

**Студент должен знать:**

1. Постановку **реакции агглютинации (развернутая).**
2. Постановку реакции преципитации, практическое применение.
3. Получение диагностических сывороток, классификацию.

**Студент должен уметь:**

1. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации на предметном стекле.
2. Поставить развернутую реакцию агглютинации.
3. Поставить реакцию коагглютинации.

**План занятия**

1. Антигены, их природа. Гаптены. Антигены бактерий.
2. Антитела, классификация. Структура иммуноглобулинов, основные классы.
3. Гуморальный и клеточный иммунный ответ
4. Серологические реакции, их сущность и механизм, практическое применение. Серодиагностика. Сероидентификация.
5. Реакция агглютинации, методы постановки, фазы реакций, практическое применение.
6. Реакция коагглютинации, способы постановки, практическое применение.
7. Диагностикумы, классификация, применение.
8. Диагностические сыворотки, получение и виды диагностических сывороток – агглютинирующие (адсорбированные и неадсорбированные, моно- и поливалентные), коаггулирующие.
9. Демонстрация развернутой реакции агглютинации, реакции гемолиза.
10. Постановка реакции коагглютинации.
11. Демонстрация диагностикумов и диагностических сывороток.

**Самостоятельная работа студентов:**

1. Постановка и учет ориентировочной реакции агглютинации на предметном стекле с целью идентификации выделенной чистой культуры грамотрицательных палочек.
2. Постановка и учет развернутой реакции агглютинации с целью серодиагностики брюшного тифа.
3. Постановка и учет реакции термокоагглютинации с целью сероидентификации сибирской язвы.

**ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ**

Под **иммунитетом** (от лат. *immunitas* — освобождение, избавление от чего-либо) в биологии и медицине понимают комплекс реакций организма, направленных на сохранение его структурной и функциональной целостности при воздействии на организм генетически чужеродных веществ, как поступающих извне, так и образующихся внутри организма.

Различают несколько основных видов иммунитета:

-*Наследственный иммунитет* (врожденный, видовой) обусловлен выработкой в процессе филогенеза генетически закрепленной невосприимчивости вида к данному антигену или микроорганизму.

-*Приобретенный иммунитет* специфичен и не передается по наследству. Он формируется естественно и создается искусственно. Естественный приобретенный иммунитет появляется после перенесенного инфекционного заболевания (оспа, корь и др.). Искусственный приобретенный иммунитет возникает при вакцинации.

Иммунитет бывает *активный* и *пассивный*. *Активный иммунитет* вырабатывается организмом в результате воздействия антигена на иммунную систему (например, при вакцинации). *Пассивный иммунитет* обусловлен антителами, передаваемыми от иммунной матери ребенку при рождении или путем введения иммунных сывороток, а также при пересадке иммунных клеток.

Активный иммунитет может быть *гуморальным* (обусловлен антителами), *клеточным* (обусловлен иммунокомпетентными клетками) и *клеточно-гуморальным* (обусловлен и антителами, и иммунокомпетентными клетками). Например, антитоксический иммунитет к ботулизму и столбняку является гуморальным, так как он обусловлен антителами, циркулирующими в крови; иммунитет к лепре или туберкулезу — клеточный, а к оспе — клеточно-гуморальный.

Различают также иммунитет *стерильный*, сохраняющийся в отсутствие микроорганизма, и *нестерильный*, который существует только при наличии возбудителя в организме. Классическим примером нестерильного иммунитета является иммунитет при туберкулезе.

Отдельно выделяют так называемый *местный иммунитет*, который защищает отдельные участки организма, например, слизистые оболочки от возбудителей инфекционных болезней. Он формируется при участии секреторного иммуноглобулина А и характеризуется более активным фагоцитозом.

**Антигены** — это любые генетически чужеродные для данного организма вещества (обычно биополимеры), которые, попав во внутреннюю среду организма или образуясь в организме, вызывают ответную специфическую иммунологическую реакцию: синтез антител, появление sensibilizированных лимфоцитов или возникновение толерантности к этому веществу, гиперчувствительности замедленного или немедленного типов, иммунологической памяти.

Антигены обладают специфичностью, которая связана с определённой химической группой в составе молекулы, называемой детерминантой, или эпитопом. Детерминанты антигена — это те его части, которые распознаются антителами и иммунокомпетентными клетками.

Различают *полноценные* и *неполноценные (гаптены) антигены*. Антигены, вызывающие полноценный иммунный ответ, имеющие 2 и более детерминанты, называются *полноценными*. Это органические вещества микробного, растительного и животного происхождения. *Гаптенами* могут быть химические вещества с малой молекулярной массой или более сложные химические вещества, не обладающие свойствами полноценного антигена: некоторые бактериальные полисахариды, полипептид туберкулёзной палочки (РРД), ДНК, РНК, липиды, пептиды. *Гаптены* из-за небольшой молекулярной массы не фиксируются иммунокомпетентными клетками макроорганизма и не могут вызвать ответную иммунологическую реакцию. *Полугаптены* — неорганические радикалы (йод, бром, нитрогруппа, азот и др.), присоединившиеся к белковой молекуле, могут менять иммунологическую специфичность белка.

**Антителообразование.** В ответ на введение антигена иммунная система вырабатывает антитела — белки, способные специфически соединяться с антигеном, вызвавшим их образование и, таким образом, участвовать в иммунологических реакциях. Относятся антитела к у-глобулинам, т. е. наименее подвижной в электрическом поле фракции белков сыворотки крови. В организме у-глобулины вырабатываются особыми клетками — плазмочитами. В соответствии с Международной классификации у-глобулины, несущие функции антител, получили название иммуноглобулинов и обозначаются символом Ig. Следовательно, антитела — это иммуноглобулины, вырабатываемые в ответ на введение антигена и способные специфически взаимодействовать с этим же антигеном.

**Функции антител.** Первичная функция антител состоит во взаимодействии их активных центров с комплементарными им детерминантами антигенов. Вторичная функция антител состоит из их способности:

- связывать антиген с целью его нейтрализации и элиминации из организма;
- участвовать в распознавании «чужого» антигена;
- обеспечивать кооперацию иммунокомпетентных клеток (макрофагов, Т- и В- лимфоцитов);
- участвовать в различных формах иммунного ответа (фагоцитоз, киллерная функция, иммунологическая толерантность, иммунологическая память, гиперчувствительность немедленного типа, гиперчувствительность замедленного типа).

Белки иммуноглобулинов по химическому составу относятся к гликопротеидам, так как состоят из протеина и сахаров; построены из 18 аминокислот. Различают 5 классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Иммуноглобулины M, G, A имеют подклассы. Например, IgG имеет четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

**Иммунологическая память** называют способность организма при повторной встрече с одним и тем же антигеном реагировать более активным и более быстрым формированием иммунитета, т.е. реагировать по типу вторичного иммунного ответа.

**Иммунологическая толерантность** явление противоположное иммунологической памяти. В этом случае в ответ на повторное введение антигена организм вместо энергичной выработки иммунитета проявляет ареактивность, не отвечает иммунной реакцией, т. е. толерантен антигену.

## **I. Реакция агглютинации на предметном стекле**

Нанести на предметное стекло на достаточном расстоянии друг от друга три капли: физиологического раствора, брюшнотифозной агглютинирующей сыворотки (№ 1) и дизентерийной агглютинирующей сыворотки (№ 2). Исследуемую культуру внести в каплю физиологического раствора и тщательно растереть в ней до появления выраженного помутнения. Бактериальной петлей подготовленную взвесь перенести в сыворотку № 1 и тщательно перемешать. Далее бактериологическую петлю необходимо простерилизовать прокаливанием. Затем взять бактериальной петлей материал из взвеси культуры в капле физиологического раствора и внести ее в каплю сыворотки № 2. Стекло слегка и осторожно покачивать для тщательного перемешивания. Учет результатов реакции производят спустя 1-2 минуты: в капле физиологического раствора сохраняется равномерное помутнение, тогда как в капле одной из сывороток отмечается агглютинация. Признаками агглютинации являются: выпадение зерен агглютината и просветление жидкости. В случае обнаружения в контрольной капле с физиологическим раствором спонтанной агглютинации результаты реакции не подлежат дальнейшему учету, а сама реакция требует повторной постановки.

## **II. Развернутая реакция агглютинации**

Развернутая реакция агглютинации поставлена с целью определения титра антител в сыворотке крови больного.

Исследуемая сыворотка разводится физиологическим раствором в 50 раз, и полученное таким образом разведение (1:50) считается исходным. Далее исходное разведение сыворотки последовательно двукратно разводится физиологическим раствором. Для этого (см. схему постановки):

- а) во все агглютинационные пробирки, кроме № 6, вносятся по 1,0 мл физиологического раствора;
- б) в пробирку № 1 и № 6 вносится по 1,0 мл сыворотки в исходном разведении 1:50, и, таким образом, сыворотка в пробирке № 1 разводится еще вдвое, то есть в 100 раз;

в) 1,0 мл сыворотки из пробирки № 1 переносится в пробирку № 2 к имеющимся в ней 1,0 мл физиологического раствора, вследствие чего сыворотка разводится еще вдвое, то есть в 200 раз, и так далее, вплоть до пробирки № 5, где разведение достигает 1:1600;

г) очевидно, что в пробирках № 1 -№ 4 содержится по 1,0 мл сыворотки, тогда как в пробирке № 5 содержится 2,0 мл ее — избыточные 1,0 мл удаляются, и, таким образом, объемы в опытных пробирках № 1 — № 5 уравниваются. В пробирке № 6 осуществляется контроль сыворотки. Далее в каждую пробирку, за исключением пробирки № 6, вносят по 2 капли ДИАГНОСТИКУМА — обработанной формалином взвеси в физиологическом растворе клеток культуры *Salmonella typhi*, в каждом миллилитре которой содержится 2 миллиарда бактериальных тел. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  на 2 часа. После выдержки в термостате штатив с реакцией выдерживают при комнатной температуре или «на холоду» ( $+3^{\circ}$   $+5^{\circ}\text{C}$ ) в течение 18 часов.

| Компоненты реакции                  | Опыт      |           |           |           |            | сыворотки | диагностикум а |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|----------------|
|                                     | 1         | 2         | 3         | 4         | 5          | 6         | 7              |
| 1. Физ. Раствор                     | 1,0       | 1,0       | 1,0       | 1,0       | 1,0        | 1,0       | 1,0            |
| 2. Исследуемая сыворотка (1:50); мл | 1,0 1:100 | 1,0 1:200 | 1,0 1:400 | 1,0 1:800 | 1,0 1:1600 | 1,0 1:100 | 1,0            |
| 3. Диагностикум, капли              | 2         | 2         | 2         | 2         | 2          | -         | 2              |

Учет результатов производят через сутки в следующей последовательности: в первую очередь оценивают состояние контрольных пробирок (№6 и №7), во вторую очередь — опытных. В пробирке №6 (контроль сыворотки) должна быть абсолютно прозрачная, лишенная какого-либо осадка жидкость. В пробирке №7 (контроль диагностикума) — равномерное помутнение. Результаты опытных пробирок следует оценивать, начиная с пробирки с наибольшим разведением сыворотки (№5). Результат реакции учитывается по выпадению на дно пробирки хлопьев агглютината и одновременному просветлению содержимого пробирки; при легком постукивании по стенке пробирки или осторожном встряхивании агглютинат легко отделяется от дна, всплывает и, не изменяя своей структуры, возвращается в исходное положение.

### III. Реакция коагуляционной преципитации

Реакция преципитации используется чаще всего для определения наличия в материале растворимых антигенов. В контрольную преципитационную пробирку, приблизительно до половины ее объема вносится нормальная сыворотка. В опытную пробирку вносится то же количество преципитирующей сыворотки. Далее в каждую пробирку вносится небольшое количество исследуемого материала — например, экстракта из шкуры животного (овцы), погибшей предположительно от сибирской язвы. Исследуемый материал следует вносить путем осторожного насаивания на внутреннюю стенку преципитационной пробирки, удерживаемой в руке на высоте 30-35 см от поверхности рабочего стола под углом  $45^{\circ}$  к горизонтали.

В опытной пробирке на границе сыворотки и исследуемого материала наблюдается образование преципитата: белесоватого «диска», необратимо разрушающегося при встряхивании пробирки. В контрольной пробирке образования преципитата не наблюдается.

### IV. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РИГА)

РИГА основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами (эритроцитарный диагностикум), взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных вызывает выпадение эритроцитов в осадок на дно пробирки (лунки) в виде «фаскрытого зонтика».

Исследуемую сыворотку больного разводят в 10 раз и прогревают при  $65^{\circ}\text{C}$  20 минут на водяной бане для удаления неспецифических гемагглютининов, затем готовят ряд ее разведений от 1:100 до 1:3200 и разливают в лунки по 0,5 мл. В каждую лунку добавляют по 0,5 мл диагностикума. В каждый ряд лунок добавляется соответствующий эритроцитарный диагностикум: к шигеллам Зонне, Флекснера, Ньюкастла и поливалентный сальмонеллезный.

Одновременно ставят контроли диагностикумов и контроль исследуемой сыворотки. Результат реакции учитывают после инкубации в термостате в течение 2 часов при  $37^{\circ}\text{C}$  или при комнатной температуре в течение 18-24 часов. Реакция считается положительной при условии расположения эритроцитов в виде «зонтика» по всей поверхности дна лунки и оценивается как «+».

#### Схема постановки

| Разведение исследуемой сыворотки | ДИАГНОСТИКУМЫ | КОНТРОЛЬ |
|----------------------------------|---------------|----------|
|----------------------------------|---------------|----------|

|                                             | Зонне | Флекс-нер | Нью-кастл | Саль-мон. поливал. | Кд 1 | Кд 2 | Кд 3 | Кд 4 | Кс |
|---------------------------------------------|-------|-----------|-----------|--------------------|------|------|------|------|----|
| 1:100                                       |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| 1:200                                       |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| 1:400                                       |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| 1:800                                       |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| 1:1600                                      |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| 1:3200                                      |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| Инкубация при t 37 <sup>0</sup> С; 24 часа. |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |
| Учет результатов                            |       |           |           |                    |      |      |      |      |    |

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какие компоненты участвуют в реакции непрямой гемагглютинации?

- а) антитела, антигены, комплемент;
- б) антитела, антигены, физиологический раствор;
- в) антигены, физиологический раствор;
- г) антигены, эритроциты, антитела, физиологический раствор.

2. Какие компоненты участвуют в реакции преципитации?

- а) корпускулярные антигены, антитела, физиологический раствор;
- б) растворимые антигены, антитела, физиологический раствор;
- в) антигены, антитела, комплемент;
- г) антигены, антитела, эритроциты, физиологический раствор.

3. Какие компоненты участвуют в реакции торможения гемагглютинации?

- а) антигены, антитела, физиологический раствор;
- б) антигены, антитела, комплемент;
- в) корпускулярные антигены, антитела, физиологический раствор;
- г) вирусы, эритроциты, антитела;
- д) бактерии, эритроциты, антитела.

4. Дополнительным компонентом (кроме антигенов и антител), участвующим в реакции агглютинации является:

- а) комплемент сыворотки морской свинки;
- б) изотонический раствор NaCl;
- в) эритроциты;
- г) гемолитическая система.

5. Визуальный результат реакции агглютинации:

- а) гемолиз эритроцитов барана;
- б) задержка гемолиза эритроцитов барана;
- в) просветление мутной среды реакции и образование крупнодисперсного (зернистого) осадка;
- г) помутнение прозрачной среды реакции и образование мелкодисперсной взвеси (флоккулята) или кольца преципитации.

## Лабораторная работа №17

### Тема: Реакции иммунитета с участием комплемента.

#### Реакции иммунитета с мечеными компонентами.

#### Учебная цель:

1. Изучить комплементзависимые серологические реакции,
2. Изучить реакции иммунитета с мечеными компонентами.

#### Студент должен знать:

1. Постановку **реакции** иммунного лизиса.
2. Постановку реакции связывания комплемента (РСК).
3. Постановку реакции иммунитета с мечеными компонентами.

#### Студент должен уметь:

1. Поставить **реакцию** иммунного лизиса.
2. Поставить реакцию связывания комплемента (РСК).
3. Поставить реакцию иммунитета с мечеными компонентами.

#### План занятия:

1. Реакции иммунного лизиса, компоненты.
2. Реакция гемолиза.
3. Реакция связывания комплемента (РСК). Постановка и учет реакции связывания комплемента.
4. Реакция иммунофлюоресценции, прямая и непрямая.
5. Иммуноферментный анализ, компоненты, применение.
6. Радиоиммунный анализ, компоненты, применение.

#### Самостоятельная работа студентов:

1. Постановка и учет реакции связывания комплемента с целью серодиагностики сифилиса

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

#### Принципиальная схема постановки реакции связывания комплемента

| Компоненты реакции                                                       | № пробирки |            |            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|
|                                                                          | 1 (опыт)   | 2 (контр.) | 3 (контр.) |
| 1. Исследуемая сыворотка (1:5)                                           | 0,5        | 0,5        | -          |
| 2. Антиген в рабочей дозе                                                | 0,5        | -          | 0,5        |
| 3. Комплемент в рабочей дозе                                             | 0,5        | 0,5        | 0,5        |
| 4. Физиологический раствор                                               | -          | 0,5        | 0,5        |
| Инкубация при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ — 40 минут.                        |            |            |            |
| 5. Гемолитическая система (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка) | 1,0        | 1,0        | 1,0        |

Инкубация при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  — 40 минут.

Учет результатов \_\_\_\_\_ Гемолиз + Гемолиз +

#### Вывод:

При наличии антител в исследуемой сыворотке (положительная реакция) в опытной пробирке гемолиз отсутствует. При отрицательной реакции (нет антител) во всех трех пробирках наблюдается гемолиз.

Реакция связывания комплемента проходит в две фазы: 1-ая фаза — взаимодействие исследуемой сыворотки с антигеном и комплементом. 2-ая фаза — индикаторная — определение наличия в смеси свободного комплемента путем добавления гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к эритроцитам барана. Если в первой фазе реакции происходит образование комплекса антиген-антитело, комплемент связывается этим комплексом и во второй

фазе гемолиз эритроцитов отсутствует (реакция положительная). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, комплемент в первой фазе реакции остается свободным и во второй фазе реакции присоединяется к комплексу эритроцит-гемолитическая сыворотка, вызывая гемолиз (реакция отрицательная).

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

**Укажите правильные ответы:**

1. Разновидностями реакции иммунного лизиса являются:  
а) гемагглютинация;  
б) гемолиз;  
в) кольцепреципитация;  
г) бактериолиз;  
д) цитолиз.
2. Какие еще компоненты (кроме антигенов и антител) участвуют в реакции связывания комплемента?  
а) бактерии;  
б) комплемент;  
в) эритроциты барана;  
г) гемолитическая сыворотка;  
д) физиологический раствор.
3. При постановке иммуноферментного анализа антитела или антигены метят:  
а) пероксидазой;  
б) флюорохромом;  
в) радиоизотопом;  
г) комплементом.
4. Наиболее современными серологическими реакциями являются:  
а) реакция агглютинации;  
б) реакция связывания комплемента;  
в) иммуноферментный анализ;  
г) полимеразная цепная реакция;  
д) реакция иммунофлюоресценции.
5. Выявить наличие характерного для определенного микроорганизма участка нуклеиновой кислоты в исследуемом материале и многократно размножить его позволяет:  
а) иммуноферментный анализ;  
б) полимеразная цепная реакция;  
в) радиоиммунный анализ;  
г) реакция иммунофлюоресценции.

### **Лабораторная работа №18**

**Тема: Вакцины. Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины.**

**Сдача модуля: «Учение об инфекции. Медицинская иммунология. Реакции иммунитета. Иммунобиологические препараты».**

**Учебная цель:** изучить иммунобиологические препараты и их основные группы: вакцины, иммуноглобулины, лечебно-профилактические сыворотки.

**Студент должен знать:**

1. Современную классификацию вакцин.
2. Получение и применение вакцин.
3. Принцип и механизм действия вакцин.
4. Получение и применение иммунных сывороток и иммуноглобулинов.

5. Календарь прививок РФ.

**Студент должен уметь:**

1. В лабораторных условиях приготовить вакцину.

**План занятия:**

1. Вакцины, способы получения.
2. Классификация вакцин, адъюванты, применение вакцин.
3. Иммуноглобулины, получение, применение.
4. Лечебно-профилактические сыворотки, получение, классификация. Практическое применение.
5. Демонстрация вакцин, лечебно-профилактических сывороток, иммуноглобулинов.
6. Сдача модуля.

**Самостоятельная работа**

1. Ознакомление с демонстрационными препаратами (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, диагностикумы).
2. Изучение аннотации по применению вакцин, иммуноглобулинов, лечебно-профилактических сывороток.
3. Записать в тетрадь этапы приготовления вакцины.

**ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:**

Вакцины-препараты, получаемые из микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности; применяются для активной иммунизации людей и животных с профилактической и лечебной целями. Вакцины состоят из действующего начала — специфического антигена; консерванта для сохранения стерильности (в неживых В.); стабилизатора, или протектора, для повышения сроков сохраняемости антигена; неспецифического активатора (адъюванта), или полимерного носителя, для повышения иммуногенности антигена (в химических, молекулярных вакцинах). Специфические антигены, содержащиеся в В., в ответ на введение в организм вызывают развитие иммунологических реакций, обеспечивающих устойчивость организма к патогенным микроорганизмам. В качестве антигенов при конструировании В. используют: живые ослабленные (аттенуированные) микроорганизмы; неживые (инактивированные, убитые) цельные микробные клетки или вирусные частицы; извлеченные из микроорганизмов сложные антигенные структуры (протективные антигены); продукты жизнедеятельности микроорганизмов — вторичные метаболиты (например, токсины, молекулярные протективные антигены); антигены, полученные путем химического синтеза или биосинтеза с применением методов генетической инженерии.

В соответствии с природой специфического антигена В. делят на живые, неживые и комбинированные (как живые, так и неживые микроорганизмы и их отдельные антигены). Живые В. получают из дивергентных (естественных) штаммов микроорганизмов, обладающих ослабленной вирулентностью для человека, но содержащих полноценный набор антигенов (например, вирус коревой оспы), и из искусственных (аттенуированных) штаммов микроорганизмов. К живым В. можно отнести также векторные В., полученные генно-инженерным способом и представляющие собой вакцинный штамм, несущий ген чужеродного антигена (например, вирус оспенной вакцины со встроенным антигеном вируса гепатита В).

Неживые В. подразделяют на молекулярные (химические) и корпускулярные. Молекулярные В. конструируют на основе специфических протективных антигенов, находящихся в молекулярном виде и полученных путем биосинтеза или химического синтеза. К этим В. можно отнести также анатоксины, которые представляют собой обезвреженные формалином молекулы токсинов, образуемых микробной клеткой (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.). Корпускулярные В. получают из цельных микроорганизмов, инактивированных физическими (тепло, ультрафиолетовое и другие излучения) или химическими (фенол, спирт) методами (корпускулярные, вирусные и бактериальные вакцины), или из субклеточных над-молекулярных антигенных структур, извлеченных из микроорганизмов (субвирионные вакцины, сплит-вакцины, вакцины из сложных антигенных комплексов).

Молекулярные антигены, или сложные протективные антигены бактерий и вирусов, используют для получения синтетических и полусинтетических вакцин, представляющих собой комплекс из специфического антигена, полимерного носителя и адъюванта. Из отдельных В. (моновакцин), предназначенных для иммунизации против одной инфекции, готовят сложные препараты, состоящие из нескольких моновакцин. Такие ассоциированные вакцины, или поливакцины, поливалентные вакцины обеспечивают иммунитет одновременно против нескольких инфекций. Примером может служить ассоциированная АКДС-вакцина, в состав которой входят адсорбированные дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшный корпускулярный антиген. Существует также семейство полианатоксинов: ботулинический пентаанатоксин, противогангренозный тетраанатоксин, дифтерийно-столбнячный дианатоксин. Для профилактики

полиомиелита применяют единый поливалентный препарат, состоящий из аттенуированных штаммов I, II, III серотипов (сероваров) вируса полиомиелита.

Насчитывается около 30 вакцинных препаратов, применяемых с целью профилактики инфекционных болезней; примерно половина из них живые, остальные инаktivированные. Среди живых В. выделяют бактериальные — сибиреязвенную, чумную, туляремию, туберкулезную, против Ку-лихорадки; вирусные — оспенную, коревую, гриппозную, полиомиелитную, паротитную, против желтой лихорадки, краснухи. Из неживых В. применяют коклюшную, дизентерийную, брюшнотифозную, холерную, герпетическую, сыпнотифозную, против клещевого энцефалита, геморрагических лихорадок и другие, а также анатоксины — дифтерийный, столбнячный, ботулинический, газовой гангрены.

Основным свойством В. является создание активного поствакцинального иммунитета, который по своему характеру и конечному эффекту соответствует постинфекционному иммунитету, иногда отличаясь от него лишь количественно. Вакцинальный процесс при введении живых В. сводится к размножению и генерализации аттенуированного штамма в организме привитого и вовлечению в процесс иммунной системы. Хотя по характеру поствакцинальных реакций при введении живых В. вакцинальный процесс и напоминает инфекционный, однако он отличается от него своим доброкачественным течением.

Вакцины при введении в организм вызывают ответную иммунную реакцию, которая в зависимости от природы иммунитета и свойств антигена может носить выраженный гуморальный, клеточный или клеточно-гуморальный характер.

Эффективность применения В. определяется иммунологической реактивностью, зависящей от генетических и фенотипических особенностей организма, от качества антигена, дозы, кратности и интервала между прививками. Поэтому для каждой В. разрабатывают схему вакцинации. Живые В. обычно используют однократно, неживые — чаще двукратно или трехкратно. Поствакцинальный иммунитет сохраняется после первичной вакцинации 6—12 мес. (для слабых вакцин) и до 5 и более лет (для сильных вакцин); поддерживается периодическими ревакцинациями. Активность (сила) вакцины определяется коэффициентом защиты (отношением числа заболеваний среди непривитых к числу заболевших среди привитых), который может варьировать от 2 до 500. К слабым вакцинам с коэффициентом защиты от 2 до 10 относятся гриппозная, дизентерийная, брюшнотифозная и др., к сильным с коэффициентом защиты от 50 до 500 — оспенная, туляреминая, против желтой лихорадки и др.

В зависимости от способа применения В. делят на инъекционные, пероральные и ингаляционные. В соответствии с этим им придается соответствующая лекарственная форма: для инъекций применяют исходные жидкие или регидратированные из сухого состояния В.; пероральные В. — в виде таблеток, конфет (драже) или капсул; для ингаляций используют сухие (пылевые или регидратированные) вакцины. В. для инъекций вводят подкожно (скарификация), подкожно, внутримышечно.

Наиболее просты в изготовлении живые В., так как технология в основном сводится к выращиванию аттенуированного вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами (микоплазмы, онковирусы) с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата. Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные среды) в аппаратах — ферментаторах емкостью от 0,1 м<sup>3</sup> до 1—2 м<sup>3</sup>. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов. Вирусные и риккетсиозные живые В. получают выращиванием вакцинного штамма в эмбрионах кур или перепелов, свободных от вирусов лейкоза, либо в культурах клеток, лишенных микоплазм. Используют или первично-трипсинизированные клетки животных или перевиваемые диплоидные клетки человека. Живые аттенуированные штаммы бактерий и вирусов, применяемые для приготовления живых В., получают, как правило, из природных штаммов путем их селекции или пассажей через биологические системы (организм животных, эмбрионы кур, культуры клеток, питательные среды).

В связи с успехами генетики и генетической инженерии появились возможности целенаправленного конструирования вакцинных штаммов. Получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа, а также штаммы вируса вакцины со встроенными генами протективных антигенов вируса гепатита В. Инаktivированные корпускулярные бактериальные В. или целновирсионные инаktivированные В. получают соответственно из культур бактерий и вирусов, выращенных на тех же средах накопления, что и в случаях получения живых вакцин, и затем подвергнутых инаktivации нагреванием (гретые вакцины), формалином (формолвакцины), ультрафиолетовым излучением (УФ-вакцины), ионизирующим излучением (радиовакцины), спиртом (спиртовые вакцины). Инаktivированные В. ввиду недостаточно высокой иммуногенности и повышенной реактогенности не нашли широкого применения.

Производство молекулярных В. — более сложный технологический процесс, т.к. требует извлечения из выращенной микробной массы протективных антигенов или антигенных комплексов, очистки и концентрирования антигенов, введения в препараты адъювантов. Выделение и очистка антигенов с помощью традиционных методов (экстракции трихлоруксусной кислотой, кислотного или щелочного гидролиза, ферментативного гидролиза, высаливания нейтральными солями, осаждения спиртом или ацетоном) сочетаются с применением современных методов (скоростного ультрацентрифугирования, мембранной ультрафильтрации, хроматографического разделения, аффинной хроматографии, в т.ч. на моноклональных антителах). С помощью этих приемов удается получать антигены высокой степени очистки и

концентрирования. К очищенным антигенам, стандартизированным по числу антигенных единиц, с целью повышения иммуногенности добавляют адъюванты, чаще всего сорбенты-гели (гидрат окиси алюминия и др.). Препараты, в которых антиген находится в сорбированном состоянии, называют сорбированными или адсорбированными (дифтерийный, столбнячный, ботулинический сорбированные анатоксины). Сорбент играет роль носителя и адъюванта. В качестве носителя в синтетических вакцинах предложены всевозможные полимеры.

Интенсивно разрабатывается генно-инженерный способ получения протективных белковых антигенов бактерий и вирусов. В качестве продуцентов используют обычно эшерихии, дрожжи, псевдомонады со встроенными в них генами протективных антигенов. Получены рекомбинантные штаммы бактерий, продуцирующие антигены возбудителей гриппа, коклюша, кори, герпеса, гепатита В, бешенства, ящура, ВИЧ-инфекции и др. Получение протективных антигенов генно-инженерным способом целесообразно в том случае, когда выращивание микробов связано с большими трудностями или опасностями, или когда трудно извлекать антиген из микробной клетки. Принцип и технология получения В. на основе генно-инженерного способа сводятся к выращиванию рекомбинантного штамма, выделению и очистке протективного антигена, конструированию конечного препарата.

Препараты В., предназначенные для иммунизации людей, проверяют на безвредность, реактогенность и иммуногенность. Безвредность включает проверку на лабораторных животных и других биологических системах токсичности, пирогенности, стерильности, аллергенности, тератогенности, мутагенности препарата В. Реактогенность, т.е. побочные местные и общие реакции на введение В., оценивают на животных и при прививках людей. Иммуногенность проверяют на лабораторных животных и выражают в иммунизирующих единицах, т.е. в дозах антигена, защищающих 50% иммунизированных животных, зараженных определенным числом инфицирующих доз патогенного микроба или токсина. В противоэпидемической практике эффект вакцинации оценивают по соотношению инфекционной заболеваемости в привитых и непривитых коллективах. Контроль В. осуществляют на производстве в отделах бактериологического контроля и в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасовича по разработанной и утвержденной МЗ СССР нормативно-технической документации.

Вакцинопрофилактика занимает значительное место в борьбе с инфекционными болезнями. Благодаря вакцинопрофилактике ликвидирована оспа, сведена к минимуму заболеваемость полиомиелитом, дифтерией, резко снижена заболеваемость корью, коклюшем, сибирской язвой, туляремией и другими инфекционными болезнями. Успехи вакцинопрофилактики зависят от качества вакцин и своевременного охвата прививками угрожаемых контингентов. Большие задачи стоят по совершенствованию В. против гриппа, бешенства, кишечных инфекций и других, а также по разработке В. против сифилиса, ВИЧ-инфекции, сапа, мелиоидоза, болезни легионеров и некоторых других. Современные иммунология и вакцинопрофилактика подвели теоретическую базу и наметили пути совершенствования В. в направлении создания очищенных поливалентных адъювантных синтетических В. и получения новых безвредных эффективных живых рекомбинантных вакцин.

### Тестовый контроль.

1. Диагностикумы — это стандартные препараты, которые:

- а) не обладают патогенностью
- б) не обладают антигенностью
- в) являются эндотоксинами
- г) получают из чистых культур микроорганизмов определенных видов или их антигенов
- д) сохраняют антигенные свойства

2. Что содержат диагностические сыворотки?

- а) известные антигены
- б) известные антитела
- в) эритроциты
- г) микроорганизмы

3. Что содержат диагностикумы?

- а) известные антитела
- б) известные антигены
- в) комплемент
- г) иммуноглобулины

3. Составьте логические пары: вопрос-ответ

- а) АКДС
  - б) Секстаанатоксин
  - в) Тетраанатоксин
  - г) АДС-М
  - д) Противогангренозная сыворотка
- 1. Столбняк
  - 2. газовая гангрена

3. Оба

4. Ни то, ни другое

4. Иммунологические препараты для профилактики и лечения ботулизма:

а) антитоксическая сыворотка

б) АКДС

в) тетраанатоксин

г) АДС.

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

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ  
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

***ВЕСЕННИЙ СЕМЕСТР***

**Владикавказ**

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ** (возбудители кишечного эшерихиоза, кишечного иерсиниоза).

**Учебная цель:** обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

#### **Студент должен знать:**

- 1.Морфологию представителей кишечной группы.
2. Бактериологический метод исследования кишечного эшерихиоза, кишечного иерсиниоза.
3. Окраску по Граму.
4. Специфическую профилактику кишечных заболеваний.

#### **Студент должен уметь:**

1. Приготовить и окрасить мазок по методу Грама.
- 2.Сделать посев исследуемого материала на дифференциально-диагностическую среду Эндо.

#### **ПЛАН:**

- 1.Таксономия и основные биологические свойства возбудителей кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.
- 2.Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
- 3.Принципы микробиологической диагностики кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.
- 4.Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

#### **Бактериологический метод исследования**

Выделение чистой культуры из исследуемого материала (испражнения больного).

- 1.Посев исследуемого материала на дифференциально- диагностическую среду Эндо (демонстрация).
- 2.Учет результатов посева исследуемого материала на среду Эндо. Отбор "подозрительных" колоний и их изучение на среде Эндо, макроскопическая характеристика колоний (демонстрация).
- 3.Высев "подозрительных колоний" на среду Ресселя и МПБ.
- 4.Оформление протокола исследования.

### **ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ**

| №№<br>П/П | Исследуемый материал | Результаты<br>исследования | Графическое<br>изображение |
|-----------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
|           |                      |                            |                            |

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

В связи с трудностью дифференциации возбудителей кишечных заболеваний, вызывающих сходные клинические проявления, необходимо проведение комплексного микробиологического исследования, включающего одновременный поиск в исследуемом материале возбудителей эшерихиозов, шигеллезов, сальмонеллезов и холеры.

1. Исследуемый материал (испражнения больного) засевают на поверхность одной из дифференциально-диагностических сред для выделения возбудителя кишечных заболеваний (среду Эндо) и 1 %щелочной агар для выделения возбудителя холеры.

Посев проводится штрихом на поверхности плотной питательной среды с целью механического разъединения микробов и получения изолированных колоний.

Чашки с 1 % щелочным агаром инкубируют при 37 град. 10-12 часов, чашки со средой Эндо - 18-24 часа.

2. После инкубации в термостате посева на чашках со средами Эндо и 1 % щелочном агаре просматривают в проходящем и преломляющем свете. При отсутствии каких-либо признаков роста микробов

на щелочном агаре, дается отрицательный ответ в отношении нахождения возбудителя холеры в исследуемом материале.

На среде Эндо через 18-24 ч. роста в термостате отмечается наличие колоний малиново-красных (ферментирующих лактозу, входящую в состав среды) и бесцветных (не ферментирующих лактозу).

3. Бесцветные ("подозрительные") колонии высевает на среду Ресселя. Состав среды Ресселя: МПА, 1 % лактозы, 0.1 % глюкозы и индикатор Андрее.

Посев производится следующим образом: снятую колонию осторожно, не задевая края пробирки, вносят в конденсационную жидкость, затем штрихами засевают всю скошенную поверхность среды и делают укол в глубину столбика. Пробирку с посевом на среде Ресселя ставят в термостат (37°C) на сутки (18-24 ч.).

Одновременно для изучения протеолитической активности культуры лактозонегативные колонии высевает в пробирку с МПБ с индикаторными бумажками, пропитанными ацетатом свинца и щавелевой кислотой для определения образования сероводорода и индола. Пробирку помещают в термостат (37°C, 18-24 ч.)

**Эшерихиоз (кишечная колиинфекция)** — острая кишечная инфекция, вызванная различными серологическими группами энтеропатогенных кишечных палочек (ЭПКП), протекающая с симптомами общей интоксикации и синдромом поражения желудочно-кишечного тракта.

Этиология эшерихиоза.

Возбудители — энтеропатогенные кишечные палочки — принадлежат к виду *Escherichia*, роду *Escherichia*, семейству *Enterobacteriaceae*, представляют собой грамотрицательные палочки, устойчивые во внешней среде. Могут месяцами сохраняться в почве, воде, испражнениях. Хорошо растут на обычных питательных средах. Быстро погибают при кипячении и воздействии дезинфицирующих средств. Эшерихии имеют сложную антигенную структуру: соматический О-антиген (термостабильный), поверхностный (капсульный) К-антиген и жгутиковый Н-антиген (термолабильный).

Кишечные инфекции, вызванные ЭПКП, встречаются чаще у детей раннего возраста

Классификация эшерихиозов:

- Энтеропатогенный (сальмонеллезоподобный).
- Энтеротоксический (холероподобный).
- Энтероинвазивный (дизентериеподобный).
- Энтерогеморрагический.

Диагноз эшерихиоза может быть установлен только при выделении возбудителя. Для бактериологического исследования отбирают фекалии, рвотные массы, промывные воды желудка, при генерализованных формах — кровь, СМЖ. Проводить исследование испражнений нужно сразу же, как только больной обратился за помощью к врачу, так как с течением времени вероятность выделения возбудителя быстро снижается. Сбор испражнений проводится после естественной дефекации или с помощью тампонов в пробирки с глицериновой смесью в количестве не более 1/3 объема консерванта, а рвотных масс и промывных вод желудка — в стеклянные баночки емкостью 200-250 мл. В лечебном учреждении должно быть проведено не менее трех диагностических исследований (первое — при поступлении больного до назначения ему антибиотиков, химиопрепаратов).

С целью выделения ЭПКП и ЭТКП следует отбирать пробы испражнений из последних порций, при исследовании ЭИКП — пробы с примесью слизи.

Отобранный материал в течение первых 2 ч доставляют в лабораторию, если это невозможно — помещают в холодильник и направляют в лабораторию не позднее 12 ч после забора.

При решении вопроса об этиологической роли возбудителя при возникновении кишечной инфекции необходимо учитывать следующие критерии:

- выделение эшерихий определенных сероваров, относящихся к ЭПКП, ЭИКП, ЭТКП, ЭГКП или ЭАКП, в монокультуре в сочетании с непатогенными сероварами эшерихий; если эшерихия патогенна, диагноз может быть установлен по одному положительному бакпосеву;
- массивное выделение ЭТКП (10<sup>6</sup>/г фекалий и более) и значительное их преобладание над представителями другой условно-патогенной флоры.

Определенное диагностическое значение имеют серологические методы исследований, хотя они и менее информативны, неубедительны, так как возможны ложноположительные результаты из-за антигенного сходства с другими энтеробактериями. Используются для ретроспективной диагностики, особенно во время вспышки. В настоящее время из серологических методов исследования используют РНГА (диагностический титр 1:200 — 1:400 для взрослых, 1:40 — 1:80 для детей); реакцию иммунофлуоресценции; реакцию иммунной сорбции антител, меченных ферментами; реакцию нейтрализации; реакцию агглютинации с аутокультурой при нарастании титра антител в 4 и более раз в динамике заболевания.

Перспективным методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Чтобы доказать патогенность эшерихии, нужно убедиться, что она имеет рецепторы, обеспечивающие адгезивность, может продуцировать термолабильный и термостабильный токсины, содержит плазмидную ДНК, кодирующую токсинобразование (Протасов С.А., 2003).

Если выделяются непатогенные эшерихии, надо подходить к диагностике как к таковой при других ОКИ, вызванных условно-патогенной флорой: трехкратный массивный рост микроорганизма, отсутствие высева патогенных возбудителей.

Диагноз «эшерихиоз», как отмечалось, неправомерен без бактериологического, а также серологического подтверждения. Исключение составляет клинико-эпидемиологическое обоснование диагноза.

Инструментальные методы обследования (ректороманоскопия, колоноскопия) при эшерихиозах малоинформативны.

При оформлении заключительного диагноза указывается вид выделенного возбудителя, синдром поражения пищеварительного тракта, степень тяжести заболевания. При затяжном течении отмечается также характер течения болезни. Например: эшерихиоз (*E. coli* O111) в форме острого гастроэнтерита, средней степени тяжести.

Диагноз бактерионосительства может быть установлен только в тех случаях, когда клинические симптомы заболевания отсутствуют в настоящее время и не отмечались в предыдущие 1-1,5 мес. Бактерионосительство, как правило, кратковременное (1-2-кратное выделение возбудителя). В таких случаях при оформлении диагноза указывается только вид возбудителя. Например: бактерионоситель энтеропатогенных эшерихий O125.

Этиология. Возбудитель (*Yersinia enterocolica*) - грамотрицательная палочка, анаэроб, хорошо растет на обычных питательных средах при низких температурах. Известно 30 сероваров. Заболевание у человека чаще вызывают 3-й, 5-й, 8-й и 9-й серовары.

### **Кишечный иерсиниоз.**

*Эпидемиология.* Источником инфекции являются человек и животные, больные и носители. Особенно часто возбудитель обнаруживается у мышевидных грызунов, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек, в молочных продуктах, мороженом. Заражение человека происходит через рот при употреблении инфицированной пищи, воды или контактным путем.

Заболевание встречается в течение всего года.

*Патогенез.* Возбудитель размножается в тонком кишечнике, вследствие чего развивается энтероколит или гастроэнтероколит. В тяжелых случаях в области терминального отдела тонкой кишки возникает язвенный процесс с вовлечением мезентериальных лимфатических узлов. При проникновении возбудителя в кровь отмечаются бактериемия и генерализация процесса с развитием воспаления в органах.

*Клиника.* Инкубационный период — 2-3 дня. Клиническая симптоматика у больных практически не отличается от таковой при псевдотуберкулезе. Однако необходимо иметь в виду, что при кишечном иерсиниозе заболевание часто начинается с кишечных расстройств (обильный водянистый стул с примесью крови), а поражение внутренних органов возникает как бы вторично на высоте клинических проявлений и чаще в тяжелых случаях.

*В диагностике кишечного иерсиниоза* ведущую роль играют бактериологический и серологический методы исследования. *Yersinia enterocolica* можно выделить из кала, мочи, гноя, слизи из зева, лимфатического узла. Из методов серологической диагностики используют реакцию агглютинации и реакцию непрямой гемагглютинации. Диагностический титр 1:100 и выше. Более достоверно нарастание титра специфических антител в динамике заболевания.

Профилактика кишечного иерсиниоза проводится так же, как при других кишечных инфекциях. Специфическая профилактика не разработана.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ**

1. У 2-х летнего ребенка высокая температура, понос, резко выраженная интоксикация. Как надо провести бактериологическое исследование для постановки диагноза?

2. При проведении бактериологического исследования испражнений больного с клиническим диагнозом - колиэнтерит, на чашках со средой Эндо выросли колонии красного цвета типичные для кишечной палочки. Как решить вопрос патогенные это кишечные палочки или нет?

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2**

#### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

*(возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов).*

**Учебная цель:** обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

**Студент должен знать:**

1. Морфологию представителей кишечной группы.
2. Бактериологический метод диагностики сальмонеллеза (пищевой токсико-инфекции).
3. Бактериологический метод диагностики брюшного тифа.
4. Бактериологическое исследование гемокультуры больного с клиническим диагнозом «брюшной тиф» и идентификацию выделенной культуры по антигенным и биохимическим признакам. Определение фаготипа и чувствительности возбудителя к антибиотикам.
5. Интерпретацию результатов серологических реакций (реакции Виделя и др.).

**Студент должен уметь:**

1. Приготовить и окрасить мазок по методу Грама.
2. Посеять исследуемый материал на дифференциально-диагностическую среду Эндо, висмут-сульфитный агар.
3. Провести учет результатов реакции Видаля.
4. Оформить протокол исследования.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей брюшного тифа, сальмонеллез.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики брюшного тифа, сальмонеллез.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики брюшного тифа, сальмонеллез.

***САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА***

1. Учет результатов на дифференциально-диагностическую среду Эндо, висмут-сульфитный агар (демонстрация).
2. Учет результатов на среде Ресселя и МПБ.
3. Учет результатов реакции Видаля.

***МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ***

**Брюшной тиф** — острая циклически протекающая кишечная антропонозная инфекция, вызываемая бактериями *Salmonella typhi* (*Salmonella enterica* серотип *typhi*), с алиментарным путем передачи (фекально-оральный), характеризующаяся лихорадкой, явлениями общей интоксикации с развитием тифозного статуса, розеолезными высыпаниями на коже, гепато- и спленомегалией и специфическим поражением лимфатической системы нижнего отдела тонкой кишки.

Возбудитель — *Salmonella typhi* из семейства Enterobacteriaceae рода *Salmonella*, подвижная грамотрицательная палочка с закругленными концами, хорошо окрашиваемая всеми анилиновыми красителями. Вырабатывает эндотоксин, патогенный только для человека. Не образует споры.

Бактерии брюшного тифа довольно устойчивы во внешней среде: в пресной воде водоемов они сохраняются до месяца, на овощах и фруктах — до 10 дней, а в молочных продуктах могут размножаться и накапливаться.

Под воздействием 3 % раствора хлорамина, 5 % раствора карболовой кислоты, сулемы (1:1000), 96 % этилового спирта они гибнут через несколько минут.

Сальмонеллы брюшного тифа имеют сложную антигенную структуру. Различные серовары содержат характерный набор антигенных факторов, которые складываются из сочетания О- и Н-антигенов.

Лабораторная диагностика прежде всего заключается в бактериологическом исследовании крови, кала, мочи, желчи. Метод гемокультуры можно использовать с первых дней заболевания и до конца лихорадочного периода, желательно до начала лечения. Для этого 5-10 мл крови из локтевой вены у постели больного засевают на 20 % желчный бульон или среду Рапопорта, мясопептонный бульон с 1 % глюкозы, либо даже в стерильную дистиллированную воду. Объем среды — 50-100 мл. Соотношение материала и среды должно быть 1:10. Кал, мочу, дуоденальное содержимое исследуют со 2-й недели от начала заболевания, засевают на среды Плоскирева, Левина, Мюллера и др. Предварительный результат этих исследований получают через 2 дня, окончательный — через 4 дня.

Для выявления брюшной тифозной палочки в фекалиях, моче, дуоденальном содержимом используют РИФ с мечеными сыворотками к О- и Vi-антигенам. Предварительный ответ может быть получен в течение 1 ч, окончательный — через 5-20 ч.

Из серологических методов используют РА (Видаля) и РПГА с цистеином. Реакцию Видаля ставят с Н- и О-антигенами с 7-9-го дня заболевания повторяют на 3-4-й неделе для определения нарастания титра (от 1:200 до 1:400-1:800-1:1600). Последнее имеет значение для исключения положительного результата реакции, который может быть обусловлен предшествовавшей иммунизацией против брюшного тифа. Ответ может быть получен через 18-20 ч. При постановке РПГА учет результатов проводят после инкубирования пластин при 37° С в течение 1,5-2 ч и повторно — через 24 ч нахождения при комнатной температуре. Положительный считается реакция в титре 1:40 и выше.

**Сальмонеллёзы** — острые кишечные инфекции животных и человека, вызываемые сальмонеллами. Острое инфекционное зооантропонозное заболевание, вызываемое сальмонеллами и характеризующееся, в общем случае, развитием интоксикации и поражением желудочно-кишечного тракта.

Сальмонеллёзы у человека рассматривают как определённое заболевание (нозологическую форму), отличая его от брюшного тифа и паратифов. Основным источником инфекции — пищевые продукты, реже-

больное животное, в отдельных случаях источником заражения может быть человек (больной или бактерионоситель). Заражение происходит через инфицированные пищевые продукты, как правило, животного происхождения (мясо и мясные продукты, молоко, яйца, особенно утиные и гусиные), при вынужденном, неправильном убою животных, нарушении правил хранения и приготовления продуктов (соприкосновение готовой и сырой продукции, недостаточная термическая обработка продуктов перед употреблением и т. д.). Сальмонеллёзы развиваются в тех случаях, когда в организм попадают накопившиеся в продуктах живые сальмонеллы.

На территории РФ наиболее часто встречаются следующие серовары вида *Salmonella enterica* подвид *enterica*: *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Infantis*.

Клинические проявления сальмонеллёзов разнообразны — от бессимптомного носительства возбудителя инфекции до тяжёлых септических форм. Инкубационный период колеблется от 2—6 часов до 2—3 суток.

Различают несколько клинических форм сальмонеллёза:

1. Желудочно-кишечная форма
2. Тифоподобная форма
3. Септическая форма

В 15—17 % случаев сальмонеллёзов в периоде реконвалесценции наблюдается кратковременное бактерионосительство. Возможны «транзитное» носительство (однократное выделение сальмонелл без клинических проявлений) и хроническое бактерионосительство.

*Диагностика* сальмонеллёза осуществляется комплексно с учетом эпидемиологических данных, симптоматики и результатов лабораторных исследований, направленных на изоляцию и типирование возбудителя. Основным способом типирования сальмонелл является реакция агглютинации. Для ее проведения до недавнего времени пользовались гипериммунными сыворотками, но в настоящее время им на смену пришли моноклональные антитела к сальмонеллам.

*Профилактика.*

Ветеринарно-санитарный надзор за убоем скота и обработкой туш; выполнение санитарных правил приготовления, хранения и реализации пищевых продуктов; обследование поступающих на работу на предприятия общественного питания и торговли, детские учреждения.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ**

1. Больной из эпид. очага брюшного тифа. Жалобы: высокая температура, головные боли, кашель, боли в животе. Каким лабораторным методом надо воспользоваться для уточнения диагноза? На какой день будет дан ответ? Положительные или отрицательный? Давность заболевания 2 дня.
2. От больного получена гемокультура, которая по морфологическим, культурным, биохимическим свойствам соответствует возбудителю брюшного тифа. Реакция агглютинации с диагностической сывороткой дает отрицательную реакцию. Ваше решение?
3. Как поставить микробиологический диагноз брюшного тифа у больного с подозрением на это заболевание? Давность заболевания 5 дней.
4. Каковы особенности бактерионосительства при брюшном тифе? Какие серологические реакции используются для подтверждения хронического бактерионосительства?

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3**

#### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители шигеллеза, холеры).**

#### **Цель занятия:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

#### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику холеры.
2. Биологические свойства и лабораторную диагностику дизентерии.
3. Экспресс диагностику холеры.
4. Специфическую профилактику холеры и дизентерии.

#### **Студент должен уметь:**

1. Провести учет и интерпретацию результата экспресс-диагностики холеры.
2. Провести бактериологическую диагностику дизентерии: сделать посев на

дифференциально-диагностическую среду Плоскирева.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей шигеллеза, холеры.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики шигеллеза, холеры.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики шигеллеза, холеры.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Учет результатов экспресс-диагностики холеры (демонстрация).
2. Учет результатов посева на дифференциально-диагностической среде Плоскирева (макро- и микроскопическое исследования).

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Шигеллёзы** — сборная группа инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями рода шигелл (*Shigella*).

Дизентерия — шигеллёз, протекающий с явлениями интоксикации и преимущественным поражением дистального отдела толстой кишки.

*Этиология.*

Возбудители — грамтрицательные неподвижные (родовой признак) бактерии рода *Shigella* семейства *Enterobacteriaceae*.

*Эпидемиология.*

Источник инфекции — больные лица и бактерионосители. Шигеллёз регистрируют в течение всего года с подъёмом заболеваемости в тёплый сезон.

*Механизмы передачи* — фекально-оральный и контактно-бытовой, через воду, пищевые продукты. Определённую роль в распространении инфекции играют насекомые-переносчики: мухи, тараканы.

Инфицирующая доза составляет 200—300 живых клеток, что обычно достаточно для развития заболевания.

Инкубационный период длится 1—7 дней.

*Патогенез шигеллеза.* Входными воротами инфекции является кишечник, где происходит размножение шигелл. Инвазия шигелл происходит преимущественно в энтероциты дистального отдела толстой кишки, что приводит к разрушению энтероцитов, развитию местных воспалительных изменений в виде отека, гиперемии, эрозии, поверхностных изъязвлений. Эндотоксины шигелл, попадая в кровь, вызывают общую интоксикацию, вплоть до развития эндотоксического шока, нарушение всех видов обмена веществ — белкового, жирового, водно-солевого, с развитием эксикоза различной степени.

*Лечение*

Этиотропное (воздействие на возбудителя) лечение производится препаратами:

препараты нитрофуранового ряда (фуразолидон, фурадонин),

хинолины (хлорхинальдон),

фторхинолоны (ципрофлоксацин).

Патогенетическое лечение состоит в дезинтоксикационной терапии изотоническими солевыми растворами (раствор Рингера), энтеросорбентами (энтеросорб, Активированный уголь, Полифепан, Смекта), а так же витаминотерапии. Проводят коррекцию дисбактериоза.

*Лабораторная диагностика шигеллеза.*

1. Общий анализ крови. Выявляют лейкоцитоз, нейтрофильный сдвиг влево, повышенную СОЭ; степень изменений обычно соответствует тяжести состояния.

2. Бактериологический метод. Материалом для исследования служат испражнения больного и рвотные массы. Используют дифференциально-диагностические среды (Плоскирева, Эндо или Левина).

3. Серологический метод. Исследуют парные сыворотки в РПГА с эритроцитарным диагностикумом для обнаружения антител и нарастания их титра.

Минимальным условно-диагностическим титром антител к диагностикуму шигелл Флекснера для детей до 3-х лет считают реакцию в разведении 1:100, для остальных диагностикумов 1:200 или 4-х кратное нарастание титра антител в динамике болезни.

4. Применяют также иммунофлюоресцентный метод, позволяющий обнаружить антиген в фекалиях, моче, крови; реакцию нарастания титра фага (РНФ), реакцию нейтрализации антител (РНА), иммуноферментный метод (ИФА) и иммунорадиометрический анализ (ИРА).

5. Копроцитологическое исследование проводят с первых дней болезни. При микроскопическом исследовании учитывают повышенное количество лейкоцитов, эритроцитов, клеток кишечного эпителия, наличие крахмала, жира и продуктов его расщепления, цисты простейших, яйца глистов.

**Холера** (лат. *cholera* (греч. *cholera*, от *cholē* желчь + *gheō* течь, истекать)) — острая кишечная антропонозная инфекция, вызываемая бактериями вида *Vibrio cholerae*. Характеризуется фекально-оральным механизмом заражения, поражением тонкого кишечника, водянистой диареей, рвотой, быстрой потерей организмом жидкости и электролитов с развитием различной степени обезвоживания вплоть до

гиповодемического шока и смерти.

**Этиология.** Известно более 150 серогрупп *Vibrio cholerae*; их разделяют на агглютинирующиеся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae* O1) и на не агглютинирующиеся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae* non O1).

«Классическая» холера вызывается холерным вибрионом серогруппы O1 (*Vibrio cholerae* O1). Различают два биовара (биотипа) этой серогруппы: классический (*Vibrio cholerae* biovar cholerae) и Эль-Тор (*Vibrio cholerae* biovar eltor).

По морфологическим, культуральным и серологическим характеристикам они сходны: короткие изогнутые подвижные палочки, имеющие жгутик, грамотрицательные аэробы, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, спор и капсул не образуют, растут на щелочных средах (pH 7,6-9,2) при температуре 10-40 °С. Холерные вибрионы Эль-Тор в отличие от классических способны гемолизировать эритроциты барана (не всегда).

Каждый из этих биотипов по О-антигену (соматическому) подразделяется на серотипы. Серотип Инаба (Inaba) содержит фракцию С, серотип Огава (Ogawa) — фракцию В и серотип Гикошима (правильнее Гикосима) (Hikojima) — фракции А, В и С. Н-антиген холерных вибрионов (жгутиковый) — общий для всех серотипов. Холерные вибрионы образуют холерный токсин — белковый энтеротоксин.

*Vibrio cholerae* non-O1 вызывают различной степени тяжести холероподобную диарею, которая также может закончиться летальным исходом.

Как пример можно привести большую эпидемию, вызванную *Vibrio cholerae* серогруппы O139 Bengal. Она началась в октябре 1992 в порту Мадрас Южной Индии и, быстро распространяясь по побережью Бенгалии, достигла Бангладеш в декабре 1992, где только за первые 3 месяца 1993 вызвала более чем 100000 случаев заболевания.

**Лабораторная диагностика.** Цель диагностики: индикация *Vibrio cholerae* в испражнениях и/или рвотных массах, воде, определение агглютининов и вибриоцидных антител в парных сыворотках крови больных.

**Методика диагностики.** Посев бактериологического материала (испражнения, рвотные массы, вода) на тиосульфат-цитрат-жёлчносолевой-сахарозный агар (англ. TCBS), а также на 1 % щелочную пептонную воду; последующий пересев на вторую пептонную воду и высеив на чашки со щелочным агаром.

Выделение чистой культуры, идентификация.

Исследование биохимических свойств выделенной культуры — способность разлагать те или иные углеводы, т. н. «ряд сахаров» — сахарозу, арабинозу, маннит.

Реакция агглютинации со специфическими сыворотками

**Профилактика.** Предупреждение заноса инфекции из эндемических очагов

Соблюдение санитарно-гигиенических мер: обеззараживание воды, мытьё рук, термическая обработка пищи, обеззараживание мест общего пользования и т. д.

Раннее выявление, изоляция и лечение больных и вибрионосителей

Специфическая профилактика холерной вакциной и холероген-анатоксином. Холерная вакцина имеет короткий (3-6 мес.) период действия.

В настоящее время имеются следующие пероральные противохолерные вакцины:

**Вакцина WC/rBS** — состоит из убитых целых клеток *V. Cholerae* O1 с очищенной рекомбинантной В-субъединицей холерного анатоксина (WC/rBS) — предоставляет 85-90-процентную защиту во всех возрастных группах в течение шести месяцев после приёма двух доз с недельным перерывом.

**Модифицированная вакцина WC/rBS** — не содержит рекомбинантной В-субъединицы. Необходимо принимать две дозы этой вакцины с недельным перерывом. Вакцина лицензирована только во Вьетнаме.

**Вакцина CVD 103-HgR** — состоит из ослабленных живых оральных генетически модифицированных штаммов *V. Cholerae* O1 (CVD 103-HgR). Однократная доза вакцины предоставляет защиту от *V. Cholerae* на высоком уровне (95 %). Через три месяца после приёма вакцины защита от *V. Cholerae* El Tor была на уровне 65 %.

### СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

1. Из испражнений больного выделен гр-, подвижный вибрион, агглютинирующийся о-агглютинирующей холерной сывороткой, нечувствительный к действию специфического холерного фага, нечувствительный к полимиксину. Ваш ориентировочный диагноз? Что нужно еще сделать для подтверждения диагноза?

2. У больного с профузным поносом и рвотой и из испражнений и рвотных масс выделено гр- подвижная палочка, не теряющая подвижности в присутствии о-агглютинирующей холерной сыворотки, в посеве по Полеву-Ермольевой через 3 часа в первой пробирке - диффузное помутнение, во второй - диффузное помутнение, в третьей - при добавлении раствора Люголя посинение. Ваше предложение? Этапы дальнейшего лабораторного исследования?

3. Из воды открытого водоема выделен микроб: гр- палочка очень подвижная дающая на щелочном агаре очень нежные прозрачные, голубоватые в проходящем свете колонии, расщепляющая глюкозу, мальтозу, манит, не расщепляющая лактозу, дульцит, разжижающая желатину воронкой. Ваш ориентировочный диагноз? Ваша лабораторная тактика

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

#### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

(возбудители бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза).

#### **СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ-ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ».**

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.

##### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
2. Специфическую профилактику бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.

##### **Студент должен уметь:**

1. Провести учет и интерпритацию результатов реакции Хеддельсона и Райта при бруцеллезе.
2. Провести учет и интерпритацию результатов РОНГА при ботулизме.
3. Провести учет и интерпритацию результатов РОНГА при ботулизме.

##### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
5. Сдача модуля.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Постановка и учет результатов реакции Хеддельсона и Райта при бруцеллезе.
2. Постановка и учет результатов РОНГА при ботулизме и лептоспирозе.

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ БРУЦЕЛЛЕЗА**

В сыворотке больных бруцеллезом накапливаются агглютинирующие (вначале Ig M, затем Ig G ), неполные блокирующие ( Ig A , IgG ) и опсонические ( Ig G ) антитела. Для их выявления с диагностической целью используют реакцию Райта и Хеддельсона. Реакция агглютинации- один из основных диагностических методов при бруцеллезе.

1. Постановка реакции Райта проводится с целью определения содержания в сыворотке крови больного специфических антител. Компоненты реакции:

- а) исследуемая сыворотка в разведении 1:25;
- б) антиген — взвесь убитых бруцелл (диагностикум Райта).

##### **СХЕМА РЕАКЦИИ РАЙТА.**

| № пробирок                   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Компоненты                   |     |     |     |     |     |     |     |
| 1. Физиологический раствор   | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 2. Сыворотка больного (1:25) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | -   | 0,5 |

|                         |      |       |        |       |       |   |   |
|-------------------------|------|-------|--------|-------|-------|---|---|
| 3. Разведения сыворотки | 1:50 | 1:100 | 1: 200 | 1:400 | 1:800 | - | - |
| 4. Диагностикум Райта   | 0,5  | 0,5   | 0,5    | 0,5   | 0,5   | - | - |

Учет результатов проводится через 18-20 часов, поэтому на занятии предлагается демонстрация реакции Райта. Студенты проводят учет результатов и делают вывод.

#### 2. Постановка реакции Хеддельсона.

Реакция ставится при массовом обследовании на бруцеллез с использованием стеклянных пластин.

Компоненты реакции:

- а) неразведенная сыворотка крови больного;
- б) антиген - взвесь убитых и окрашенных кристалл-виолетом бруцелл.

#### СХЕМА РЕАКЦИИ ХЕДДЕЛЬСОНА

| № квадратов                | 1    | 2    | 3    | 4    | Контроль  |         |
|----------------------------|------|------|------|------|-----------|---------|
|                            |      |      |      |      | сыворотка | антиген |
| 1. Физиологический раствор | -    | -    |      |      | 0,03      | 0,03    |
| 2. Сыворотка больного      | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,02      | -       |
| 3. Диагностикум Райта      | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | -         | 0,03    |

Студенты проводят реакцию самостоятельно и делают заключение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

#### ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

| №№ П/П | Исследуемый материал | Результаты Исследования | Графическое изображение |
|--------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
|        |                      |                         |                         |

**Бруцеллёз (лат. brucellosis)** — зоонозная инфекция, передающаяся от больных животных человеку, характеризующаяся множественным поражением органов и систем организма человека.

Возбудитель заболевания — группа микроорганизмов рода бруцелл. Патогенными для человека являются три: возбудитель бруцеллёза мелкого рогатого скота (*Brucella melitensis*), возбудитель бруцеллёза крупного рогатого скота (*Brucella abortus*), возбудитель бруцеллёза свиней (*Brucella suis*).

Возбудители бруцеллёза — бактерии рода бруцелла — хорошо переносят низкие температуры и замораживание, в воде сохраняются до 5 мес, в почве — 3 мес. и более, в коровьем молоке — до 45 дней, в брынзе — до 60 дней, в масле, сливках, простокваше и свежих сырах — в течение всего периода их пищевой ценности; в замороженном мясе — св. 5 мес, в засоленных шкурах — 2 мес, в шерсти — до 3—4 мес. При кипячении и пастеризации молока бруцеллы погибают. Дезинфицирующие средства убивают бактерии в течение нескольких минут.

Наиболее часто бруцеллёзом болеют домашние животные (козы, овцы, коровы, свиньи), при этом у животных наблюдаются аборт и рождение мертвого плода. Бруцеллы выделяются в окружающую среду с молоком, мочой больных животных и отделяемым матки (во время аборта). Возбудители бруцеллёза также содержатся в мясе больных животных.

В организм человека бруцеллы проникают через слизистые оболочки пищеварительного и дыхательного тракта, а также через поврежденную кожу (ссадины, царапины). Человек заражается бруцеллёзом при употреблении сырого молока от больных животных и приготовленных из него молочных продуктов (сыр, масло, творог, брынза), а также недостаточно проваренного и прожаренного мяса. Заражение может произойти и на производстве, связанном с обработкой кожи и шерсти, а также при уходе за больными животными и через предметы, зараженные их выделениями. Наиболее часто болеют доярки, телятницы, пастухи, чабаны, вет.

работники, зоотехники.

*Инкубационный период* (скрытый) продолжается от одной недели до нескольких месяцев, чаще 1—3 нед. бруцеллёз характеризуется многообразием клинических симптомов; течение его может быть различной степени тяжести. Заболевание начинается постепенно: появляются недомогание, бессонница, иногда раздражительность, головная боль, боли в мышцах и суставах, снижается аппетит, температура повышается до 37,1—37,3°. Чаще бруцеллёз начинается остро: температура повышается до 39—40°, появляются озноб, слабость, обильное потоотделение, резкие боли в мышцах, тугоподвижность и боли в суставах. Характерно поражение кровеносных сосудов, нервной системы и костносуставного аппарата, иногда могут быть психические расстройства. Болезнь длится в среднем 3 мес, но может затягиваться до 1—2 лет и более. Стойкие остаточные явления после перенесенного бруцеллёза могут привести к инвалидности. У беременных женщин при бруцеллёзе возможен самопроизвольный выкидыш.

*Лабораторное подтверждение* бруцеллеза существенно ограничено тем, что бруцеллы относятся к опасным возбудителям, выделение которых может проводиться только в специальных лабораториях, оборудованных в соответствии с требованиями профилактики. При серологических и аллергологических исследованиях нужно учитывать, что у привитых против бруцеллеза (прививаются группы риска, профессионально контактирующие с животными) могут быть и довольно длительное время положительные результаты как серологических реакций, так и особенно аллергических проб.

Из серологических реакций наиболее информативной является реакция агглютинации (реакция Райта). Агглютинация на стекле (реакция Хеддльсона) для диагностики не используется, она предложена для выявления лиц, подлежащих обследованию на бруцеллез, при массовых обследованиях по эпидемиологическим показаниям. Реакция Хеддльсона часто дает ложноположительные результаты. В какой-то степени это связано с перекрестными реакциями с рядом антигенов (иерсинии, возбудитель туляремии, противохолерная вакцинация и др.). Следует учитывать, что *Bg. melitensis* и *Bg. abortus* имеют перекрестные реакции между собой, но не с *Bg. canis*, так что для выявления антител к этой бруцелле необходим специальный диагностикум, который пока еще не выпускается. Возможно, это одна из причин редкого выявления данной разновидности бруцеллеза.

При остросептической форме бруцеллеза антитела начинают выявляться на 2-й неделе болезни и в дальнейшем титр их нарастает. Аллергическая проба становится положительной в конце 1-й и на 2-й неделе. При хронических формах нарастания титра антител часто выявить не удастся. Следует учитывать, что постановка аллергической пробы (проба Бюрне) может приводить к появлению антител или к нарастанию титра. Другие серологические реакции (РСК, РПГА, ОФР) менее информативны по сравнению с реакцией Райта и не имеют существенного значения. Отрицательные результаты пробы Бюрне позволяют исключить бруцеллез (за исключением ВИЧ-инфицированных, у которых исчезают все реакции ГЗТ).

**Ботулизм** (от лат. *botulus* — колбаса: название связано с тем фактом, что первые описанные случаи заболеваний были обусловлены употреблением кровяных и ливерных колбас) — тяжёлое токсикоинфекционное заболевание, характеризующееся поражением нервной системы, преимущественно продолговатого и спинного мозга, протекающее с преобладанием офтальмоплегического и бульбарного синдромов.

Развивается в результате попадания в организм пищевых продуктов, воды или аэрозолей, содержащих ботулотоксин, продуцируемый спорообразующей палочкой *Clostridium botulinum*. Ботулотоксин поражает мотонейроны передних рогов спинного мозга, вследствие чего нарушается иннервация мышц, развивается прогрессирующая острая дыхательная недостаточность.

Входными воротами являются слизистые оболочки дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, повреждённая кожа и лёгкие. От человека к человеку инфекция не передаётся. Несмотря на то, что ботулизм регистрируется гораздо реже, чем другие кишечные инфекции и отравления, он продолжает оставаться актуальным и опасным для жизни заболеванием.

Возбудитель ботулизма *Clostridium botulinum* относится к роду *Clostridium*, семейству *Bacillaceae*. Это анаэробная, подвижная, грамположительная, спорообразующая палочка размерами (0,6—1,0)х(4—9) мкм. В мазках имеет вид палочек с закруглёнными концами, образуют субтерминально расположенные споры, диаметр которых превышает поперечник вегетативной формы. Из-за спор возбудитель имеет форму теннисной ракетки (чем характерно отличается от других клостридий). Не образуют капсулы, подвижны, перитрихи, облигатные анаэробы, располагающиеся беспорядочными скоплениями или небольшими цепочками. Известно 7 типов возбудителя (сероваров) — А, В, С (подтипы С1 и С2), D, E, F и G, различающихся по антигенной структуре выделяемого экзотоксина. Из них патогенны типы А, В, Е и, реже, F.

В России преимущественно встречаются типы А, В, Е. Возбудители ботулизма широко распространены в природе и обитают в почве. Бактерия размножается и вырабатывает токсин в процессе жизнедеятельности. Токсины вырабатываются вегетативными формами. Оптимальные условия роста вегетативных форм — крайне низкое остаточное давление кислорода (0,40—1,33 кПа) и температурный режим в пределах 28—35 °С. В процессе жизнедеятельности происходит характерное для большинства клостридий газообразование (визуально на консервированных продуктах определяется как 'бомбаж'-вздутие крышки или жестяной банки). Прогревание при температуре 80 °С в течение 30 мин вызывает гибель вегетативных форм, однако его споровые формы способны выживать в течение нескольких часов при температуре 100 °С, и, попадая в благоприятную среду, переходить в вегетативные формы. Для полного уничтожения применяют дробную пастеризацию-

тиндализацию. Ботулотоксин относится к полипептидам и при кипячении в течение свыше 30 мин инактивируется.

Оптимальный рост клостридий и токсинообразование происходят в анаэробных условиях при температуре 35 °С. Вегетативные формы бактерий погибают при 80 °С в течение 30 мин, при кипячении — в течение 5 мин. Токсин устойчив к действию пепсина и трипсина, выдерживает высокие концентрации (до 18 %) поваренной соли, не разрушается в продуктах, содержащих различные специи. Хорошо нейтрализуется в щелочной среде.

Ботулотоксин является одним из наиболее сильных природных ядов (летальная доза для человека 5—50 нг/кг массы тела). Также описаны продуцирующие ботулотоксин штаммы других видов — *Clostridium butyricum* и *Clostridium baratii*, но они чрезвычайно редки.

*Материалом для бактериологического исследования* служат фекалии и рвотные массы больного, промывные воды желудка и кишечника, содержимое ран (при раневом ботулизме), подозреваемая пища. Так как сразу поставить диагноз «ботулизм» у взрослого больного сложно, то проводят обнаружение токсина в исследуемом материале.

Исследование проводят на белых мышах. Им внутрибрюшинно вводят жидкость, полученную после центрифугирования сыворотки крови больного в смеси с противоботулинической сывороткой типов А, В, Е.

Исследование проходит 4 дня. За это время мыши, не защищённые тем типом антитоксина, которым вызвано заболевание у пациента, погибают. Остаются живыми мыши, которым вводили сыворотку, соответствующую типу токсина, циркулирующего в крови больного.

Серологических исследований не проводят, так как заболевание не сопровождается выработкой выраженных титров антител, что связано с незначительной дозой токсина, вызвавшей поражение.

*Критерии диагноза.*

В первые дни заболевания определить диагноз очень сложно. Постановке диагноза помогает наличие следующих факторов:

употребление больным пищи, которая может быть заражена токсином *Clostridium botulinum*;

отсутствие лихорадки;

прогрессирующая мышечная слабость;

выраженная гипосаливация (сухость во рту);

вздутие живота, задержка стула;

наличие глазных симптомов (нечёткость зрения, мидриаз и другие);

признаки дыхательной недостаточности;

чувство дискомфорта, изменение тембра голоса.

*Алгоритм лечения больных.*

Алгоритм интенсивной терапии больных ботулизмом включает [18]:

промывание желудка для удаления остатков токсина из желудка;

кишечный диализ (5 % раствором соды);

антитоксическая сыворотка (тип А, С, Е по 10 000 МЕ, тип В 5 000 МЕ);

парентеральное введение инфузионных сред с целью дезинтоксикации, коррекции водно-электролитных и белковых нарушений;

антибактериальная терапия;

гипербарическая оксигенация как средство устранения гипоксии;

лечение осложнений.

*Антитоксические сыворотки* получают иммунизацией лошадей возрастающими дозами анатоксинов. Антитоксические сыворотки выпускают с определённым содержанием антитоксинов, измеряемым в международных единицах (МЕ), принятых ВОЗ. За 1 МЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое способно нейтрализовать определённую дозу токсина. Действие сывороток сводится к нейтрализации токсинов, вырабатываемых возбудителем.

Для профилактики и лечения ботулизма применяют противоботулиновые лечебно-профилактические антитоксические сыворотки, выпускаемые в виде комплекта моновалентных или поливалентных сывороток. Сыворотку применяют после обязательного определения чувствительности пациента к лошадиному белку при помощи внутрикожной пробы. При положительной реакции сыворотку вводят по абсолютным показаниям под наблюдением врача с особыми предосторожностями. Заболевшим и всем лицам, употреблявшим продукт, вызвавший отравление, назначают антитоксическую поливалентную сыворотку.

Активную иммунизацию осуществляют очищенным сорбированным пентаанатоксином, обеспечивающим защиту от ботулинических токсинов типов А, В, С, О, Е, и секстаанатоксином. Препараты предназначены для иммунизации ограниченного контингента населения. Одна лечебная доза для антитоксинов типа А, С, Е составляет по 10 000 МЕ, типа В по 5 000 МЕ.

**Лептоспироз** — острая инфекционная болезнь, вызываемая возбудителем из рода лептоспир. Характеризуется поражением капилляров, часто поражением печени, почек, мышц, явлениями интоксикации, сопровождается волнообразной лихорадкой. Ранее это заболевание имело название иктеро-геморрагическая лихорадка, болезнь Васильева — Вейля. В 1883 году Н. П. Васильев выделил это заболевание из всех желтух, в 1886 г. детально описал 4 случая. Адольф Вейль описал заболевание в 1886 году, когда он сообщил об «остром инфекционном заболевании с увеличением селезёнки, желтухой и нефритом».

Лептоспироз распространён во всех регионах, кроме Арктики. Заболеваемость высокая. Более половины случаев протекает в тяжелой форме и требует реанимационных мероприятий.

#### *Этиология*

Лептоспиры – имеют спиралевидную форму, обладают прямолинейной и ротационной подвижностью. В жидких средах для лептоспир характерно вращение вокруг длинной оси, делящиеся клетки резко изгибаются в точке намеченного деления. Лептоспиры способны перемещаться в направлении среды, обладающей большей вязкостью. Концы лептоспир изогнуты в виде крючков, но могут быть и бескрючковые варианты. Длина лептоспир 6-20 мкм, а поперечник 0,1-0,15 мкм. Количество завитков зависит от длины (в среднем около 20). Лептоспиры культивируются на средах, содержащих сыворотку крови.

Лептоспиры относятся к гидрофилам. Важным условием для их выживания во внешней среде является повышенная влажность и pH в пределах 7,0-7,4, оптимальный рост лептоспир наблюдается при температуре 28-30°C. Растут лептоспиры медленно, рост их обнаруживается на 5-7-й день. Отличительным признаком сапрофитических штаммов лептоспир является их рост при 13°C.

Не окрашивается анилиновыми красителями, видна только в темнопольном микроскопе. Имеет около 200 сероваров, 19 серологических групп. Размножение происходит в болотистой местности.

#### *Эпидемиология*

Источники инфекции: грызуны (крысы, мыши), промысловые животные (сурки), домашние животные (крупный рогатый скот, собаки, свиньи, лошади). Смертность среди последних достигает 65—90 %.

*Пути передачи:* контактно-бытовой (через повреждённые слизистые и кожу), алиментарный (вода из природных источников). Человек от человека не заражается.

#### *Патогенез.*

Фаза заражения. Лептоспиры проникают через поврежденную кожу и слизистые в кровь, затем внедряются в печень, почки, селезёнку, надпочечники, где они усиленно размножаются. Эта фаза соответствует инкубационному периоду болезни.

Фаза генерализованной инфекции — повторная лептоспиремия с последующим поступлением в почки, печень, надпочечники, оболочки мозга. Паразитируют на поверхности клеток. Это начальный период болезни.

токсинемия — поражается эндотелий капилляров, повышается их проницаемость — возникает геморрагический синдром + поражение печени, почек, надпочечников — это период разгара болезни.

Формирование нестерильной стадии иммунитета — в крови появляются антитела — клинически угасание процесса.

Фаза формирования стерильной стадии иммунитета — сочетание гуморального с местным органическим и тканевым иммунитетом. Клинически выздоровление

#### *Лечение*

Противолептоспирозный гамма-глобулин, лучше донорский, а не лошадиный.

Антибактериальная терапия (пенициллин, тетрациклин, аминогликозиды).

Дезинтоксикационная терапия (под контролем диуреза).

Симптоматическая терапия — гемостатические средства, коррекция кислотно-щелочного равновесия.

#### *Диагностика.*

Распознавание лептоспироза основано на тщательном анализе данных эпидемиологического анамнеза, правильной оценке результатов клинико-лабораторного обследования (циклическое течение болезни с признаками генерализации инфекции, печеночно-почечные нарушения, нейтрофильный лейкоцитоз и повышение СОЭ и др.).

Специфическая диагностика включает различные методы и серологические тесты.

В начальный период болезни лептоспиры могут быть выявлены в крови или иногда в цереброспинальной жидкости при исследовании методом «раздавленной капли» в темнопольном микроскопе или при посеве 0,2–0,5 мл крови на 5–10 мл питательной среды (фосфатно-сывороточная и другие среды) при температуре 30 °C, а также путем заражения лабораторных животных, в органах которых обнаруживают возбудителей при окраске нитратом серебра.

В период разгара болезни лептоспиры могут быть выделены из крови, цереброспинальной жидкости и мочи, в более поздние сроки – из мочи. В органах больных, умерших от лептоспироза, возбудителей находят наиболее часто в почках.

Для серологической диагностики применяют преимущественно реакцию микроагглютинации и лизиса (РМА), диагностические титры которой (1:100 и более) выявляются в парных сыворотках крови, взятой в период разгара и в более поздние сроки болезни (диагностический признак – нарастание титра в 4 раза и более). Могут использоваться РСК и РИГА.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ**

Задача 1. Мужчина 40 лет обратился к врачу на 8-ой день болезни. Несколько дней назад он купался в реке, выше по течению которой было место водопоя скота. Среди животных в дашгой местности регистрировались заболевания лептоспирозом. Врач заподозрил возможность лептоспироза.

Какой материал на данном этапе болезни необходимо взять у больного и с помощью какого

микробиологического метода можно поставить диагноз?

2. Ответьте на тестовый вопрос: выберите среды, на которых культивируют клостридии:

- а) железо-сульфитное молоко
- б) высокий столбик сахарного МПА
- в) среда Эндо, Левина
- г) среда Вильсона-Блер
- д) желчный бульон
- е) кровяной агар

3. Какие методы лабораторной диагностики Вы можете отметить для бруцеллеза, исходя из знания патогенеза, клинической картины и условий заражения?

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита).**

##### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.

##### Студент должен знать:

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.
2. Специфическую профилактику туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.

##### Студент должен уметь:

1. Приготовить мазок и окрасить по методу Циля-Нельсена.
2. Приготовить мазок и окрасить по методу Грама.

##### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.

#### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Микроскопировать микропрепараты: микобактерий туберкулеза, менингококков.
2. Изучить схему лабораторной диагностики туберкулеза.
3. Изучить метод микрокультивирования для экспресс-диагностики туберкулеза;
4. Микроскопировать и зарисовать демонстрационный препарат «микрокультура *Myc. Tuberculosis*».

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Микобактерии относятся к семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*.

Различают: 1) Микобактерии человеческого типа (*Mycobacterium tuberculosis*), 2) микобактерии бычьего типа (*Mycobacterium bovis*), 3) микобактерии птичьего типа (*Mycobacterium avium*), 4) атипичные микобактерии, которые делят на четыре группы (по Раньону):

- а) фотохромогенные бактерии, которые растут в темноте в течении 21-46 дней в виде беспи́гментных колоний, но после освещения дневным или электрическим светом приобретают желтую или оранжевую окраску. Патогенны для людей;
- б) скотохромогенные бактерии, которые растут медленно (60-100 дней), образуют желто-оранжевый пигмент в темноте. Некоторые из них патогенны: вызывают поражение лимфатических узлов и легких у детей;
- в) нефотохромогенные микобактерии, не образуют пигмента ни на свету, ни в темноте. Патогенны для человека;
- г) быстрорастущие микобактерии, растут в течении нескольких дней в виде беспи́гментных колоний. К этой группе относятся как потенциально патогенные микобактерии, так и сапрофиты.

Возбудитель туберкулеза: *Mycobacterium tuberculosis* представляет собой тонкие, слегка изогнутые палочки длиной 2,5-3,5 мкм, отличаются большим полиморфизмом: длинные, ветвистые и зернистые формы. *Mycobacterium bovis* – короткие, толстые палочки, *Mycobacterium avium* – нитевидные, ветвистые формы.

Для постановки микробиологического диагноза используют микроскопический, бактериологический, биологический, серологический и аллергический методы исследования. Для исследования может поступить самый разнообразный материал в зависимости от того, где расположен патологический процесс: при туберкулезе легких – мокрота, при туберкулезе почек – моча, при туберкулезном менингите – спинномозговая жидкость

#### I. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

Исследуемый материал: мокрота, моча, спинномозговая жидкость. Для «обогащения» мокроты широко используются методы гомогенизации и флотации. При окраске мазков по Цилю-Нильсену туберкулезные палочки окрашиваются в ярко-красный цвет. Применение люминесцентной микроскопии повышает число находок туберкулезных палочек.

Микроскопическое исследование является ориентировочным и позволяет судить лишь о наличии кислотоустойчивых бактерий в материале без определения их видовой и типовой принадлежности.

### II. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

#### Особенности метода

Для освобождения от сопутствующей микрофлоры исследуемый материал обрабатывают 10% серной кислотой или 4-6% раствором едкого натрия, а затем центрифугируют. Кислоту нейтрализуют и материал заливают в несколько пробирок со средой Левенштейна-Йенсена или другими специальными средами.

Посевы инкубируют при 37° С 4-6 недель и более, так как туберкулезная палочка размножается очень медленно, особенно в первых генерациях. Колонии имеют вид сероватого или светло-кремового морщинистого или крошкообразного сухого налета.

При идентификации чаще всего определяют способность выделенной культуры синтезировать никотиновую кислоту – ниациновую проба Конно – с помощью которой удается отличить *M.tuberculosis*, хорошо синтезирующие никотиновую кислоту, от палочек *M.bovis*, образующих ее в минимальных количествах. Атипичные микобактерии обладают высокой каталазной активностью. Пероксидазная активность у них не выявляется. Определение термостабильности каталазы позволяет дифференцировать вирулентные для человека микобактерии (человеческого и бычьего типов), у которых она термолабильна, от кислотоупорных сапрофитов и атипичных микобактерий, которые образуют термостабильную каталазу.

Для ускоренной диагностики туберкулеза используют метод микрокультур Прайса. Для этого на нескольких предметных стеклах делают толстые мазки из исследуемого материала. Мазки обрабатывают 2-6 % серной кислотой и нейтрализуют щелочью. После этого их помещают во флаконы с гемолизированной цитратной кровью. Через 7-14 дней материал окрашивают по Цилю-Нильсену и микроскопируют – вирулентные штаммы образуют микрокультуры, имеющие вид жгутов или кос (наличие корд-фактора).

#### III. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Применяется с целью выделения чистой культуры возбудителя туберкулеза из органов животного, зараженного исследуемым материалом, а также для определения вирулентности микобактерий. Исследуемый материал обрабатывают серной кислотой для освобождения от посторонней микрофлоры, нейтрализуют и вводят подкожно морской свинке и кролику с отрицательными туберкулиновыми реакциями. Через 4 месяца, если животное не погибнет, его забивают, проводят макро- и микроскопические исследование органов и делают посевы. *M.tuberculosis* высокопатогенны для морских свинок и мало патогенны для кроликов. *M.bovis* высокопатогенны для кроликов.

#### IV. СЕРОДИАГНОСТИКА

Используют в качестве дополнительного текста РСК и РПГА. Положительные результаты отмечаются при активном туберкулезе, а также при инфицировании микобактериями туберкулеза и вакцинации.

#### V. КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА

Ставится с туберкулином (РРО) – очищенной белковой фракцией, полученной из микобактерий туберкулеза,

для характеристики, оценки течения туберкулезного процесса, определения эффективности вакцинации и отбора контингентов для ревакцинации против туберкулеза. Туберкулин вводят внутрикожно в строго определенной дозировке (реакция Манту). Результат учитывают через 24-48 часов по образованию гиперемии и папулы

#### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Вакцина БЦЖ. Живая, лиофильно высушенная культура апатогенного штамма микобактерий туберкулеза, полученная французскими учеными А. Кальметтом и М. Гереном. Применяется внутрикожно для активной специфической профилактики туберкулеза.

**Менингококки** (*Neisseria meningitidis*)- грамотрицательные диплококки бобовидной формы, жгутиков и спор не имеют, в организме образуют капсулу.

*Культуральные свойства.*

Очень требовательны к условиям культивирования. Растут на плотных и жидких питательных средах, содержащих 20-25% сыворотки (сывороточный агар, сывороточный бульон). На плотной среде образуют мелкие гладкие прозрачные колонии. Строгий температурный оптимум - 37° С (при других температурах менингококки погибают) необходимо создать как при культивировании, так и при транспортировке материала от больного в лабораторию.

Среди представителей рода *Neisseria* есть условно-патогенные виды, обитатели слизистых оболочек носоглотки – *N. Sicca*, *N.mucosa* и др. У людей с ослабленной резистентностью они могут вызывать заболевания клинически сходные с менингококковой инфекцией.

*Антигенная структура.*

*N meningitidis* имеет родовые антигены общие для всех видов. Внутри вида по капсульным полисахаридным антигенам различают серогруппы *N meningitidis*-A,B,C,D,Y,Z и др.

Эпидемиологические вспышки чаще вызывают возбудители серогрупп A,B,C.

*Факторы патогенности менингококков:*

1.Пили – обеспечивают адгезию на клетках цилиндрического эпителия носоглотки.

2.Ig A- протеазы- расщепляют молекулы SIg A, снижая тем самым местную защиту слизистых оболочек носоглотки;

3.Капсула- защищает от фагоцитоза;

4.Ферменты патогенности: гиалуронидаза, нейроминидаза и др.

5.Эндотоксин (ЛПС клеточной стенки)- вызывает поражение кровеносных сосудов, что проявляется кровоизлияниями во внутренние органы и геморрагической сыпью на коже.

*Источником инфекции* являются больной человек, либо бактерионоситель. Чаще (в 70-80% случаев) болеют дети первых трех лет жизни.

*Пути заражения* – воздушно-капельный. Входные ворота инфекции – слизистая оболочка носоглотки. Менингококковая инфекция может протекать в нескольких клинических формах, которые разделяют на локализованные и генерализованные.

#### Основные клинические формы менингококковой инфекции и материал для микробиологического исследования

| ФОРМЫ                        | ЗАБОЛЕВАНИЯ                                                           | МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ             |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Первично-локализованные      | менингококковое носительство                                          | мазок из носоглотки                   |
|                              | Острый назофарингит                                                   |                                       |
| Гематогенно-генерализованные | Менингококциемия                                                      | Мазок из носоглотки, кровь            |
|                              | Эпидемиологический<br>цереброспинальный менингит,<br>менингоэнцефалит | Мазок из носоглотки, кровь.<br>ликвор |

#### Микробиологическая диагностика менингококковых инфекций.

1. Бактериологический метод (основной) – выделение чистой культуры возбудителя на сывороточных средах и определение его антибиотикочувствительности.
2. Бактериологический метод – использует как обязательный ориентировочный. В мазках из нативного материала с окраской по Грамму выделяется внутриклеточное расположение бактерий и характерная картина незавершенного фагоцитоза менингококков.

*Специфическая профилактика* менингококковой инфекции проводятся только по эпидемиологическим показаниям менингококковой полисахаридной вакциной серогрупп A и C.

### Тестовый контроль

1. Морфологические св-ва возбудителей туберкулеза
  - а) Кокки
  - б) Тонкие длинные палочки
  - в) Короткие палочки
  - г) Зернистые формы
  - д) Наличие спор
2. Химические в-ва, определяющие кислотоустойчивость микобактерий
  - а) Липиды
  - б) Белки
  - в) углеводы
3. Тесты, характерные для человеческого вида возбудителя
  - а) Ниацин-тест (образование никотиновой кислоты)
  - б) Генерализованный процесс у морской свинки
  - в) Генерализованный процесс у кроликов.
4. Препараты, используемые для кожно-аллергических проб при туберкулезе.
  - а) Тулярин
  - б) Бруцеллин
  - в) Туберкулин
  - г) РРД
5. В каком возрасте производится вакцинация против туберкулеза
  - а) Первая неделя жизни
  - б) 2-3 года
  - в) 6-7 лет
6. Морфологические св-ва возбудителя менингита
  - а) Кокки
  - б) Тонкие длинные палочки
  - в) Короткие палочки
  - г) Зернистые формы

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

**ТЕМА:** *БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители дифтерии, коклюша, скарлатины).*

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики дифтерии, коклюша, скарлатины.

#### Студент должен знать:

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику дифтерии, коклюша, скарлатины.
2. Специфическую профилактику дифтерии, коклюша, скарлатины.

#### Студент должен уметь:

1. Приготовить мазок и окрасить по методу Нейссера.
2. Приготовить мазок и окрасить по методу Грама.
3. Определить токсигенность дифтерийных культур по Оухтерлони.
4. Поставить пробу на цитиназу и пробу на уреазу дифтерийных и ложно -дифтерийных палочек.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей дифтерии, коклюша, скарлатины.

2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики дифтерии, коклюша, скарлатины.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики дифтерии, коклюша, скарлатины.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Приготовление мазка и окраска по методу Нейссера.
2. Приготовление мазка и окраска по методу Грама.
3. Определение токсигенности дифтерийных культур по Оухтерлони.
4. Проведение проб на цистиназу и на уреазу дифтерийных и ложно -дифтерийных палочек.

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Дифтерийная палочка** (*Corynebacterium diphtheriae*) — грамположительные палочковидные бактерии рода *Corynebacterium*. Впервые возбудитель был обнаружен на срезах пленок, полученных из ротоглотки больных в 1883 г. Эдвином Клебсом (нем. Edwin Klebs, 1834—1913). Через год Фридрихом Лёффлером (нем. Friedrich August Johannes Löffler, 1852—1915) была выделена чистая культура. Дифтерийный токсин получили Э. Ру и А. Иерсен (1884—1888 гг.). Анатоксин обнаружил Рамон Гастон в 1923 г. и предложил использовать его для активной иммунизации. *Corynebacterium diphtheriae* — крупные (1—8 × 0,3—0,8 мкм) прямые, слегка изогнутые полиморфные палочковидные бактерии. На полюсах клеток локализуются метакрохроматические зёрна волютина, придавая клеткам характерную форму «булавы». Зёрна волютина окрашиваются метиленовым синим по Нейссеру. На микропрепаратах располагаются одиночно или вследствие особенностей деления клеток располагаются в форме латинской буквы V или Y. Спор и капсул не образуют.

**Эпидемиология.** Источником инфекции при дифтерии являются люди - больные или здоровые носители токсигенных дифтерийных микробов. Наибольшую эпидемическую опасность представляют больные дифтерией зева, носа и гортани, активно выделяющие возбудителей заболевания во внешнюю среду с выдыхаемым воздухом. Незначительное в этом отношении значение играют больные дифтерией глаз, кожи, раны и других локализаций, способные распространять инфекцию контактным путем (через руки, предметы быта).

**Патогенез.** Входными воротами возбудителей дифтерии могут быть практически все области покровов (кожи и слизистых) макроорганизма. Однако наиболее часто ими является слизистая оболочка ротоглотки, намного реже - гортани, носа, конъюнктив, половых органов, раневая поверхность, кожа и др. Токсигенные коринебактерии фиксируются на клетках тканей, размножаются и в процессе жизнедеятельности продуцируют экзотоксин, оказывающий местное и общее воздействие, обуславливающее практически все проявления патологического процесса. Микробные клетки за пределы тканей, являющихся воротами инфекции, как правило, не распространяются и непосредственного участия в поражении макроорганизма не принимают.

Дифтерийный экзотоксин состоит из нескольких фракций, каждая из которых обладает самостоятельным биологическим действием. Одна из них - гиалуронидаза: разрушает гиалуроновую кислоту капилляр и повышает их проницаемость. Это ведет к выходу за пределы сосудов жидкой части крови, пропитыванию пораженных тканей плазмой, содержащей наряду с другими компонентами фибриноген. Вторая - некротоксин - вызывает некроз эпителия на месте ворот инфекции, сопровождающийся выделением из эпителиальных клеток тромбокиназы. Последняя способствует превращению фибриногена в фибрин и образованию на поверхности пораженных тканей фибриновой пленки. Небные миндалины, в отличие от других органов, покрыты многослойным эпителием. В результате образующаяся при дифтерии фибриновая пленка проникает глубоко внутрь эпителиального покрова и плотно спаяна с тканями. Третья фракция дифтерийного токсина - истинный дифтерийный токсин (основной его компонент) способен вытеснять из клеточных структур цитохром Б и таким образом блокировать в них процессы клеточного дыхания и синтеза белковых молекул. Наиболее чувствительными к этим изменениям являются миокард, капилляры и нервные клетки. В кардиомиоцитах развиваются явления миокардиодистрофии с последующим их некрозом, миолизом и развитием инфекционно-токсического миокардита. Поражение капилляров при дифтерии сопровождается инфекционно-токсическим шоком. Повреждение нервных клеток сопровождается дистрофическими изменениями шванновских клеток и демиелинизацией нервных волокон. Наряду с отмеченным, общее действие дифтерийного токсина проявляется явлениями общей интоксикации.

**Основу лабораторной диагностики** составляют бактериологические исследования: выделение возбудителя из очага воспаления, определение его типа и токсигенности. Материал отбирают стерильными ватными тампонами, сухими или смоченными (до стерилизации!) 5% раствором глицерина. При хранении и транспортировке тампоны предохраняют от охлаждения и высыхания. Материал должен быть посеян не позднее 2-4 ч после взятия. У больных ангиной, бывших в контакте с больными дифтерией, а также у лиц с типичными клиническими проявлениями дифтерии диагноз ставят даже при отрицательном результате бактериологического исследования.

Вспомогательное значение имеет определение титров антитоксических антител в парных сыворотках

при постановке РНГА. Токсинообразование выявляют, используя РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом. Для выявления дифтерийного токсина предложено использовать ПЦР.

*Основным в лечении* дифтерии считают введение анитоксической противодифтерийной сыворотки. Она нейтрализует токсин, циркулирующий в крови, следовательно, оказывает наибольший эффект при раннем применении

*Профилактические мероприятия.* Вакцинопрофилактика остаётся основным способом контроля дифтерии. Схема иммунизации детей предусматривает иммунизацию вакциной АКДС начиная с 3 мес жизни (вакцинируют 3-кратно с интервалом 30-40 дней). Ревакцинацию проводят через 9-12 мес после законченной вакцинации. Для ревакцинации в 6-7, 11-12 и 16-17 лет применяют АДС-М. В отдельных случаях, например при противопоказаниях к коклюшному компоненту АКДС, АДС-М применяют и для вакцинации.

**Коклюш** (whooping-cough - англ.; Keuchhusten - нем; Coqueluche - франц.) и паракклюш - острые инфекционные болезни, клинически неотличимые друг от друга. Характеризуется острым катаром дыхательных путей и приступами спазматического кашля.

Возбудитель коклюша (*Bordetella pertussis*) представляет собой короткую палочку с закругленными концами (0,2-1,2 мкм), грамотрицательную, неподвижную, хорошо окрашивающуюся анилиновыми красками. В антигенном отношении неоднородна. Антиген, который обуславливает образование агглютининов (агглютиноген), состоит из нескольких компонентов. Они названы факторами и обозначаются цифрами от 1 до 14. Фактор 7 является родовым, фактор 1 содержит *B. pertussis*, 14 - *B. parapertussis*, остальные встречаются в разных комбинациях; для возбудителя коклюша это факторы 2, 3, 4, 5, 6, для паракклюша - 8, 9, 10. Реакция агглютинации с адсорбированными факторными сыворотками позволяет дифференцировать виды бордетелл и определять их антигенные варианты. Возбудители коклюша и паракклюша очень неустойчивы во внешней среде, поэтому посев нужно делать сразу же после взятия материала. Бактерии быстро погибают при высушивании, ультрафиолетовом облучении, под влиянием дезинфицирующих средств. Чувствительны к эритромицину, левомицетину, антибиотикам тетрациклиновой группы, стрептомицину.

*Патогенез.* Ворота инфекции является слизистая оболочка респираторного тракта. Коклюшные микробы прикрепляются к клеткам мерцательного эпителия, где они размножаются на поверхности слизистой оболочки, не проникая в кровоток. На месте внедрения возбудителя развивается воспалительный процесс, угнетается деятельность ресничного аппарата клеток эпителия и увеличивается секреция слизи. В дальнейшем происходит изъязвление эпителия дыхательных путей и очаговый некроз. Патологический процесс наиболее выражен в бронхах и бронхиолах, менее выраженные изменения развиваются в трахее, гортани и носоглотке. Слизистогнойные пробочки закупоривают просвет мелких бронхов, развивается очаговый ателектаз, эмфизема. Наблюдается перибронхиальная инфильтрация. В генезе судорожных приступов имеет значение сенсibilизация организма к токсинам коклюшной палочки. Постоянное раздражение рецепторов дыхательных путей обуславливает кашель и приводит к формированию в дыхательном центре очага возбуждения типа доминанты. Вследствие этого типичные приступы спазматического кашля могут быть вызваны и неспецифическими раздражителями. Из доминантного очага возбуждение может иррадиировать и на другие отделы нервной системы, например на сосудодвигательный (повышение АД, спазм сосудов). Иррадиацией возбуждения объясняется также появление судорожных сокращений мышц лица и туловища, рвоты и других симптомов коклюша. Перенесенный коклюш (как и противокклюшные прививки) не обеспечивает напряженного пожизненного иммунитета, поэтому возможны повторные заболевания коклюшем (около 5% случаев коклюша приходится на взрослых людей).

*Достоверный диагноз* в катаральном периоде может быть поставлен после получения результатов бактериологических исследований. Основанием для исследования в этих случаях обычно служат эпидемиологические данные (контакт с больными коклюшем, отсутствие данных о прививках и др.). В периоде спазматического кашля диагноз коклюша поставить значительно легче, так как появляются типичные приступы. Однако нужно учитывать, что иногда приступы кашля, сходные с коклюшными, могут быть обусловлены другими причинами (аденовирусная инфекция, вирусные пневмонии, сдавление дыхательных путей при злокачественных новообразованиях, инфекционном мононуклеозе и др.), с другой стороны, коклюш может протекать атипично без характерных приступов (у привитых детей, у взрослых). Основным методом лабораторного подтверждения диагноза является выделение возбудителя коклюша. Частота выделения зависит от сроков взятия материала; на 1-й неделе заболевания положительные результаты удается получить у 95% больных, на 4-й - лишь у 50%, а начиная с 5-й недели, микроб выделить уже не удастся. Материал из носоглотки берут сухим тампоном с немедленным посевом на чашки с селективной питательной средой. Используют также метод "кашлевых пластинок", при котором чашка Петри с питательной средой устанавливается перед ртом кашляющего ребенка (на расстоянии около 10 см), удерживается в таком положении несколько секунд, чтобы уловить 5-6 кашлевых толчков. Чашку с посевом быстро закрывают крышкой и помещают в термостат. При транспортировке оберегают от охлаждения (заворачивают в бумагу, вату, в контейнер помещают грелку, заполненную горячей водой). Однако по частоте выделения возбудителей коклюша метод "кашлевых пластинок" значительно уступает взятию материала тампоном. Серологические методы можно использовать для ретроспективной диагностики, а также у больных с отрицательными результатами бактериологических исследований. Из старых методов можно использовать РСК, РПГА, реакцию агглютинации. Диагностическим считается нарастание титров антител в 4 раза и более, а также высокие титры антител (1:80 и выше).

В последнее время успешно используют иммуноферментный метод для обнаружения антител в сыворотке (иммуноглобулины класса М) и в носоглоточной слизи (иммуноглобулины класса А). Эти антитела появляются со 2-3-й недели болезни и сохраняются в течение 3 мес.

**Скарлатина** - острое инфекционное заболевание, проявляющееся мелкоточечной сыпью, лихорадкой, общей интоксикацией, ангиной. Возбудитель болезни – стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*). Заражение происходит от больных воздушно-капельным путем (при кашле, чихании, разговоре), а также через предметы обихода (посуда, игрушки, белье). Особенно опасны больные как источники инфекции в первые дни болезни.

Источниками возбудителя инфекции являются больной скарлатиной или любой другой клинической формой стрептококковой инфекции и бактерионоситель. Чаще болеют дети 3—10 лет, посещающие детские дошкольные учреждения и школу. Появлению случаев скарлатины в детских учреждениях, как правило, предшествует повышенный уровень заболеваемости ангинами и острыми респираторными вирусными инфекциями. Дети первого года жизни (особенно первого полугодия) и взрослые скарлатиной болеют редко. Основной путь передачи возбудителя инфекции — воздушно-капельный.

#### *Патогенез*

Возбудитель проникает в организм человека через слизистые оболочки зева и носоглотки, в редких случаях возможно заражение через слизистые оболочки половых органов или повреждённую кожу. В месте адгезии бактерий формируется местный воспалительно-некротический очаг. Развитие инфекционно-токсического синдрома обусловлено в первую очередь поступлением в кровоток эритрогенного токсина стрептококков (токсина Дика), а также действием пептидогликана клеточной стенки. Токсинемия приводит к генерализованному расширению мелких сосудов во всех органах, в том числе в кожных покровах и слизистых оболочках, и появлению характерной сыпи. Синтез и накопление антитоксических антител в динамике инфекционного процесса, связывание ими токсинов в последующем обуславливают уменьшение и ликвидацию проявлений токсикоза и постепенное исчезновение сыпи. Одновременно развиваются умеренные явления периваскулярной инфильтрации и отёка дермы. Эпидермис пропитывается экссудатом, его клетки подвергаются ороговению, что в дальнейшем приводит к шелушению кожи после угасания скарлатинозной сыпи. Сохранение прочной связи между ороговевшими клетками в толстых слоях эпидермиса на ладонях и подошвах объясняет крупнопластинчатый характер шелушения в этих местах.

Компоненты клеточной стенки стрептококка (групповой А-полисахарид, пептидогликан, белок М) и внеклеточные продукты (стрептолизины, гиалуронидаза, ДНК-аза и др.) обуславливают развитие реакций гиперчувствительности замедленного типа, аутоиммунных реакций, формирование и фиксацию иммунных комплексов, нарушения системы гемостаза. Во многих случаях их можно считать причиной развития гломерулонефрита, артериитов, эндокардитов и других осложнений иммунопатологического характера.

Из лимфатических образований слизистой оболочки ротоглотки возбудители по лимфатическим сосудам попадают в регионарные лимфатические узлы, где происходит их накопление, сопровождающееся развитием воспалительных реакций с очагами некроза и лейкоцитарной инфильтрации. Последующая бактериемия в некоторых случаях может привести к проникновению микроорганизмов в различные органы и системы, формированию гнойно-некротических процессов в них (гнойного лимфаденита, отита, поражений костной ткани височной области, твёрдой мозговой оболочки, височных синусов и т.д.).

Скарлатину следует отличать от кори, краснухи, псевдотуберкулёза, лекарственных дерматитов. В редких случаях развития фибринозных налётов и особенно при их выходе за пределы миндалин заболевание необходимо дифференцировать от дифтерии.

Скарлатину отличают яркая разлитая гиперемия ротоглотки («пылающий зев»), резко ограниченная в месте перехода слизистой оболочки на твёрдое нёбо, ярко-красный язык с малиновым оттенком и гипертрофированными сосочками («малиновый язык»), мелкоточечные элементы сыпи на общем гиперемизованном фоне, сгущение сыпи в виде тёмно-красных полос на кожных складках в местах естественных сгибов, отчётливо выраженный белый дермографизм, бледный носогубной треугольник (симптом Филатова). При надавливании на кожу ладонью сыпь в этом месте временно исчезает («симптом ладони»), положительны эндотелиальные симптомы. После исчезновения экзантемы отмечают мелкочешуйчатое шелушение кожи (на ладонях и подошвах крупнопластинчатое).

#### *Лабораторная диагностика*

Диагноз скарлатины основывается на клинических (острое начало заболевания, лихорадка, интоксикация, острый катаральный или катарально-гнойный (при септической форме болезни - некротический), тонзиллит, обильная точечная сыпь, сгущающаяся в естественных складках кожи и лабораторных (нейтрофильный лейкоцитоз, повышенная СОЭ, обильный рост бетагемолитических стрептококков при посеве материала из очага инфекции на кровяной агар, нарастание титров антител к стрептококковым антигенам - М-протеину, А-полисахариду, стрептолизину-О и другим) данных.

### **Тестовый контроль**

1. Методы используемые для окраски дифтерийной палочки:

- А) метод Грама
- Б) метод Нейссера

- В) метод Ожешко
- Г) Метод Циля –Нельсена

2. Биологические варианты дифтерийной палочки:

- А) Гравис
- Б) Митис
- Г) Интермедиус

3. Какие ассоциированные препараты используют для профилактики дифтерии, коклюша:

- А) АКДС
- Б) брюшнотифозная вакцина с тетраанатоксином.

#### **Задача №1**

При обследовании на дифтерийное носительство из зева воспитательницы детского сада выделили микроб, обладающий следующими свойствами: зерна волютин обнаруживаются у отдельных особей, сахарозу, глюкозу, крахмал не расщепляет, пробы на цистиназу и уреазу отрицательны.

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7**

#### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ** **(возбудитель сибирской язвы).**

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сибирской язвы.

##### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику сибирской язвы.
2. Специфическую профилактику сибирской язвы.

##### **Студент должен уметь:**

1. Поставить реакцию термокольцепреципитации по Асколи.
2. Приготовить мазок и окрасить по методу Грама.

##### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителя сибирской язвы
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемого заболевания.
3. Принципы микробиологической диагностики сибирской язвы.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сибирской язвы.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Постановка реакции термокольцепреципитации по Асколи.
2. Учет реакции РП по Асколи и сделать заключение.
3. Демонстрационный мазок из автоклавированного гноя карбункула от больного сибирской язвой. Окраска по Граму.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Сибиреязвенные бациллы** – очень крупные (6-10 мкм) грамположительные палочки с обрубленными концами, в мазке из чистой культуры располагаются короткими цепочками (стрептобациллы). Неподвижны, образуют расположенные центрально споры, а также капсулы.

**Культуральные свойства:** Сибиреязвенные бациллы – аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах, при температуре 12-45 С. На жидких средах дают придонный рост в виде комочка ваты; на плотных средах образуют крупные, с неровными краями, шероховатые матовые колонии под лупой колонии напоминают гриву льва или голову медузы. На средах, содержащих 0,05- 0,5 ЕД/мл пенициллина, через 3-6 ч роста сибиреязвенные бациллы образуют сферопласты, расположенные цепочкой и напоминающие в мазке жемчужное ожерелье .

**Биохимические свойства:** Ферментирует до кислоты глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, инулин;

обладают протеолитической и липолитической активностью. Выделяет желатиназу, проявляют низкую гемолитическую, лецитиназную и фосфатазную активность.

**Антигены и факторы патогенности:** Содержат родовой соматический полисахаридный и видовой белковый капсульный антигены. Образуют белковый экзотоксин, обладающий антигенными свойствами и состоящий из нескольких компонентов (летальный, протективный и вызывающий отеки). Патогенен для человека и многих животных.

**Резистентность:** Вегетативная форма неустойчива к факторам окружающей среды, однако споры чрезвычайно устойчивы и сохраняются в окружающей среде десятки лет, выдерживают кипячение и автоклавирование. Сибиреязвенные бациллы чувствительны к пенициллину и другим антибиотикам; споры устойчивы к антисептикам и дезинфектантам. Спороцидным эффектом обладают активированные растворы хлорамина, горячего формальдегида, перекиси водорода.

**Эпидемиология и патогенез:** Источник инфекции - больные животные. Чаще крупный рогатый скот: овцы, козы, лошади, олени, буйволы, верблюды, свиньи. Человек является биологическим тупиком. Для сибирской язвы характерно множественность механизмов, путей и факторов передачи. Человек заражается в основном контактным путем, реже алиментарно, аэрогенно и др. при уходе за больными животными, убое, переработке животного сырья, употреблении мяса и других животноводческих продуктов. Восприимчивость к возбудителю относительно невысокая.

Входными воротами инфекции в большинстве случаев являются поврежденная кожа, значительно реже слизистые оболочки дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. В основе патогенеза лежит действие экзотоксина возбудителя, отдельные фракции которого вызывают коагуляцию белков, отек тканей, приводят к развитию инфекционно-токсического шока.

**Клиническая картина:** Различают кожную, легочную и кишечную формы сибирской язвы. При кожной форме на месте внедрения возбудителя появляется характерный сибиреязвенный карбункул (геморрагически-некротическое воспаление глубоких слоев кожи с некрозом кожи и образованием буро-черной корки), эта форма сопровождается отеком. Легочная и кишечная формы относятся к генерализованным формам и выражаются геморрагическим и некротическим поражением соответствующих органов.

Продолжительность инкубационного периода - от нескольких часов до 8 дней, в среднем 2-3 дня. Генерализованные формы в 100% случаев заканчиваются летально.

**Микробиологическая диагностика:** Материалом для исследования служат содержимое карбункула, мокрота, кал, кровь, моча. Микробиологическую диагностику проводят с соблюдением правил техники безопасности, как при особо опасных инфекциях. Для диагностики применяют все 5 методов микробиологической диагностики. Мазки окрашивают по грамму, а для обнаружения капсул - по Рамановскому-Гимзе, спор - по Ожешке. Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают на мясопептонный агар и мясопептонный бульон, а также заражают лабораторных животных (белых мышей, морских свинок). Выделенную чистую культуру идентифицируют по общепринятой схеме с учетом морфологии, характера роста на МПА и МПБ, биохимических и культуральных свойств. Сибиреязвенные антигены определяют в РИФ и реакции термореципитации по Асколи исследуют также трупы животных, кожу и изделия из нее, шкурки, меха, шерсть и прочие изделия из животного сырья.

**Лечение:** Применяют антибиотики и сибиреязвенные иммуноглобулины.

**Профилактика:** Для специфической профилактики используют живую сибиреязвенную вакцину СТИ (санитарно-технический институт). Для экстренной профилактики назначают сибиреязвенный иммуноглобулин.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Реакцию термореципитации обычно используют для поиска сибиреязвенного антигена в:

- А. Моче
- Б. Испражнениях
- В. Ликворе
- Г. Шерсти и шкурах животных

2. Питательные среды для культивирования возбудителя сибирской язвы:

- А. ЖСА
- Б. Кровяной агар
- В. Щелочной агар
- Г. МПА

3. Морфологические и тинкториальные свойства сибиреязвенных бацилл:

- А. Грамположительные стрептобациллы
- Б. Образуют капсулу
- В. Образуют споры
- Г. Подвижны

4. Факторы патогенности сибирязвенных бацилл:

- А. Пили
- Б. Споры
- В. Эндотоксин
- Г. Экзотоксин

5. Тест «жемчужного ожерелья» на среде с пенициллином применяют для индентификации:

- А. Иерсинии
- Б. Франциселл
- В. Бруцелл
- Г. Сибирязвенных бацилл

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(возбудители инфекций, передающихся половым путем:  
сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза).

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.

#### Студент должен знать:

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.
2. Специфическую профилактику сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.

#### Студент должен уметь:

1. Поставить реакцию связывания комплемента Вассермана.
2. Приготовить мазок и окрасить по методу Романовского-Гимзе.
3. Приготовить мазок и окрасить по методу Грама.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сифилиса, гонореи, урогенитального хламидиоза.

#### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Постановка реакции связывания комплемента Вассермана.
2. Окраска готовых мазков из исследуемого материала больного хламидиозом по Романовскому - Гимзе.
3. Окраска готовых мазков из исследуемого материала больного гонореей по Граму.

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Сифилис** — хроническое системное венерическое инфекционное заболевание с поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы с последовательной сменой стадий болезни, вызываемое бактериями вида *Treponema pallidum* (бледная трепонема) подвида *pallidum*, относящимся к роду трепонема (*Treponema*) семейства *Spirochaetaceae*.

Этиология. Сифилис передаётся в основном половым путём, в связи с чем относится к группе венерических заболеваний, или ИППП (инфекций, передаваемых половым путём). Однако возможна передача сифилиса и через кровь, например, при переливании крови заражённого сифилисом донора, или у инъекционных наркоманов при пользовании общими шприцами и/или общими ёмкостями для растворов наркотиков, или в быту при пользовании общим «кровавым» инструментом типа зубных щёток или бритв.

Бытовой «бескровный» путь заражения сифилисом также не исключён, но весьма редок и требует тесного контакта с больным третичным сифилисом, имеющим открытые сифилитические язвы или распадающиеся сифилитические гуммы, из которых возбудитель может попасть, например, на посуду, из которой пил больной. Также можно перечислить полотенца, ложки, зубные щетки, белье и пр. соприкасающиеся со слизистыми оболочками предметы. Способность мочи и пота больного передавать инфекцию не доказана, в слюне бледные трепонемы обнаруживаются только при наличии высыпаний в полости рта. Возможно, заражение ребёнка молоком матери даже при отсутствии видимых изменений в области молочной железы, также заразной является сперма, даже при отсутствии видимых патологических очагов на половом члене больного. Медицинский персонал может заразиться заболеванием при осуществлении лечебно-диагностических мероприятий, а также при вскрытии трупов больных сифилисом, особенно опасны трупы детей с первично врождённой формой заболевания.

**Патогенез.** Инкубационный период первичной стадии сифилиса составляет в среднем 3 недели (интервал от нескольких суток до 6 недель) с момента заражения. По окончании инкубационного периода в случае полового или бытового заражения в месте проникновения микроба обычно развивается первичный аффик.

Патогенез сифилиса обусловлен реакцией организма на внедрение в организм больного бледной трепонемы. Особенности возбудителя обуславливаются полиморфностью протекающих в зараженном организме процессов, в зависимости от стадии заболевания патологические изменения отличаются довольно значительно.

В классическом течении сифилитической инфекции принято выделять 4 периода:

- Инкубационный;
- Первичный;
- Вторичный;
- Третичный.

Последние три периода обнаруживаются характерной симптоматикой, инкубационный период никак себя не проявляет, и его сроки определяются лишь косвенно после появления клиники.

**Диагностика.** Диагноз сифилиса в ряде случаев можно заподозрить клинически, но основным методом диагностики и подтверждения предварительного диагноза является серодиагностика. В настоящее время для определения антител к возбудителю используется ИФА, ранее в России для этого применялась реакция Вассермана. Все методы диагностики сифилиса разделяются на следующие группы:

- Прямые и непрямые (косвенные)
- Трепонемные (специфические) и нетрепонемные (неспецифические)
- Отборочные (скрининговые) и подтверждающие (диагностические)
- Приборные, бесприборные.

Прямые трепонемные методы диагностики позволяют обнаружить возбудитель непосредственно в биоматериале. Такими методами являются темнопольная микроскопия, заражение сифилисом кроликов, культуральные методы, ПЦР диагностика.

Каждый из этих методов имеет свои специфические недостатки, которые ограничивают его массовое применение. Метод темнопольной микроскопии может обнаружить возбудитель только при свежем сифилисе, и с его помощью невозможно оценить динамику и эффективность лечения. Методика заражения сифилисом кроликов является дорогостоящей и медленной, и также не позволяет в динамике оценивать состояние больного. Выращивание бледной трепонемы на искусственных средах крайне затруднительно, в связи с чувствительностью возбудителя к условиям среды. Метод ПЦР диагностики позволяет эффективно обнаруживать возбудитель только при первичном и вторичном сифилисе, тест-системы относительно дороги, и исследования эффективности данного метода в диагностике сифилиса ещё продолжаются. Таким образом, мы видим, что методы прямой диагностики мало применимы в клинической практике, в связи с чем, основой диагностики являются различные серологические методики (непрямые).

В соответствии с действующим приказом МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» при серо- и ликвородиагностике сифилиса допускается использование следующих реакций.

- Микрореакции преципитации (непрямой скрининговый метод)
- Реакции пассивной непрямой агглютинации (РПГА)
- Реакции иммунофлуоресценции (РИФ)
- Реакции иммобилизации бледных трепонем (РИБТ)
- Иммуноферментный анализ не требует отдельной регламентации в связи с тем, в приказе № 87 не указаны.

Следует отметить, что ни один из методов диагностики не гарантирует 100 % обнаружения возбудителя. Чувствительность методов составляет 90-98 %, поэтому одновременное использование 2 различных методов исследования может с очень высокой степенью достоверности установить верный диагноз.

**Гонококки-** (*N. Gonorrhoeae*) – грамотрицательные диплококки бобовидной формы, образуют капсулу в организме, жгутиков и спор не имеют.

**Культуральные свойства.** Требуемы к питательным средам и температурный оптимум – 37 °С. Требууют свежеприготовленные влажные питательные среды с добавлением нативных белков крови, сыворотки

или асцитной жидкости. Не вызывают гемолиза на средах, содержащих кровь, на средах содержащих с добавлением молока, желатина и картофеля не растут.

Для гонококков характерна выраженная антигенная изменчивость даже в пределах одного штамма.

**Биохимические свойства:** разлагают только глюкозу с образованием кислоты. Протеолитическая активность отсутствует, аммиака, сероводорода и индола не образуют.

**Факторы патогенности гонококков:**

1. Пили - обеспечивают адгезию к клеткам цилиндрического эпителия мочеполовых путей;
2. Капсула - в свежeweделенных культурах обладает антифагоцитарным действием;
3. Клеточная стенка содержит эндотоксин.
4. Поверхностный белок 1 класса обуславливает к бактерицидным факторам;
5. Поверхностный белок 2 класса образует отдельную белковую фракцию называемые протеинами мутности или Ора – протеинами (мутность). Их считают первыми факторами вирулентности гонококков, и они обуславливают прикрепление к эпителию.
6. R- плазмиды факторы множественной лекарственной устойчивости.

Для диагностики применяют:

*Различают такие разновидности диагностики гонореи:*

1. Бактериоскопический.  
Данный метод диагностики проводят у больных (женщин и мужчин), имеющий выраженную симптоматику подострой или острой форм гонореи. Перед проведением анализа для увеличения степени его достоверности необходимо, чтобы пациент не занимался самолечением антибиотиками и не оказывал местного воздействия дезинфицирующими растворами на влагалище и уретру.
2. Бактериологический.  
Данный диагностический метод применяется у пациентов, имеющих выраженную симптоматику в комбинации с наличием подозрения на гонококк при бактериоскопии. Бактериологический анализ на гонорею можно применять как диагностический критерий излеченности от заболевания, его можно проводить через неделю после окончания курса антибиотикотерапии и местного лечения (дезинфицирующими растворами). Бактериологический метод предусматривает посев генитальных выделений на питательную среду с целью выявления их микрофлоры, при этом используются специально подготовленные питательные среды. Лабораторным материалом могут являться: выделения из шейки матки, мочеиспускательного канала, влагалища, а также прямой кишки и глотки. Проведение точной диагностики гонореи возможно при минимальном количестве имеющихся выделений. Точность метода достигает 95 - 100% (достаточно высокий уровень точности метода), однако, он имеет недостаток – процесс исследования длительный и занимает около недели.
3. Серологический метод диагностики.  
Данный анализ носит название реакции Борде-Жангу, его проводят в случае хронической гонореи, когда бактериологический анализ является отрицательным. Серологический метод выявления гонореи является вспомогательным.
4. Иммунофлюоресцентный анализ (ПИФ).  
С помощью данного диагностического метода можно выявить гонококк в ранние сроки заболевания, это имеет важное значение в случаях, когда присутствует комбинация гонококка и других микроорганизмов, например бледной трепонемы (гонорея сочетается с сифилисом).
5. Иммуноферментный анализ.  
Позволяет определить наличие в выделениях устойчивых L-форм гонококка либо наоборот, нежизнеспособных штаммов.
6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).  
ПЦР является анализом ДНК на гонорею – это метод генетической идентификации гонококка. Данный метод обладает самой высокой чувствительностью и специфичностью, диагностика гонореи данным методом достигает 98 % у мужчин и 89 % у женщин. Результаты диагностики при помощи ПЦР готовы уже через 1 – 2 дня. Однако данный метод является достаточно дорогостоящим и не все пациенты могут себе его позволить.

Причиной **урогенитальных хламидиозов** являются хламидии - грамтрицательные бактерии, которые утратили некоторые важные механизмы выработки метаболической энергии. Этот дефект обуславливает их внутриклеточный рост, благодаря которому они имеют доступ к богатым энергией промежуточным продуктам метаболизма. Их делят на два вида - *Chlamydia trachomatis*, объединяющий возбудителей болезней человека, и *Chlamydia psittaci*, включающий родственные микроорганизмы, первично поражающие млекопитающих и птиц. Вместе они образуют род *Chlamydia*, представители которого обладают бактериоподобными морфологическими характеристиками и уникальным циклом развития.

Хламидии в процессе репродукции претерпевают ряд последовательных изменений. Инфекционная частица представляет собой маленькую клетку (элементарное тельце) диаметром около 0,3 мкм с электронно-плотным нуклеоидом. Эта частица проникает в клетку хозяина при фагоцитозе. Из поверхностных мембран клетки хозяина вокруг этой маленькой частицы образуется вакуоль. Маленькая частица превращается в крупную (ретикулярное тельце), диаметром 0,5-1,0 мкм, которая лишена электронно-плотного нуклеоида. Внутри образованной мембранной вакуоли крупная частица увеличивается и многократно делится путем

образования поперечной перегородки. В конечном счете вся вакуоль заполняется мелкими частицами, образовавшимися из крупных телец при их поперечном делении, и превращается во "включение" в цитоплазме клетки хозяина. Новообразованные мелкие частицы могут выходить из клетки хозяина и инфицировать новые клетки. Цикл размножения хламидии реализуется при их взаимодействии с чувствительной клеткой и занимает 24-48 ч.

Хламидийная инфекция у мужчин и женщин наиболее часто имеет инкубационный период от 5-7 до 30 дней. Она может вызывать различную патологию.

У мужчин первично поражаются мочеиспускательный канал, а затем и другие органы (предстательная железа, семенные пузырьки, придатки). У женщин чаще поражается канал шейки матки, после чего может возникнуть и восходящая инфекция, захватывающая матку, маточные трубы, яичники, а также брюшину.

Хламидий не являются представителями нормальной микрофлоры человека. Их обнаружение указывает на инфекционный процесс, а отсутствие клинических симптомов заболевания определяет лишь временное равновесие между паразитом и хозяином в условиях, ограничивающих размножение патогенного внутриклеточного микроорганизма, но не препятствующих ему.

Клинически бессимптомная хламидийная инфекция не менее опасна, чем ее манифестные формы, и требует лечебных и профилактических мероприятий.

**Для выявления хламидийной инфекции** используют различные методы как прямого определения возбудителя, так и косвенного серологического обследования.

Материалом для исследования при урогенитальном хламидиозе являются мазки, соскобы со слизистой уретры, цервикального канала, шейки матки, прямой кишки, конъюнктивы, которые забирают специальной ложечкой, специальными тампонами, щеточками или платиновой петлей. Забор материала является самым ответственным этапом диагностики. При исследовании на хламидии культуральным методом пациенты не должны применять антибиотики и другие препараты, активные в отношении хламидии в течение месяца. Если используются цитологические методы, препараты нельзя применять за 2 недели до исследования.

Культуральный метод выявления хламидий - "золотой стандарт" - является наиболее информативным (100% чувствительность), но в силу высокой стоимости и трудоемкости не имеет широкого распространения. Этот метод очень важен при подозрении на длительную инфекцию.

Цитологический метод заключается в микроскопическом исследовании поверхностных соскобов эпителиальных клеток, взятых из уретры, цервикального канала и других слизистых оболочек с целью обнаружить хламидии. В приготовленных мазках, которые преимущественно окрашивают, определяют наличие в клеточных элементах специфических хламидийных включений. Эти внутриклеточные включения чаще выявляются при свежей и нелеченной инфекции. Метод простой, доступный, однако недостаточно чувствительный; позволяет диагностировать хламидийную инфекцию не более чем у 15-20% больных.

Иммунофлюоресцентный метод - окрашивание хламидийных антигенов иммунофлюоресцентными красителями на основе моноклональных антител. Его недостатком является субъективность оценки результатов.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике хламидийной инфекции является методом определения специфического участка ДНК с помощью ДНК-анализатора. Он обладает очень высокой чувствительностью и специфичностью.

Серологический метод выявления хламидий - обнаружение антихламидийных антител в крови. При острой инфекции диагностическое значение имеет обнаружение хламидийных иммуноглобулинов М (IgM) -антител либо 4-кратное нарастание титров иммуноглобулина G (IgG) в динамике через 2 недели. Средние и низкие титры антител к хламидиям, как правило, характерны для хламидийной клетки, поглощенной *Trichomonas vaginalis* (во время лечения происходят разрушение трихомонадной клетки и выход во внеклеточное пространство новой порции хламидии, которые, в свою очередь, стимулируют выработку антител в организме). Нельзя с уверенностью заявлять об инфицированной хламидиозом лишь на основании наличия антихламидийных антител. Только сочетание различных методов (не менее 2 одновременно и один из них ПЦР) дает необходимую точность диагностики урогенитального хламидиоза как для постановки первичного диагноза, так и для контроля излеченности.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

### 1. Грамотрицательные кокки - возбудители:

1. *Скарлатины*
2. *Гонореи*
3. *Ревматизма*
4. *Эпидемического цереброспинального менингита*

2. Какой материал для микробиологического исследования следует брать у пациентов при подозрении на гонорею?

1. Отделяемое уретры
2. Вагинальный мазок
3. Мазок из зева
4. Ректальный мазок

**3. При каких заболеваниях применяется метод «провокации»**

1. Ревматизме
2. Менингите
3. Гонорее
4. Синдроме токсического шока.

**4. Какие свойства характерны для хламидий?**

1. Грамотрицательные
2. Прокариоты
3. Облигатные внутриклеточные паразиты
4. Имеют извитую форму.

**5. Способы микроскопии спирохет:**

1. По Рамоновскому – Гимзе
2. По Граму
3. Фазово-контрастная микроскопия
4. Темнопольная микроскопия.

**6. Фибриллы располагаются у спирохет:**

1. На поверхности наружной клеточной оболочки
2. Под наружной оболочкой
3. Между оболочкой и протоплазматическим цилиндром

**7. Антигены, используемые для постановки РСК при диагностике сифилиса:**

- А. О-антиген
- Б. Кардиолипиновый
- В. Растворимый антиген
- Г. Трепонемальный специфический

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

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

**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ-ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ И КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ».**

**Учебная цель:**

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

**Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику гнойно-воспалительных инфекций.
2. Специфическую профилактику гнойно- воспалительных инфекций.

**Студент должен уметь:**

1. Приготовить мазок и окрасить по методу Грама.
2. Провести бактериологическое исследование при гнойно-воспалительных заболеваниях.

**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-кровоный агар Цейслера с культивированием в анаэробном состоянии. 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 *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-лактамазного 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 электро-дифференциальной средой для стафилококков - желточно-солевым агаром (ЖСА) Г. Н. Чистовича. Электро-дифференциальность 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 основным признаком 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  $\alpha$ -гемолитические стрептококки, окруженные небольшой зоной гемолиза с зеленовато-сероватым оттенком,  $\beta$ -гемолитические, окруженные прозрачной зоной гемолиза, и негемолитические, не изменяющие кровяной агар. Однако гемолитический признак оказался весьма вариabельным, 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 преципитином, 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 антибиотиков, 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 бета-лактамов, 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 энтеробактерий (*enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерий (*enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерий (*γ proteobacteria*), тип протеобактерий (*proteobacteria*), царство бактерии.

Род протей включает следующие виды: *proteus hauseri*, *proteus mirabilis*, *proteus myxofaciens*, *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 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 грамотрицательные 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 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 прогтерыми 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 H<sub>2</sub>S, 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, нейраминидазу. Колонизируют слизистые полости рта, верхних дыхательных путей, гениталий и кишечника.

#### ***Порфиромонады (rod 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 (rod 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 (rod Leptotrichia)***

Прямые неподвижные грамотрицательные палочки. Анаэробы. Для роста необходимо 5 % CO<sub>2</sub>. 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 (rod Fusobacterium)***

Веретенообразные, неподвижные палочки. Облигатные анаэробы. На анаэробном кровяном агаре образуют мелкие выпуклые желтоватые колонии, окруженные зоной α-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 — 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.

### **СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ**

1. При микроскопическом исследовании отделяемого фурункула выделен *S. aureus*. К какой группе представителей нормальной микрофлоры кожи относится этот микроорганизм?
2. На каких из перечисленных сред выращивают стафилококки и какие среды целесообразно использовать при проведении бактериологического исследования?  
а) МПБ или МПА;

- б) молочно-солевой агар
  - в) желчный бульон
  - г) кровяной агар
  - д) сахарный агар или бульон
  - е) желчно-солевой агар
- 3.Какая среда является селективной для стафилококков? Что обеспечивает селективность этой среды?
- 4.Каковы особенности строения клеточной стенки стафилококков по сравнению со строением клеточной стенки грамотрицательных бактерий?
- 5.Какие ферменты патогенности продуцируют стафилококки? Какова их роль в патогенезе инфекции?
- 6.Чем объясняют кардиотоксический, дерматотоксический и нейротоксический эффекты  $\alpha$  - токсина?
- 7.У 2-х летнего ребенка высокая температура, понос, резко выраженная интоксикация. Как надо провести бактериологическое исследование для постановки диагноза?
- 8.При проведении бактериологического исследования испражнений больного с клиническим диагнозом - колиэнтерит, на чашках со средой Эндо выросли колонии красного цвета типичные для кишечной палочки. Как решить вопрос патогенные это кишечные палочки или нет?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10

### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ** (возбудители сыпного тифа, чумы).

#### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сыпного тифа, чумы.

#### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику сыпного тифа, чумы
2. Специфическую профилактику сыпного тифа, чумы.

#### **Студент должен уметь:**

1. Поставить реакцию связывания комплемента при сыпном тифе.
2. Поставить реакцию агглютинации при сыпном тифе.
3. Поставить реакцию непрямой гемагглютинации при сыпном тифе.
4. Поставить реакцию иммуофлюоресценции при сыпном тифе и чуме.
5. Поставить реакцию пассивной гемагглютинации при чуме.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей сыпного тифа, чумы.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики сыпного тифа, чумы.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сыпного тифа, чумы.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.**

1. Постановка реакции связывания комплемента при сыпном тифе с двумя антигенами (из риккетсии Провачека и Музера). Учет результатов РСК(демонстрация).
2. Постановка реакции агглютинации при сыпном тифе (реакция Вейля-Феликса -к протею ОХ19). Учет результатов РА (демонстрация).
3. Постановка РНГА при сыпном тифе (с эритроцитарным антигеном).
4. Постановка РПГА с эритроцитарным диагностикумом при чуме. Учет результатов РПГА (демонстрация).
5. Постановка реакции иммуофлюоресценции (демонстрация).
6. Микроскопия готовых препаратов с возбудителем чумы и риккетсиями.

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Сыпной тиф** — группа инфекционных заболеваний, вызываемых риккетсиями, общее острое инфекционное заболевание, передающееся от больного человека к здоровому через вшей.

**Эпидемиология.** В настоящее время высокая заболеваемость сыпным тифом сохранилась лишь в некоторых развивающихся странах. Однако многолетнее сохранение риккетсий у ранее переболевших сыпным тифом и периодическое появление рецидивов в виде болезни Брилля—Цинссера не возможно при ухудшении социальных условий (повышенная миграция населения, педикулез, ухудшение питания и др.).

Источником инфекции является больной человек, начиная с последних 2—3 дней инкубационного периода и до 7—8-го дня с момента нормализации температуры тела. После этого, хотя риккетсий могут длительно сохраняться в организме, реконвалесцент уже опасен для окружающих не представляет. Сыпной тиф передается через вшей, преимущественно через платяных, реже через головных. После питания кровью больного вошь становится заразной через 5—6 дней и до конца жизни (то есть 30—40 дней). Заражение человека происходит путем втирания фекалий вшей в повреждения кожи (в расчесы). Известны случаи инфицирования при переливании крови, взятой у доноров в последние дни инкубационного периода. Риккетсия, циркулирующая в Северной Америке (*R. canada*), передается клещами.

#### **Эндемический сыпной тиф**

Эндемический сыпной тиф (крысиный, блошиный или американский сыпной тиф) вызывается риккетсиями *R. mooseri*. В США ежегодно регистрируется около 40 случаев заболевания. Оно встречается в регионах с относительно теплым климатом в обоих полушариях, преимущественно летом и в основном среди сельских жителей; протекает легче, чем эпидемический тиф. Это болезнь главным образом крыс, которая передается человеку при укусе крысиными блохами. Поэтому борьба с крысами чрезвычайно важна как мера профилактики.

#### **Эпидемический сыпной тиф**

Эпидемический сыпной тиф, известный также как классический, европейский или вшивый сыпной тиф,

корабельная или тюремная лихорадка, вызывается риккетсиями Провачека.

Возбудитель - грамотрицательная мелкая неподвижная бактерия *Rickettsia prowazekii*. Спор и капсул не образует, морфологически полиморфна: может иметь вид кокков, палочек; все формы сохраняют патогенность. Обычно их окрашивают по методу Романовского-Гимзы или серебрением по Морозову. Культивируют на сложных питательных средах, в куриных эмбрионах, в лёгких белых мышей. Размножаются только в цитоплазме и никогда в ядрах инфицированных клеток. Обладают соматическим термостабильным и типоспецифическим термолабильным антигеном, содержат гемолизины и эндотоксины. В испражнениях вшей, попадающих на одежду, сохраняет жизнеспособность и патогенность в течение 3 мес и более. При температуре 56 °С погибает за 10 мин, при 100 °С - за 30 с. Быстро инактивируется под действием хлорамина, формалина, лизола, кислот, щелочей в обычных концентрациях. Отнесена ко второй группе патогенности.

#### *Патогенез.*

Воротами инфекции являются мелкие повреждения кожи (чаще расчесы), уже через 5—15 мин риккетсий проникают в кровь. Размножение риккетсий происходит внутриклеточно в эндотелии сосудов. Это приводит к набуханию и десквамации эндотелиальных клеток. Попавшие в ток крови клетки разрушаются, высвобождающиеся при этом риккетсий поражают новые эндотелиальные клетки. Наиболее бурно процесс размножения риккетсий происходит в последние дни инкубационного периода и в первые дни лихорадки.

**Диагноз** sporadических случаев в начальный период болезни (до появления типичной экзантемы) очень труден. Серологические реакции становятся положительными также лишь с 4—7-го дня от начала болезни. Во время эпидемических вспышек диагноз облегчается эпидемиологическими данными (сведения о заболеваемости, наличии завшивленности, контакт с больными сыпным тифом и др.). При появлении экзантемы (то есть с 4—6-го дня болезни) клинический диагноз уже возможен. Сроки появления и характер сыпи, гиперемия лица, энантема Розенберга, пятна Киари—Авцына, изменения со стороны нервной системы — все это позволяет дифференцировать в первую очередь от брюшного тифа (постепенное начало, заторможенность больных, изменения со стороны органов пищеварения, более позднее появление экзантемы в виде розеола-папулезной мономорфной сыпи, отсутствие петехий и др.).

Необходимо дифференцировать и от других инфекционных болезней, протекающих с экзантемой, в частности, с другими риккетсиозами (эндемический сыпной тиф, клещевой риккетсиоз Северной Азии и др.). Некоторое дифференциально-диагностическое значение имеет картина крови. При сыпном тифе характерным является умеренный нейтрофильный лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом, эозинопения и лимфопения, умеренное повышение СОЭ.

Для подтверждения диагноза используют различные серологические реакции. Сохранила некоторое значение реакция Вейля—Феликса — реакция агглютинации с протеем OXig, особенно при нарастании титра антител в ходе болезни. Чаще используют РСК с риккетсиозным антигеном (приготовленным из риккетсий Провачека), диагностическим титром считается 1:160 и выше, а также нарастание титра антител. Используют и другие серологические реакции (реакция микроагглютинации, гемагглютинации и др.).

В меморандуме совещания ВОЗ по риккетсиозам (1993) в качестве рекомендуемой диагностической процедуры рекомендована непрямая реакция иммунофлюоресценции. В острую фазу болезни (и периода реконвалесценции) антитела связаны с IgM, что используется для отличия от антител в результате ранее перенесенной болезни. Антитела начинают выявляться в сыворотке крови с 4—7-го дня от начала болезни, максимального титра достигают через 4-6 нед от начала заболевания, затем титры медленно снижаются. После перенесенного сыпного тифа риккетсий Провачека в течение многих лет сохраняются в организме реконвалесцента, это обуславливает длительное сохранение антител (связаны с IgG также в течение многих лет, хотя и в невысоких титрах). В последнее время с диагностическими целями используют пробную терапию антибиотиками тетрациклиновой группы. Если при назначении тетрациклина (в обычных терапевтических дозах) через 24—48 ч не наступает нормализация температуры тела, то это позволяет исключить сыпной тиф (если лихорадка не связана с каким-либо осложнением).

Основным *этиотропным препаратом* в настоящее время являются антибиотики тетрациклиновой группы, при непереносимости их эффективным оказывается и левомицетин (хлорамфеникол).

Для *профилактики* сыпного тифа большое значение имеет борьба со вшивостью, ранняя диагностика, изоляция и госпитализация больных сыпным тифом, необходима тщательная санитарная обработка больных в приемном покое стационара и дезинсекция одежды больного. Для *специфической профилактики* использовалась инактивированная формалином вакцина, содержащая убитые риккетсии Провачека. Вакцины использовались во время повышенной заболеваемости и были эффективными. В настоящее время при наличии активных инсектицидов, эффективных методов этиотропной терапии и низкой заболеваемости значение противосыпнотифозной вакцинации значительно снизилось.

**Чума** (лат. *pestis* — зараза) — острое природно-очаговое инфекционное заболевание группы карантинных инфекций, протекающее с исключительно тяжёлым общим состоянием, лихорадкой, поражением лимфоузлов, лёгких и других внутренних органов, часто с развитием сепсиса. Заболевание характеризуется высокой летальностью и крайне высокой заразностью.

Чумная палочка (лат. *Yersinia pestis*) — бактерия, открытая в 1894 году одновременно двумя учёными: французом Александром Йерсеном и японцем Китасато Сибасабуро.

Инкубационный период длится от нескольких часов до 3—6 дней. Наиболее распространённые формы чумы — бубонная и лёгочная. Смертность при бубонной форме чумы достигала 95 %, при лёгочной — 98-99 %.

В настоящее время при правильном лечении смертность составляет 5-10 %.

Известные эпидемии чумы, унёсшие миллионы жизней, оставили глубокий след в истории человечества.

Возбудитель чумы устойчив к низким температурам, хорошо сохраняется в мокроте, но при температуре 55 °С погибает в течение 10—15 мин, а при кипячении — практически немедленно. Попадает в организм через кожу (при укусе блохи, как правило, *Xenopsylla cheopis*), слизистые оболочки дыхательных путей, пищеварительного тракта, конъюнктивы.

По основному носителю природные очаги чумы подразделяют на сусликовые, сурочьи, песчаночьи, полевоучьи и пищуховые. Помимо диких грызунов, в эпизоотический процесс иногда включаются так называемые синантропные грызуны (в частности, крысы и мышевидные), а также некоторые дикие животные (зайцы, лисы), являющиеся объектом охоты. Из домашних животных чумой болеют верблюды.

В природном очаге заражение обычно происходит через укус блохи, ранее питавшейся на больном грызуне. При укусе заражённых чумными бактериями блох у человека на месте укуса может возникнуть папула или пустула, наполненная геморрагическим содержимым (кожная форма). Затем процесс распространяется по лимфатическим сосудам без проявления лимфангита. Размножение бактерий в макрофагах лимфатических узлов приводит к их резкому увеличению, слиянию и образованию конгломерата (бубонная форма). Дальнейшая генерализация инфекции, которая не является строго обязательной, тем более в условиях современной антибактериальной терапии, может приводить к развитию септической формы, сопровождающейся поражением практически всех внутренних органов. Однако с эпидемиологических позиций важнейшую роль играют «отсевы» инфекции в лёгочную ткань с развитием лёгочной формы болезни. С момента развития чумной пневмонии больной человек сам становится источником заражения, но при этом от человека к человеку уже передаётся лёгочная форма болезни — крайне опасная, с очень быстрым течением.

**Установление точного диагноза** необходимо осуществить с помощью бактериологических исследований. Материалом для них является пунктат нагноившегося лимфатического узла, мокрота, кровь больного, отделяемое свищей и язв.

Лабораторная диагностика осуществляется с помощью флюоресцентной специфической антисыворотки, которой окрашивают мазки отделяемого язв, пунктата лимфатических узлов, культуры, полученной на кровяном агаре.

Впервые вакцину против чумы создал в начале XX века Владимир Хавкин.

Лечение больных чумой в настоящее время сводится к применению антибиотиков, сульфаниламидов и лечебной противочумной сыворотки. Профилактика возможных очагов заболевания заключается в проведении специальных карантинных мероприятий в портовых городах, дератизации всех судов, которые ходят международными рейсами, создании специальных противочумных учреждений в степных местностях, где водятся грызуны, выявлении эпизоотий чумы среди грызунов и борьбе с ними. Вспышки заболевания до сих пор встречаются в некоторых странах Азии, Африки и Южной Америки.

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11

##### **ТЕМА: ГРИБЫ И ПРОСТЕЙШИЕ - ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА.**

##### **СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ. ГРИБЫ И ПРОСТЕЙШИЕ - ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА».**

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики заболеваний, вызываемые грибами и простейшими.

##### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику глубоких и поверхностных микозов.
2. Биологические свойства и лабораторную диагностику кандидоза.
3. Биологические свойства и лабораторную диагностику протозойных инфекций.

##### **Студент должен уметь:**

1. Провести микроскопическое исследование готовых препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе при токсоплазмозе, малярии.
2. Приготовить и окрасить мазки из исследуемого материала больного кандидозом по Граму и Романовскому -Гимзе.

3. Провести микологическое исследование для диагностики кандидоза и поверхностных микозов.
4. Провести исследование нативных препаратов и мазков, окрашенных раствором Люголя при амебиазе.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия возбудителей глубоких и поверхностных микозов, микотоксикозов, кандидоза; их основные биологические свойства. Характер вызываемых заболеваний с элементами эпидемиологии и патогенеза, иммунитет.
2. Факторы, способствующие возникновению кандидоза (дисбактериоз, иммунодефициты).
3. Принципы микробиологической диагностики микозов, микотоксикозов, кандидоза;
4. Препараты для этиотропной терапии микозов, микотоксикозов, кандидоза;
5. Таксономия возбудителей **протозойных инфекций** (токсоплазмоза, малярии, амебиаза); их основные биологические свойства, циклы развития. Характер вызываемых заболеваний с элементами эпидемиологии и патогенеза, иммунитет.
6. Принципы микробиологической диагностики токсоплазмоза, малярии, амебиаза.
7. Препараты для этиотропной терапии, иммунотерапии и иммунопрофилактики токсоплазмоза, малярии, амебиаза.
8. Сдача модуля.

#### ***САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.***

1. Проведение микроскопического исследования готовых препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе при токсоплазмозе, малярии.
2. Приготовление и окраска мазков из исследуемого материала больного кандидозом по Граму и Романовскому-Гимзе.
3. Проведение микологического исследования для диагностики кандидоза и поверхностных микозов (посев на среду Сабуро и учет результатов со среды Сабуро. Микроскопическое и макроскопическое изучение колоний кандиды (демонстрация)).
4. Проведение исследования нативных препаратов и мазков, окрашенных раствором Люголя при амебиазе.

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Грибы** (Fungi, Mycetes) — разнородная группа эукариотических микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цито-плазматическую мембрану (которая содержит фосфолипиды и стеролы) и мощную клеточную стенку, состоящую из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др. Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов — фикомицетов — не имеют перегородок. У высших грибов — эумицетов — гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный. Грибы размножаются спорами, половым и бесполом способами, а также вегетативным путем (почкование или фрагментация гиф). Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным. Несовершенными называют грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения. Бесполое размножение осуществляется у грибов с помощью эндогенных спор, созревающих внутри круглой структуры — спорангия, и экзогенных спор — конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

Грибы можно разделить на 7 классов: хитридиомицеты, гифохитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты. Подавляющее большинство грибов, вызывающие заболевания у человека (микозы), относятся к несовершенным грибам. Для диагностики микозов могут быть использованы микроскопические (культуральные), аллергические, серологические, биологические и гистологические методы исследования. Материалом для исследования могут быть гной, мокрота, пораженные волосы, ногти, чешуйки кожи, пунктаты костного мозга, лимфатических узлов, внутренних органов, кровь, желчь, испражнения, биоптаты тканей и т. п. Для окраски мазков чаще всего используют методы Грама, Циля-Нильсена, Романовского-Гимзы.

#### **Плазмодии малярии.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Haemosporina.

К роду Plasmodium относятся более 100 видов простейших, паразитирующих на различных позвоночных: рептилиях, птицах и млекопитающих. Паразитами человека являются 4 вида малярийных

плазмодиев. *Plasmodium vivax*-возбудитель трехдневной малярии, *Plasmodium malariae* - возбудитель четырехдневной малярии, *Plasmodium falciparum* – возбудитель тропической малярии и *Plasmodium ovale* – возбудитель – возбудитель малярии-овале.

Малярийные плазмодии – паразиты со сложным гетероксическим развитием, включающим фазу полового размножения, в течение которого они облигатно связаны с двумя хозяевами (окончательным и промежуточным). Человек является промежуточным хозяином малярийных плазмодиев, так как в его организме происходит бесполовая фаза жизненного цикла паразитов. Окончательный хозяин малярийных паразитов – кровососущий комар рода *Anopheles*, в организме которого проходит половая фаза их жизненного цикла, которая завершается образованием в теле комара большого количества длинных тонких одноядерных клеток – спорозоитов. Они концентрируются в огромных количествах в слюнных железах комара. При укусе комара спорозоиты из слюнных желез попадают в кровь позвоночного хозяина.

**Лабораторная диагностика** проводится путем микроскопического исследования мазков крови больного, окрашенных краской Романовского – Гимзе. При этом дифференциация видов плазмодиев основана на морфологических особенностях паразитов, а также пораженных эритроцитов. В ряде случаев используется серодиагностика (реакция иммунофлюоресценции, пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ).

#### **Токсоплазма.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Eimeriina, семейства Eimeriidae.

Возбудитель токсоплазмоза представлен единственным видом *Toxoplasma gondii*.

Возбудитель токсоплазмоза -*Toxoplasma gondii*-внутриклеточный паразит, поражающий практически все органы и ткани теплокровных животных, птиц и человека. В соответствии с отечественной классификацией его относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности (условно-патогенные микроорганизмы).

Паразиты обладают гетероксическим развитием, включающим половое и бесполое размножение со сменой хозяев. Основным хозяином токсоплазмы является кошка, в эпителиальных клетках кишечника которой образуются ооцисты. Промежуточные хозяева паразита – многочисленные виды птиц и млекопитающих, в том числе и человек. Жизненный цикл токсоплазм включает несколько морфологических стадий: 1) эндозоиты (трофозоиты) и цистозоиты – вне и внутриклеточные стадии, во время которых паразит находится в разных органах и тканях промежуточных хозяев (включая человека) и размножается бесполым путем (эндодигония и эндополигония), 2) мерозоиты – внутри- и внеклеточные формы, паразитирующие в эпителиальных клетках кишечника основного хозяина – кошки. Размножаются посредством шизогонии; 3) микро- и макрогаметы-половые стадии развития, образующиеся в основном хозяине – кошке. При слиянии мужских и женских клеток (соответственно, микрогамет и макрогамет) возникает зигота, которая затем превращается в покоящуюся стадию –ооцисту. Ооцисты выводятся во внешнюю среду вместе с фекалиями кошки; 4) спорозоиты – инвазионная стадия, образующаяся в результате спорогонии внутри ооцисты вне организма основного хозяина.

В качестве материала для исследования используют пунктат лимфатических узлов, спинномозговую жидкость, кровь, гистологические срезы, лимфатических узлов, миндалин, кусочки органов трупа, головной мозг, печень, селезенку, легкие, а в случае патологической беременности – плаценту и околоплодную жидкость.

**Микроскопия.** Исследование мазков и гистологических препаратов требует внимания и опыта, так как количество токсоплазм в материале невелико и их можно спутать с другими образованиями. Токсоплазмы имеют полулунную или аркообразную форму длиной 4-7 мкм, шириной 2-4 мкм. Один конец возбудителя заострен, а другой – несколько закруглен. При окраске по Романовскому-Гимзе цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около 1/3-1/4 его тела, - рубинного красный.

#### **Амебиаз.**

Тип Sarcomastigophora, подтип Sarcodina, класс Lobosea, отряд Amoebida.

Дизентерийная амеба *Entamoeba histolytica* (микроорганизмы 4 группы патогенности) открыта Ф.А. Лешем в 1875 г. Она является обитателем толстой кишки человека и в своем развитии (жизненный цикл) проходит 2 стадии – вегетативную и стадию покоя. На вегетативной стадии развития амеба существует в четырех формах: 1) тканевой; 2) большой вегетативной (форма magna), просветной-мелкой вегетативной (форма minuta) и 4) предцистной.

При остром амебиазе обнаруживают тканевую и большую вегетативную, а у реконвалесцентов и цистовыделителей – просветную и предцистную форму.

Материалом для исследования служат испражнения, гной из пораженных органов, мокрота и др.

**Микроскопия.** Исследуют нативные препараты и мазки, окрашенные раствором Люголя, смесью Сафарлиева, а также препараты, обработанные железным гематоксилином по Гейдегайну или другими красителями.

## **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

1. Какие микроорганизмы относят к эукариотам?

- а) бактерии;
- б) грибы;
- в) спирохеты;
- г) микоплазмы;

- д) простейшие.
2. Какие микроорганизмы относят к прокариотам?
- а) актиномицеты;  
 б) грибы;  
 в) спирохеты;  
 д) микоплазмы.
3. Грибы размножаются:
- а) почкованием;  
 б) спорами;  
 в) фрагментацией мицелия;  
 г) половым способом.
4. К методам обнаружения грибов относят:
- а) окраска метиленовой синью;  
 б) исследование нативных препаратов («раздавленная капля»);  
 в) электронная микроскопия;  
 г) окраска по методу Гинса-Бурри.
5. Грибы из рода *Candida* относят:
- а) к плесневым грибам;  
 б) к лучистым грибам;  
 в) к дрожжеподобным грибам;  
 г) к дрожжевым грибам.

#### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12**

#### **ТЕМА: ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ** ***(возбудители гепатитов А и Е, полиомиелита).***

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гепатитов А и Е, полиомиелита.

##### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику гепатитов А и Е, полиомиелита.
2. Специфическую профилактику гепатитов А и Е, полиомиелита.

##### **Студент должен уметь:**

1. Поставить и учесть результаты цветной пробы при полиомиелите.
2. Поставить и учесть результаты РНГА для сероидентификации при гепатитах А, Е.
3. Поставить и учесть результаты ИФА для серодиагностики при гепатитах А, Е.

##### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гепатитов А и Е, полиомиелита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гепатитов А и Е, полиомиелита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гепатитов А и Е, полиомиелита.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Разбор постановки и учет результатов цветной пробы при полиомиелите (демонстрация).
2. Разбор постановки и учет результатов РНГА для сероидентификации при гепатитах А, Е (демонстрация).
3. Разбор постановки и учет результатов ИФА для серодиагностики при гепатитах А, Е (демонстрация).

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Гепатит А** - доброкачественное остроциклическое энтеровирусное заболевание, характеризующееся цитопатическим действием вируса на гепатоциты. Клинически проявляется синдромом интоксикации, гепатоспленомегалией и часто — желтухой.

*Этиология и патогенез Гепатита А* - возбудитель — энтеровирус типа 72 (род Enterovirus, семейство Picornaviridae). Попадает в кишечник, из которого быстро проникает в кровь, вызывая вирусемию. В дальнейшем реплицируется в гепатоцитах, оказывая на них прямое цитопатическое действие, в результате чего происходит дезинтеграция мембран гепатоцитов и внутриклеточных органелл. Выход из клеток гидролаз ведет к развитию цитолиза и некробиоза печеночных клеток. Одновременно развивается воспалительный процесс в соединительной ткани печени и холестаза.

*Эпидемиология Гепатита А* - источником инфекции является человек с манифестными и инаппарантными проявлениями болезни. Выделение вируса происходит с фекальными массами, механизм передачи — фекально-оральный. Отмечается летне-осенняя сезонность заболевания.

*Симптомы Гепатита А* - инкубационный период продолжается 3—4 нед. Начальный период заболевания (продромальный, дожелтушный) характеризуется достаточно большим разнообразием симптомов. Наиболее часто встречается лихорадочное (гриппоподобное) течение, при котором заболевание начинается остро, с повышения температуры от субфебрильных до высоких цифр, легких катаральных симптомов, мышечных болей. Одновременно больные отмечают явления дискомфорта в эпигастрии, снижение аппетита, тошноту, иногда — рвоту после приема пищи. Возможны и другие проявления заболевания, в том числе — по астеновегетативному варианту. В ряде случаев уже в этом периоде можно обнаружить увеличенную печень и повышение уровня аминотрансфераз. Продолжительность начального периода — в среднем около недели. Переход от дожелтушного к желтушному периоду плавный. К этому моменту нормализуется температура, исчезают катаральные явления, однако диспепсические симптомы сохраняются или даже их интенсивность возрастает. Первым признаком наступления желтушного периода является потемнение мочи. Вскоре развивается желтуха, которую прежде всего можно заметить на слизистых ротовой полости (под уздечкой языка) и на склерах, а затем — на кожных покровах. Язык обложен, стул может обесцвечиваться. Печень увеличена, достаточно плотной консистенции, слегка болезненная при пальпации. В половине случаев обнаруживается спленомегалия. На фоне желтухи, помимо диспепсических явлений, больные отмечают адинамию, головокружение, иногда — расстройства сна. Появляется брадикардия, АД склонно к снижению. Течение заболевания обычно легкое или среднетяжелое, но не исключены и тяжелые варианты, и обострения.

*Дифференциальная диагностика Гепатита А* в продромальном периоде необходима с острыми респираторными и кишечными инфекциями, гриппом. В желтушном периоде заболевание дифференцируют с обтурационными и гемолитическими желтухами, мононуклеозом, иерсиниозом, лептоспирозом.

*Лабораторная диагностика Гепатита А* приобретает особую роль в определении этиологии гепатита и оценке его тяжести. Возможно выделение вируса гепатита А из фекалий, но в широкой медицинской практике вирусологические исследования не применяются. Для верификации диагноза используют серологические реакции — ИФА, радиоиммунного анализа (РИА), в которых обнаруживается нарастание титров IgM-anti-HAV в желтушном периоде и титров IgG-anti-HAV к периоду реконвалесценции. При анализе крови необходимо учитывать наличие лейкопении, относительного лимфоцитоза и замедление СОЭ. Интенсивность желтухи устанавливают по уровню билирубина в крови (особенно — его связанной фракции). Активность аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) увеличивается в несколько раз, и степень их повышения говорит об интенсивности цитолиза гепатоцитов. На нарушение белково-синтетической функции печени указывают изменения показателей коллоидных проб (снижение — сулемовой и повышение — тимоловой), снижение уровня альбуминов в крови и протромбинового индекса.

*Лечение Гепатита А* при установлении этиологического фактора лечение можно проводить в амбулаторных условиях. На период выраженности интоксикационного синдрома назначают постельный режим, рекомендуют полноценное питание с дополнительным включением в рацион витаминов групп С и В. Для снятия интоксикации в зависимости от ее степени применяются обильное питье или инфузионные растворы. Реконвалесценты подлежат диспансерному наблюдению в течение 3 мес.

*Профилактика Гепатита А* в настоящее время в качестве специфической профилактики предложена вакцина против гепатита А, эффективность ее обсуждается. Неспецифическая профилактика проводится по общим принципам профилактики кишечных инфекций.

**Вирусный гепатит Е** - вирусная инфекция из условной группы фекально-оральных гепатитов, характеризующаяся поражением печени, острым циклическим течением и тяжёлыми проявлениями у беременных.

*Краткие исторические сведения.* Вирусный гепатит Е выделен из группы гепатитов «ни А, ни В» на основе маркерной диагностики, доказательств фекально-орального механизма и преимущественно водного пути передачи, полученных при ретроспективном анализе (1980) крупной водной вспышки в Индии, наблюдавшейся в 1955 г. Позднее М.С. Балаян с соавт. (1982) выявил вирусоподобные частицы в фекалиях больного вирусным гепатитом Е и подтвердил самостоятельность данной нозологической формы в опыте самозаражением.

*Этиология.* Возбудитель - РНК-геномный вирус, условно включённый в род Calicivirus, хотя в генетическом отношении он имеет существенные различия. Вирионы округлой формы, лишены суперкапсида. В целом вирусный гепатит Е менее устойчив, чем вирусный гепатит А. Он хорошо сохраняется при температуре - 20 °С и ниже. Быстро разрушается при замораживании-оттаивании, под действием хлорсодержащих или иодсодержащих дезинфекционных средств.

*Эпидемиология.* Резервуар и источник инфекции - человек, больной или носитель. Период контагиозности

источника точно не установлен, вероятно, он аналогичен таковому при вирусном гепатите А. Вирус обнаруживают в фекалиях в ранние сроки болезни в 15% случаев при лёгких и среднетяжёлых формах; при тяжёлом течении его обнаруживают почти у 50% больных. Доказана патогенность вирусного гепатита Е для шимпанзе, свиней и других животных.

Механизм передачи - фекально-оральный, путь передачи - преимущественно водный. Имеются данные о распространении возбудителя и контактно-бытовым путём. Предполагают возможность заражения вирусным гепатитом Е при употреблении в пищу сырых моллюсков. В пользу воды как главного фактора передачи инфекции свидетельствуют низкая очаговость, возникновение массовых заболеваний, связанных с сезонами дождей и с высоким стоянием уровня грунтовых вод.

**Лабораторная диагностика.** Основу составляет обнаружение антигенов вирусного гепатита Е с помощью ПЦР и выявление IgM и IgG к антигенам вирусного гепатита Е.

**Профилактика и меры борьбы.** Особое значение уделяют обеззараживанию воды. Меры специфической профилактики не разработаны. Имеются рекомендации о введении беременным специфического иммуноглобулина.

**Полиомиелит (от др.-греч. πολίος — серый и μυελός — спинной мозг)** — детский спинномозговой паралич, острое, высококонтагиозное инфекционное заболевание, обусловленное поражением серого вещества спинного мозга полиовирусом и характеризующееся преимущественно патологией нервной системы. В основном, протекает в бессимптомной или стертой форме. Иногда случается так, что полиовирус проникает в ЦНС, размножается в мотонейронах, что приводит к их гибели, необратимым парезам или параличам иннервируемых ими мышц.

**Этиология.** Возбудитель (poliovirus hominis) относится к семейству пикорнавирусов, к группе энтеровирусов (кишечным вирусам), куда входят также Коксаки- и ЕСНО-вирусы и существует в виде 3 независимых типов (I, II и III). Наиболее часто встречается 1 тип. Размеры вируса — 8—12 нм, содержит РНК. Устойчив во внешней среде (в воде сохраняется до 100 суток, в испражнениях — до 6 мес), хорошо переносит замораживание, высушивание. Не разрушается пищеварительными соками и антибиотиками. Культивируется на клеточных культурах, обладает цитопатогенным действием. Погибает при кипячении, под воздействием ультрафиолетового облучения и дезинфицирующих средств. Источник инфекции — человек (больной или переносящий заражение бессимптомно); возбудитель выделяется через рот (несколько суток), а затем с испражнениями (несколько недель, а иногда и месяцев). Заражение может произойти воздушно-капельным путём, но чаще — при попадании в рот активного вируса (через загрязнённые руки, пищу). Механическим переносчиком вируса могут быть мухи.

Заболеваемость полиомиелитом преобладает в летне-осенние месяцы. Чаще болеют дети от 6 месяцев до 5 лет. Большинство заболеваний связано с вирусом типа I.

Проникнув в организм, вирус размножается в лимфатическом глоточном кольце (миндалины), кишечнике, регионарных лимфатических узлах, проникает в кровь, а в некоторых случаях и в центральную нервную систему, вызывая её поражение (особенно двигательных клеток передних рогов спинного мозга и ядер черепно-мозговых нервов). В большинстве случаев полиомиелит протекает бессимптомно и инфекцию можно обнаружить лишь с помощью лабораторных исследований. В других случаях после инкубационного периода (3-35, чаще 9-11 сут) появляются признаки заболевания.

**Классификация**

**1. По типу :**

Типичные (с поражением ЦНС)

Непаралитические (менингеальная, абортивная)

Паралитические (спинальная, бульбарная)

Атипичные

Стертая

Бессимптомная

**2. По тяжести:**

Легкая форма

Среднетяжелая форма

Тяжелая форма

**Критерии тяжести:**

Выраженность синдрома интоксикации

Выраженность двигательных нарушений

**3. По течению (характеру)**

Гладкое

Негладкое

С осложнениями

С наложением вторичной инфекции

С обострением хронических заболеваний

**Абортивная форма протекает** с общими неспецифическими симптомами (катаральные явления, желудочно-кишечные расстройства, общая слабость, повышение температуры тела и т. п.); эти случаи наиболее опасны в

эпидемиологическом отношении.

*Менингеальная форма* проявляется в виде серозного менингита.

*При наиболее частой из паралитических форм полиомиелита* — спинальной — после общеинфекционных симптомов появляются параличи мышечных групп, иннервируемых двигательными клетками спинного мозга; на ногах чаще всего поражаются: четырёхглавая мышца, приводящие мышцы, сгибатели и разгибатели стопы; на руках: дельтовидная, трёхглавая и супинаторы предплечья. Особенно опасен паралич диафрагмы, приводящий к тяжёлому нарушению дыхания.

*Бульбарная форма* обусловлена поражением различных отделов продолговатого мозга, а понтинная — поражением ядра лицевого нерва.

*При непаралитических формах* заболевание обычно заканчивается полным выздоровлением, при паралитических формах в некоторых случаях функции пораженных мышц восстанавливаются не полностью, дефект сохраняется длительно, иногда пожизненно. Наиболее тяжёлые случаи, особенно с поражением дыхательных центров продолговатого мозга, могут привести к летальному исходу. Диагноз полиомиелит ставят на основании клинических, эпидемиологических и лабораторных данных.

*Эпидемиология.* Источником инфекции является больной или вирусоноситель, при этом наиболее опасны пациенты со стёртыми и abortивными формами заболевания. Инфекция передаётся фекально-оральным (грязные руки, игрушки, инфицированные продукты питания) и воздушно-капельным путём. Восприимчивость к вирусу полиомиелита всеобщая, однако наиболее восприимчивы дети в возрасте до 7 лет. При этом паралитическая форма встречается не более, чем в 1% случаев, а стёртые, инаппарантные и abortивные формы диагностируются только в очаге инфекции при лабораторном обследовании контактных с заболевшими полиомиелитом лиц. Дети первых 2—3 месяцев жизни, благодаря полученному трансплацентарно от матери иммунитету, полиомиелитом практически не болеют. Повторные случаи заболевания практически не регистрируются, так как после перенесенного заболевания вырабатывается стойкий иммунитет и наблюдается невосприимчивость клеток слизистой оболочки кишечника к гомологичным типам вируса.

*Диагностика.* Идентификация возбудителя полиомиелита имеет особое значение, так как многие энтеровирусы и герпесвирусы способны вызывать похожие поражения. Материалы для исследований — кровь, СМЖ, кал.

Выделение возбудителя полиомиелита проводят в первичных культурах ткани (эмбрионы) или культурах клеток HeLa, Нер-2, СОЦ и др. Идентификацию полиовирусов осуществляют по цитопатическому эффекту и в РН с типовой аптисывороткой.

Вирусспецифические АТ к полиомиелиту определяют в сыворотке и СМЖ; выявление высоких титров IgM указывает на наличие инфекции.

*Вакцинация.* Первые полиомиелитные вакцины появились в 1950—1960-х годах. Они сразу понизили заболеваемость по всему миру. Существует два типа вакцин: инактивированная Солка (повышенная иммуногенность для подкожного введения) и живые вакцины Чумакова и Сэбина (для приема внутрь). В состав вакцин вместе с иммуногенными компонентами входят неомицин, стрептомицин и полимицин. Эти препараты не позволяют расти бактериям. Обе вакцины могут быть как 3х валентны, так и моновалентны. Для плановой вакцинопрофилактики используют трехвалентные вакцины. Моновалентные рекомендовано применять в условиях эпидемической вспышки, вызванной одним из трех типов вируса.

Инактивированная вакцина содержит вирус полиомиелита, убитый формалином. Она вводится трехкратно внутримышечно и вызывает выработку специфического гуморального иммунитета. Живая полиомиелитная вакцина содержит живой ослабленный (аттенуированный) вирус, вводится перорально, стимулирует помимо гуморального еще и тканевой иммунитет.

Живой вакциной детей иммунизируют, начиная с 1,5-годовалого возраста, несколько раз по определённой схеме, с интервалами в 45 дней и более. Вакцину дают через рот, в виде капель или конфет, либо вводят внутримышечно. До этого возраста, с 3-х месяцев применяют инактивированную (не живую) вакцину.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Для серодиагностики вирусных гепатитов применяют:
  - а) реакцию торможения гемагглютинации;
  - б) иммуноферментный анализ;
  - в) реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации;
  - г) реакцию гемагглютинации;
  - д) реакцию агглютинации на стекле.
2. Для плановой специфической профилактики полиеимелита используют:
  - а) живую вакцину;
  - б) анатоксин;
  - в) убитую вакцину;
  - г) специфическую сыворотку;
  - д) интерферон.
3. Вирусы полиомиелита относят к семейству
  - а) калицивирусов
  - б) ретровирусов

- в) поксвирусов
- г) пикорнавирусов

4. Основной путь передачи вируса гепатита А
- а) парентеральный
  - б) воздушно-капельный
  - в) фекально-оральный
  - г) контактный
5. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус гепатита Е?
- а) РНК
  - б) ДНК
  - в) ДНК и РНК

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13

**ТЕМА:** ***ВИРУСЫ - ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ**(возбудители гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита).*

**Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.

**Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.
2. Специфическую профилактику гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.

**Студент должен уметь:**

1. Поставить и учесть результаты РИФ при ОРВИ.
2. Поставить и учесть результаты РТГА для сероидентификации при гриппе.
3. Поставить и учесть результаты ИФА для серодиагностики при ОРВИ.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Разбор поставки и учет результатов РИФ при ОРВИ (демонстрация).
2. Разбор поставки и учет результатов РТГА для сероидентификации при гриппе (демонстрация).
3. Разбор поставки и учет результатов ИФА для серодиагностики при ОРВИ (демонстрация).

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Грипп (от фр. *grippe*)** — острое инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусом гриппа. Входит в группу острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Периодически распространяется в виде эпидемий и пандемий. В настоящее время выявлено более 2000 вариантов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром.

Впервые вирус был выделен в 30-е года XX века. Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, которое включает роды *Influenza A*, *B*, *C*. Антигенные свойства внутренних белков вириона (M1 и NP) определяют принадлежность вируса гриппа к роду *A*, *B* или *C*.

Эпидемическое значение для людей имеют вирусы, содержащие три подтипа NA (H1, H2, H3) и два подтипа NA (N1, N2). Вирусы гриппа *A* и *B* содержат NA и HA в качестве основных структурных и антигенных компонентов вирусной частицы, обладающих гемагглютинирующей и нейраминидазной активностями. У

вируса гриппа С нет нейраминидазы, он обладает вместо этого гемагглютинин-эстеразным (проникающим) белком (НЕФ). Нить РНК окружена белком и упакована в липопротеидную мембрану. Вирионы способны агглютинировать эритроциты и элюироваться в них с помощью вирусспецифических ферментов.

Вирус гриппа имеет сферическую форму диаметром 80—120 нм, в центре находятся РНК-фрагменты, заключённые в липопротеидную оболочку, на поверхности которой имеются «шипы» состоящие из гемагглютинина (Н) и из нейраминидазы (N). Антитела, вырабатываемые в ответ на гемагглютинин (Н), составляют основу иммунитета против определённого подтипа возбудителя гриппа

Источником инфекции является больной человек с явной или стёртой формой болезни, выделяющий вирус с кашлем, чиханием и т. д. Больной заразен с первых часов заболевания и до 5–7-го дня болезни.[5] Характеризуется аэрозольным (вдыхание мельчайших капель слюны, слизи, которые содержат вирус гриппа) механизмом передачи и чрезвычайно быстрым распространением в виде эпидемий и пандемий. Эпидемии гриппа, вызванные серотипом А, возникают примерно каждые 2—3 года, а вызванные серотипом В — каждые 4—6 лет. Серотип С не вызывает эпидемий, только единичные вспышки у детей и ослабленных людей. В виде эпидемий встречается чаще в осенне-зимний период. Периодичность эпидемий связана с частым изменением антигенной структуры вируса при пребывании его в естественных условиях.

Входными воротами для вируса гриппа являются клетки мерцательного эпителия верхних дыхательных путей — носа, трахеи, бронхов. В этих клетках вирус размножается и приводит к их разрушению и гибели. Этим объясняется раздражение верхних дыхательных путей кашель, чихание, заложенность носа. Проникая в кровь и вызывая виремию, вирус оказывает непосредственное, токсическое действие, проявляющееся в виде повышения температуры, озноба, миалгий, головной боли. Кроме того, вирус повышает сосудистую проницаемость, вызывает развитие стазов и плазмо-геморрагий.

Традиционным способом предупреждения заболевания гриппом является вакцинация. Предложена вакцина для профилактики гриппа в форме живой, убитой (инактивированной), субъединичной вакцины. Вакцинация особенно показана в группах риска — дети, пожилые люди, больные с хроническими заболеваниями сердца и лёгких, а также врачи. Обычно осуществляется, когда эпидемиологический прогноз свидетельствует о целесообразности массовых мероприятий (обычно в середине осени). Возможна и вторая прививка в середине зимы.

Для быстрой диагностики гриппа используют "экспресс-метод" обнаружения вируса гриппа с помощью флуоресцирующих антител. Исследуемый материал берут из носа в первые дни болезни. Приготовленные из него мазки обрабатывают специфическими гриппозными флуоресцирующими сыворотками. Образовавшийся комплекс антиген- антитело ярко светится в ядре и цитоплазме клеток цилиндрического эпителия и отчетливо виден в люминесцентном микроскопе. Ответ можно получить через 2-3 ч.

Серологические исследования помогают ретроспективной диагностике гриппа. Исследуют парные сыворотки крови, взятые у больных в острый период болезни (до 5-го дня от начала заболевания) и в период реконвалесценции с интервалом 12-14 дней. Наиболее показательными в серологической диагностике являются реакция связывания комплемента (РСК) с гриппозными антигенами и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Диагностическим считается нарастание титра антител в 4 раза и более.

**Корь (лат. Morbilli)** — острое инфекционное вирусное заболевание с высоким уровнем восприимчивости (индекс контагиозности приближается к 100 %), которое характеризуется высокой температурой (до 40,5 °С), воспалением слизистых оболочек полости рта и верхних дыхательных путей, конъюнктивитом и характерной пятнисто-папулезной сыпью кожных покровов, общей интоксикацией.

Возбудителем кори является РНК-вирус рода морбилливирусов, семейства парамиксовирусов, имеет сферическую форму и диаметр 120—230 нм. Состоит из нуклеокапсида — спирали РНК плюс три белка и внешней оболочки, образованной матричными белками (поверхностными гликопротеинами) двух типов — один из них гемагглютинин, другой «гантелеобразный» белок.

Вирус малоустойчив во внешней среде, быстро погибает вне человеческого организма от воздействия различных химических и физических факторов (облучение, кипячение, обработка дезинфицирующими средствами).

Несмотря на нестойкость к воздействию внешней среды, известны случаи распространения вируса на значительные расстояния с потоком воздуха по вентиляционной системе — в холодное время года в одном отдельно взятом здании. Ослабленные штаммы коревого вируса используются для производства живой противокоревой вакцины.

Путь передачи инфекции — воздушно-капельный, вирус выделяется во внешнюю среду в большом количестве больным человеком со слюной во время кашля, чихания и т. д.

Источник инфекции — больной корью в любой форме, который заразен для окружающих с последних дней инкубационного периода (последние 2 дня) до 4-го дня высыпаний. С 5-го дня высыпаний больной считается незаразным.

Корью болеют преимущественно дети в возрасте 2—5 лет и значительно реже взрослые, не переболевшие этим заболеванием в детском возрасте. Новорожденные дети имеют колостральный иммунитет, переданный им от матерей, если те переболели корью ранее. Этот иммунитет сохраняется первые 3 месяца жизни. Встречаются случаи врожденной кори при трансплацентарном заражении вирусом плода от больной матери.

После перенесенного заболевания развивается стойкий иммунитет, повторное заболевание корью человека, без сопутствующей патологии иммунной системы, сомнительно, хотя и такие случаи описаны. Большинство случаев кори наблюдаются в зимне-весенний (декабрь-май) период с подъемом заболеваемости каждые 2—4 года.

Инкубационный период 8—14 дней (редко до 17 дней). Острое начало — подъем температуры до 38—40 °С, сухой кашель, насморк, светобоязнь, чихание, осиплость голоса, головная боль, отек век и покраснение конъюнктивы, гиперемия зева и коревая энантема — красные пятна на твердом и мягком нёбе. На 2-й день болезни на слизистой щек у коренных зубов появляются мелкие белесые пятнышки, окруженные узкой красной каймой — пятна Бельского — Филатова — Коплика — патогномоничные для кори. Коревая сыпь (экзантема) появляется на 4—5-й день болезни, сначала на лице, шее, за ушами, на следующий день на туловище и на 3-й день высыпания покрывают разгибательные поверхности рук и ног, включая пальцы. Сыпь состоит из мелких папул, окруженных пятном и склонных к слиянию (в этом ее характерное отличие от краснухи — сыпь при которой не сливается).

Обратное развитие элементов сыпи начинается с 4-го дня высыпаний — температура нормализуется, сыпь темнеет, буреет, пигментируется, шелушится (в той же последовательности, что и высыпания). Пигментация сохраняется 1—1,5 недели.

*Микробиологическая диагностика.* Исследуют смыв с носоглотки, соскобы с элементов сыпи, кровь, мочу. Вирус кори можно обнаружить в патологическом материале и в зараженных культурах клеток с помощью РИФ, РТГА и реакции нейтрализации. Характерно наличие многоядерных клеток и антигенов возбудителя в них. Для серологической диагностики применяют РСК, РТГА и реакцию нейтрализации.

*Специфическая профилактика.* Активную специфическую профилактику кори проводят подкожным введением детям первого года жизни или живой коревой вакцины из аттенуированных штаммов, или ассоциированной вакцины (против кори, паротита, краснухи). В очагах кори ослабленным детям вводят нормальный иммуноглобулин человека. Препарат эффективен при введении не позднее 7-го дня инкубационного периода.

**Эпидемический паротит** (лат. parotitis epidemica: свинка, заушница) — острое доброкачественное инфекционное заболевание, с негнойным поражением железистых органов (слюнные железы, поджелудочная железа, семенники) и ЦНС, вызванное парамиксовирусом. Название «эпидемический паротит» считается устаревшим. Сейчас это заболевание чаще называют «паротит». На латыни околоушная слюнная железа называется glandula parotidea, а её воспаление — паротит; => отсюда произошло название болезни. Наиболее часто болеют дети в возрасте от 3 до 15 лет.

Заражение происходит воздушно-капельным путём (при кашле, чихании, разговоре) от больного человека, который заражен до 9-х суток.

*Возбудитель* РНК-содержащий вирус из семейства парамиксовирусов (Paramyxoviridae). Возбудитель паротита был впервые выделен и изучен в 1934 Э.Гудпасчером и К.Джонсоном.

Вирионы полиморфны, округлые вирионы имеют диаметр 120—300 нм. Однонитевая и нефрагментированная «минус» РНК кодирует 8 белков, в том числе Н-, N- и F-белки суперкапсидной оболочки. Вирус обладает гемагглютинирующей, нейраминидазной и гемолитической активностью.

После перенесённого эпидемического паротита остаётся стойкий иммунитет.

*Инкубационный период.* Больной заразен за два дня до начала болезни. Инкубационный период (от момента заражения до развития симптомов): 11 — 23 дней; чаще 13 — 19 дней

*Профилактика.* Вакцинация: ассоциированная вакцина КПК(корь, паротит, краснуха). Проводится в 12 месяцев и в 6 лет.

*Лабораторная диагностика.* Используют вирусологический и серологический методы. Выделение вируса из крови, слюны и цереброспинальной жидкости является бесспорным подтверждением диагноза. В реакции торможения гемагглютинации выявляют антитела (антигемагглютинины) к вирусу ЭП. Комплементсвязывающие антитела появляются на 2—5-й день болезни и сохраняются в сыворотке крови длительно, что позволяет использовать РСК как для ранней, так и ретроспективной диагностики. Диагностическим является нарастание титра специфических антител в 4 раза и более. При однократном серологическом обследовании в периоде ре-конвалесценции диагностическим считается титр 1:80 и более.

**Ветряная оспа (ветрянка)** — это инфекционное заболевание, причиной которого является вирус герпеса (Varicella-Zoster). Ветряная оспа является одной из наиболее распространенных и чрезвычайно заразных инфекций детского возраста. Возбудителем ветрянки является вирус герпеса.

Основным симптомом ветрянки у детей является появление мелких пузырчатых высыпаний на коже всего тела. Лечение ветрянки у детей заключается в обработке высыпаний зеленкой. При высокой температуре ребенку дают жаропонижающее. Чаще всего ветряной оспой болеют дети в возрасте до 10 лет. Как правило, ветрянка передается воздушно-капельным путем. Источником инфекций являются больные ветрянкой дети. Инкубационный период при ветряной оспе составляет от 10 до 23 дней. Характерным проявлением ветряной оспы у детей является сыпь. Высыпания при ветрянке у детей чаще локализуются на лице, волосистой части головы. С течением ветряной оспы высыпания появляются на всем теле. Высыпания при ветрянке представляют собой небольшие пятна красного цвета (1-5 мм). Через 2-5 дней после начала ветрянки на месте пятен появляются пузырьки (волдыри). На 7 день после начала ветряной оспы ребенок перестает быть заразным. В течение нескольких дней пузырьки лопаются и на их месте образуются корочки светло-

коричневого цвета. Как правило, высыпания при ветрянке у детей сопровождаются зудом и повышением температуры тела (до 39°C).

*Диагностика* ветрянки производится очень просто – по внешнему виду и характеру высыпаний. Диагностика ветрянки возможна после физического осмотра, который сопровождается изучением истории болезни пациента.

Для ранней лабораторной диагностики используют метод непрямой иммунофлюоресценции, а также РСК в более позднем периоде.

**Краснуха** (лат. rubella) или 3-я болезнь — эпидемическое вирусное заболевание с инкубационным периодом около 15-24 дней. Это обычно неопасное заболевание, затрагивающее в основном детей, но оно может спровоцировать серьезные врожденные пороки, если женщина заражается в начале беременности. Название третьей болезни происходит из времен, когда был составлен список болезней, провоцирующих детскую сыпь, в котором она перечислена третьей.

После инкубационного периода 2—3 недели появляется умеренная температура с головной болью, фарингитом, шейной аденопатией, конъюнктивитом. Высыпание появляется через 48 часов, сыпь макулезная (пятнистая) не зудящая, вначале на лице, потом спускается на все тело в течение нескольких часов, вначале сыпь морбилиформная (напоминает коревую), затем скарлатиноформная. Она преобладает на лице, в области пояса и ягодиц, разгибательных поверхностях рук, ног. Сыпь держится 2—4, изредка 5—7 дней, затем исчезает без пигментации и шелушения. Нужно отметить, что довольно часты смягченные и асимптоматичные формы.

**Патогенез.** Вирус краснухи при естественной инфекции проникает в организм через слизистые оболочки дыхательных путей, хотя в эксперименте на добровольцах удавалось вызвать заболевание и при интрадермальном введении вируса. В дальнейшем наступает вирусемия. Гематогенно вирус разносится по всему организму, обладает дерматотропными свойствами, вызывает изменения лимфатических узлов, которые увеличиваются уже в конце инкубационного периода. В это время вирус можно выделить из носоглотки. С появлением сыпи вирус в крови и в носоглотке не обнаруживается, но в некоторых случаях выделение его продолжается 1-2 нед после высыпания. Антитела в сыворотке появляются через 1-2 дня после высыпания. В дальнейшем титр их нарастает. После перенесенного заболевания антитела сохраняются в течение всей жизни. Титр комплементсвязывающих антител постепенно снижается. Иммуитет стойкий пожизненный.

*Диагноз* краснухи можно подтвердить или посредством выделения и идентификации вируса, или по нарастанию титров специфических антител. Для этой цели используют различные реакции: РСК, иммуоферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции, а также выявление специфических антител класса. Серологические реакции ставят с парными сыворотками с интервалом 10-14 дней. Диагностическим является нарастание титра антител в 4 раза и более. Выделение и идентификация вируса довольно сложны и в практической работе почти не используются.

*Специфическая профилактика.* Используют живую ослабленную вакцину «Рудивакс», а также комбинированную вакцину против кори, эпидемического паротита, краснухи - «ММР». С целью профилактики врожденной краснухи следует вакцинировать девочек в возрасте 12-16 лет с последующей ревакцинацией серонегативных перед планируемой беременностью.

Вакцинировать беременных нельзя: беременность нежелательна в течение 3 мес. после иммунизации против краснухи (не исключается возможность поствакцинального поражения плода). Введение краснушной вакцины сопровождается выработкой у 95% иммунизированных специфических антител.

В случае контакта беременной с больным краснухой вопрос о сохранении беременности следует решать с учетом результатов 2-кратного серологического обследования (с обязательным определением количественного содержания специфических иммуноглобулинов классов М и G). При наличии у беременной стабильного титра специфических антител контакт следует считать не опасным.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Вирус птичьего гриппа относится
  - а) к вирусу гриппа типа С
  - б) к вирусу гриппа типа А
  - в) к вирусу гриппа типа В
  - г) к вирусу гриппа типа Д
2. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус кори?
  - а) РНК
  - б) ДНК
  - в) ДНК и РНК.
3. Вирус ветряной оспы относится к группе вирусов:
  - а) ДНК-геномных;

- б) РНК-геномных;
- в) сложных.

4. Интерферон обеспечивает противовирусную защиту клетки, т.к. препятствует:

- а) адсорбции вируса на клетке;
- б) проникновению вируса в клетку;
- в) репродукции вируса;
- г) лизису пораженной клетки;
- д) активации киллеров.

5. Установить серологический тип вируса гриппа можно с помощью:

- а) реакции агглютинации на стекле;
- б) реакции торможения гемагглютинации;
- в) реакции непрямой гемагглютинации;
- г) реакции гемагглютинации.

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14

#### **ТЕМА: ВИРУСЫ ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

*(возбудители бешенства, вирусы герпеса).*

#### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики бешенства, герпеса.

#### **Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику бешенства, герпеса.
2. Специфическую профилактику бешенства, герпеса.

#### **Студент должен уметь:**

1. Провести микроскопию готовых препаратов, окрашенных по Романовскому–Гимзе, для обнаружения включений Бабеша-Негри при бешенстве.
2. Поставить и учесть результаты ИФА для серодиагностики герпеса.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей бешенства, вирусов герпеса.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики бешенства, герпеса.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики бешенства, герпеса.

#### ***САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА***

1. Проведение микроскопии готовых препаратов, окрашенных по Романовскому–Гимзе, для обнаружения включений Бабеша-Негри при бешенстве (демонстрация).
2. Разбор постановки и учет результатов ИФА для серодиагностики герпеса (демонстрация).

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Бешенство** (другие названия: рабиес (лат. rabies), устаревшее — гидрофобия, водобоязнь) — инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства Rabies virus, включённого в род Lyssavirus семейства Rhabdoviridae.

Вирус бешенства вызывает специфический энцефалит (воспаление головного мозга) у животных и человека. Передаётся со слюной при укусе больным животным. Затем, распространяясь по нервным путям, вирус достигает слюнных желёз и нервных клеток коры головного мозга, гиппокампа, бульбарных центров, и, поражая их, вызывает тяжёлые необратимые нарушения.

Выделяют 3 стадии болезни: I - начальную, II - возбуждения, III - паралитическую. Первая стадия начинается с общего недомогания, головной боли, небольшого повышения температуры тела, мышечных

болей, сухости во рту, снижения аппетита, болей в горле, сухого кашля, может быть тошнота и рвота. В месте укуса появляются неприятные ощущения - жжение, покраснение, тянущие боли, зуд, повышенная чувствительность. Больной подавлен, замкнут, отказывается от еды, у него возникает необъяснимый страх, тоска, тревога, депрессия, реже - повышенная раздражительность. Характерны также бессонница, кошмары, обонятельные и зрительные галлюцинации.

**Лабораторная диагностика.** С помощью метода флюоресцирующих антител возбудитель можно обнаружить в мазках эпителия роговицы и срезах кожи из области шеи на уровне роста волос.

Положительные результаты обусловлены миграцией вируса из мозга по нервным волокнам, которыми богаты роговица и волосяные фолликулы.

Серологическая диагностика возможна у больных, вышедших из острой фазы заболевания.

В крови и цереброспинальной жидкости появляются нейтрализующие антитела, концентрация которых может достигать очень высокого уровня. Используют РН, РСК, РПГА.

**Герпес** (греч. *ἑρπης* — ползучая, распространяющаяся кожная болезнь) — вирусное заболевание с характерным высыпанием сгруппированных пузырьков на коже и слизистых оболочках.

Простой герпес (*Herpes simplex*) — группа скученных пузырьков с прозрачным содержимым на воспалённом основании. Герпесу предшествует зуд, жжение кожи, иногда озноб, недомогание.

Опоясывающий лишай (*Herpes zoster*) — характеризуется болью по ходу нерва, головной болью. Через несколько дней на участке кожи по ходу нерва появляются высыпания в виде сгруппированных пузырьков сначала с прозрачным, а позже гнойным кровянистым содержимым. Увеличиваются лимфатические узлы, повышается температура тела, нарушается общее состояние. Невралгические боли могут держаться до нескольких месяцев.

**Патогенез.** Вирус герпеса передается непосредственным контактным путем, а также посредством предметов обихода. Возможна также передача инфекции воздушно-капельным путем. Герпес проникает через слизистые оболочки полости рта, верхних дыхательных путей и половых органов. Преодолев тканевые барьеры, вирус попадает в кровь и лимфу. Затем попадает в различные внутренние органы.

Вирус проникает в чувствительные нервные окончания и встраивается в генетический аппарат нервных клеток. После этого удалить вирус из организма невозможно, он останется с человеком на всю жизнь. Иммунная система реагирует на проникновение герпеса выработкой специфических антител, блокирующих циркулирующие в крови вирусные частицы. Характерно пробуждение инфекции в холодное время года, при простудных заболеваниях, при гиповитаминозе. Размножение герпеса в клетках эпителия кожи и слизистых оболочек приводит к развитию дистрофии и гибели клеток.

Согласно исследованиям учёных Колумбийского университета, герпес является стимулирующим фактором для развития болезни Альцгеймера. Позднее эти данные были независимо подтверждены исследователями из Манчестерского университета. Ранее та же группа исследователей под руководством Рут Ицхаки доказала, что вирус простого герпеса обнаруживается в мозге почти 70 % пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, они подтвердили, что при инфицировании вирусом культуры клеток мозга происходит значительное увеличение уровня бета-амилоида, из которого и формируются бляшки. В ходе последнего исследования ученые смогли выяснить, что 90 % бляшек в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера содержат ДНК простого герпеса — ВПГ-1.

Для диагностики герпетической инфекции используются все лабораторные реакции — от цитологических исследований до молекулярно-биологических методов.

Материалом для выделения вируса с целью диагностики герпетической инфекции может служить содержимое герпетических пузырьков, соскобы с роговой оболочки и жидкости из передней камеры глаза, кровь, слюна, моча, спинномозговая жидкость фекалии кусочки ткани мозга, печени, почек, селезенки, легких лимфатические узлы, взятые на био- или аутопсии.

Инфекционный материал можно длительно хранить при  $-70^{\circ}\text{C}$ , тогда как при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  он быстро инактивируется. Вируссодержащие ткани могут быть сохранены более 6 месяцев при  $4^{\circ}\text{C}$ , если они находятся в 50% растворе глицерина.

Существует целый ряд специальных методов для выявления вирусных антигенов, специфических антител и вирусиндуцированных морфологически измененных клеток.

Наиболее доступным и технически несложным является цитологический метод, позволяющий изучить морфологические изменения в клетках, инфицированных вирусом простого герпеса. Эффективность метода зависит от получения достаточного количества клеток для исследования. Наличие внутриядерных включений, характерных для репродукции вируса герпеса, служит подтверждением диагноза. Следует помнить, что внутриядерные включения обнаруживаются только после немедленной фиксации мазков соскоба в абсолютном спирте с последующей окраской по Романовскому-Гимзе. Морфологические изменения, индуцируемые вирусом простого герпеса, можно также обнаружить в срезах тканей инфицированных органов. Характерным для герпетической инфекции является: наличие многоядерных клеток, внутриядерных включений и в некоторых случаях геморрагии. При генерализованной форме заболевания многоядерные клетки с эозинофильными включениями находят в зонах некротизированных тканей различных органов (мозг, печень, почки, надпочечники, эпителий бронхов и трахеи).

Метод иммунофлуоресценции — является методом экспресс-диагностики герпетической инфекции и позволяет в течение 1-2 часов определять наличие герпесвирусных антигенов в клиническом материале (соскоб

с кожи и слизистых оболочек, срезы биопсированных органов). Идентификация антигенов вируса простого герпеса может быть выполнена в различных модификациях метода иммунофлуоресценции — прямой, непрямой, с применением меченого комплемента.

Из серологических методов идентификации наиболее часто используют реакцию связывания комплемента (РСК), особенно в микромодификации ее постановки. Микрометоды используют и для выявления вируса простого герпеса в реакциях нейтрализации, пассивной гемагглютинации и в других серологических тестах. Чувствительность перечисленных методик различна.

В настоящее время одним из наиболее чувствительных методов диагностики герпетической инфекции является метод иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий обнаруживать, в зависимости от вида биологического материала, как вирусспецифические антигены, так и вирусспецифические антитела класса IgM, IgG.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус бешенства?
  - а) РНК
  - б) ДНК
  - в) ДНК и РНК.
2. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус герпеса?
  - а) РНК
  - б) ДНК
  - в) ДНК и РНК.
3. Вирус ветряной оспы относится к группе вирусов:
  - а) ДНК-геномных;
  - б) РНК-геномных;
  - в) сложных.
4. Интерферон обеспечивает противовирусную защиту клетки, т.к. препятствует:
  - а) адсорбции вируса на клетке;
  - б) проникновению вируса в клетку;
  - в) репродукции вируса;
  - г) лизису пораженной клетки;
  - д) активации киллеров.
5. В патогенезе вирусных болезней решающую роль играет:
  - а) вирулентность вируса;
  - б) токсигенность вируса;
  - г) уровень лизоцима;
  - д) реакция организма на клетки, пораженные вирусом.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №15

**ТЕМА: ВИРУСЫ–ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
*(возбудители гепатитов В,С,Д,Е, ВИЧ- инфекции, возбудители клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций).*  
**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «ВИРУСЫ -ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА».**

### Учебная цель:

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

**Студент должен знать:**

1. Биологические свойства и лабораторную диагностику гепатитов В, С, Д, G, ВИЧ-инфекции.
2. Специфическую профилактику гепатитов В, С, Д, G, ВИЧ-инфекции.
3. Биологические свойства и лабораторную диагностику клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций.
4. Специфическую профилактику клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций.

**Студент должен уметь:**

1. Поставить и учесть результаты реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитах В, С, Д, G, ВИЧ-инфекции.
2. Поставить и учесть результаты РПГА при гепатите В.
3. Поставить и учесть результаты РТГА и ИФА для серодиагностики при клещевом энцефалите и арбовирусных инфекций.

**ПЛАН:**

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

***САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА***

1. Разбор постановки и учет результатов реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитах В, С, Д, G, 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 неперенным 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 - HBs антигеном (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 -антигения 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- антигемии: 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[81]. 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 ней.

**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 нестоек 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, «разделение» РНК. Затем в клетке начинается репликация РНК и белков капсида, формируется зрелый вирион. Путём 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 нм. 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  $t^{\circ}$  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 мышах 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.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

- ВИЧ относится к группе вирусов:
  - ДНК-геномных;
  - РНК-геномных;
  - сложных.
- Семейство ретровирусов отличается наличием
  - РНК-полимеразы
  - ДНК-полимеразы
  - эндонуклеазы
  - обратной транскриптазы
  - экзонуклеазы
- Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус гепатита В?
  - РНК
  - ДНК
  - ДНК и РНК
- В патогенезе СПИДа важное место занимает:
  - трансформация PrP<sup>c</sup>-белков в PrP<sup>sc</sup>-белки;
  - безудержная пролиферация В-лимфоцитов;
  - накопление патологических миеломных белков;

- г) поражение Т-хелперов и макрофагов.
5. В патогенезе вирусных болезней решающую роль играет:
- а) вирулентность вируса;
  - б) токсигенность вируса;
  - г) уровень лизоцима;
  - д) реакция организма на клетки, пораженные вирусом.

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16

#### **ТЕМА:** *МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДЫ, ВОЗДУХА, АПТЕЧНОЙ ПОСУДЫ.*

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологического контроля воды, воздуха, аптечной посуды.

##### **Студент должен знать:**

1. Исследование общей микробной обсемененности дистиллированной воды, используемой для приготовления инъекционных растворов в соответствии с требованиями Фармакопеи.

##### **Студент должен уметь:**

1. Провести микробиологическое исследование воды, воздуха, аптечной посуды.

##### **ПЛАН:**

- 5. Методы микробиологического контроля воды.
- 6. Исследование общей микробной обсемененности дистиллированной воды, используемой для приготовления инъекционных растворов в соответствии с требованиями Фармакопеи.
- 7. Методы микробиологического контроля воздуха.
- 8. Методы микробиологического контроля аптечной посуды.

#### **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**

##### **2. 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.

##### **3. 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<br>(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<br>Число микробов в 1м <sup>3</sup> |
|----------------------------------------------------|--------------|------------|-----------------------------------------------|
| 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 закупоривающую 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 объеме 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<sup>3</sup>. Наличие бактерий группы БГКП в дистиллированной воде не допускается.

*Вода дистиллированная* для приготовления инъекционных растворов и глазных капель. Отбор проб проводят в стерильные флаконы в объеме 15—20мл непосредственно из тех емкостей, в которых осуществляют стерилизацию.

*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" сырье 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.

- Инъекционные растворы до стерилизации отбирают во время их приготовления, но не позднее 1,5 ч и доставляют в тех флаконах, в которых их будут стерилизовать.
- Инъекционные растворы, глазные капли после стерилизации и приготовленные асептическим способом доставляют в аптечной упаковке.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какие среды необходимы для микробиологического контроля и аптечной посуды?
  - 1.МПА
  2. Среда Эндо
  3. ЖСА
  4. Сабуро.
  5. Тиогликолевая среда
2. Какие среды необходимы для микробиологического контроля дистиллированной воды?
  - 1.МПА
  2. Среда Эндо
  3. ЖСА
  4. Сабуро.
  5. Тиогликолевая среда
  6. все ответы неправильные.
3. Какие среды необходимы для микробиологического контроля лекарственных средств?
  - 1.МПА
  2. Среда Эндо
  3. ЖСА
  4. Сабуро.
  5. Тиогликолевая среда.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17

**ТЕМА: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.  
ВОЗДУХА, АПТЕЧНОЙ ПОСУДЫ.**

### Учебная цель:

- 1.Обучить студентов методам микробиологического контроля различных форм стерильных готовых лекарственных средств: испытанию стерильности готовых лекарственных форм, испытанию стерильности стерильных готовых лекарственных форм.

### Студент должен знать:

- 1.Методы микробиологического контроля различных форм стерильных

готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм, испытание стерильности стерильных готовых лекарственных форм.

**Студент должен уметь:**

1. Провести микробиологическое исследование стерильных готовых лекарственных средств.

**ПЛАН:**

1. Источники и пути микробного загрязнения готовых лекарственных средств.
2. Основные методы микробиологического контроля различных форм стерильных готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм, испытание стерильности стерильных готовых лекарственных форм.

**САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Проведение микробиологического исследования стерильных готовых лекарственных средств.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

***Бактериологическое исследование стерильных лекарственных средств:***

Инъекционные растворы, глазные капли, лекарственные средства для новорожденных, другие лекарственные препараты, стерилизуемые в процессе их изготовления, засевают неразведенными в тиогликолевую среду для определения микробной обсемененности и среду Сабуро для выявления дрожжевых и плесневых грибов. Посевы на тиогликолевой среде выдерживают 14 суток при 37<sup>0</sup>С, на среде Сабуро 14 суток при 24<sup>0</sup>С. Учет результатов посевов проводят по отсутствию видимых изменений в посевах.

*Например:* Перед посевом ампулы (флаконы) протирают спиртом и обжигают в пламени горелки. Из вскрытых в стерильных условиях ампул (флаконов) стерильной пипеткой набирают 0,5—1 мл материала и высевают в пробирки или колбочки с мясопептонным сахарным или глюкозным бульоном, вводя пипетку до дна. На скошенный МПА делают высев штрихом бактериологической петлей.

Для выявления анаэробов посев проводят в полужидкий МПА или среду Китта-Тароцци; для обнаружения плесневых грибов и дрожжей — на среду Сабуро и бульон.

Посевы для выявления аэробов и анаэробов культивируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 8 сут, а для выявления плесневых грибов и дрожжей — при 22—25<sup>0</sup>С.

Посевы ежедневно проверяют. При обнаружении роста на средах, засеянных из неразлитой продукции, повторно исследуют удвоенное количество образцов. Из пробирок с проросшими микробами, готовят мазки и окрашивают их по Граму для изучения морфологии микробов, вызвавших загрязнение препаратов. При наличии роста микробов хотя бы в одной пробирке проводят дополнительные повторные исследования. В случае повторного прорастания в средах тех же микробов, что и в первый раз, препарат считают нестерильным. При обнаружении роста из разлитой и фасованной продукции посевы проводят также из удвоенного количества образцов. При обнаружении роста при повторном контроле в отдельных пробирках допускается исследование препарата в третий раз. В случае роста при третьем испытании, хотя бы в отдельных пробирках, препарат считается нестерильным.

Масляные растворы препаратов в количестве 1 мл перед посевом эмульгируют встряхиванием с бусами в 5 мл стерильного физиологического раствора. По 1 мл полученной взвеси высевают в пробирки с 10 мл МПБ с 0,5% глюкозы, со скошенным МПА и со средой Сабуро. Все посевы, кроме посева на среду Сабуро, выдерживают при 37<sup>0</sup>С в течение 8 сут. Посевы на среде Сабуро выдерживают при 22<sup>0</sup>С. При посеве суспензий из препарата питательная среда мутнеет или выпадает осадок. Такие посевы выдерживают в термостате в течение 3 сут, а затем высевают по 1 мл в пробирки с аналогичными незасеянными средами и ставят в термостат на 5 сут, инкубируют при 37<sup>0</sup>С.

Стерильными считаются препараты, посевы которых не дали роста ни в одной пробирке (флаконе) через 8 сут с начала посева или через 5 сут с момента пересева.

***4.6. Определение пирогенности:***

Пирогенность (повышение температуры тела) обусловлена наличием в стерильных лекарственных препаратах продуктов распада бактерий (липополисахаридов). Стерильные инъекционные растворы должны быть апиогенны.

Определение пирогенности проводят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, весом 2,5-3,0 кг, содержащихся на полноценном рационе. Испытуемую дистиллированную воду или лекарственные средства вводят трем кроликам в ушную вену в количествах и растворителях, предусмотренных соответствующими инструкциями.

Воду для инъекций и раствор лекарственного средства считают непирогенными если сумма повышений температуры у 3 кроликов меньше или равна  $1,4^{\circ}\text{C}$ . Если сумма превышает  $2,2^{\circ}\text{C}$ , то испытуемые растворы считают пирогенными. В случаях, когда сумма повышений температуры у 3 кроликов находится в пределах от  $1,5$  до  $2,2^{\circ}\text{C}$ , испытание проводят на 5 кроликах. В этом случае раствор считают непирогенным, если сумма повышений температуры у всех 8 кроликов не превышает  $37^{\circ}\text{C}$ .

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какие среды необходимы для микробиологического контроля стерильных лекарственных средств?

1. МПА
2. Среда Эндо
3. ЖСА
4. Сабуро.
5. Тиогликолевая среда

2. Какие среды необходимы для выявления анаэробов?

1. Полужидкий МПА
2. Среда Китта-Тароцци;
3. Сабуро.
4. Эндо

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18

**ТЕМА: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.**

**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: « ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ  
МИКРОБИОЛОГИЯ».**

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологического контроля различных форм нестерильных готовых лекарственных средств: испытанию стерильности готовых лекарственных форм, испытанию чистоты нестерильных готовых лекарственных форм.

#### Студент должен знать:

1. Методы микробиологического контроля различных форм нестерильных готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм, испытание чистоты нестерильных готовых лекарственных форм.
2. Допустимые нормы микробной обсемененности различных форм нестерильных готовых лекарственных средств в соответствии с нормативными документами.

#### Студент должен уметь:

1. Провести микробиологическое исследование нестерильных готовых лекарственных средств.

#### ПЛАН:

1. Основные методы микробиологического контроля различных форм нестерильных готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм.
2. Испытание микробной чистоты нестерильных готовых лекарственных форм.
3. Допустимые нормы микробной обсемененности различных форм нестерильных готовых лекарственных средств в соответствии с нормативными документами.
4. Сдача модуля.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Разбор схемы микробиологического исследования нестерильных готовых лекарственных средств (демонстрация).
2. Оформление протокола исследования нестерильных готовых лекарственных средств.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### **Определение микробной обсемененности готовых лекарств:**

Жидкие лекарственные формы разводят стерильным физиологическим раствором 1:10 (или 1:100) и засевают в объеме 0,5 мл на МПА в чашке Петри. 1г порошка или таблеток помещают в пробирку с 10 мл физиологического раствора и после растворения производят посев на МПА.

Мягкие лекарственные формы (мази, пасты) в количестве 1 г взвешивают в асептических условиях, переносят в пробирки с 10 мл стерильного 1,4% раствора натрия гидрокарбоната для диспергирования, которое производят вращательным движением пробирки между ладонями в течение 2-4 мин., 0,5 мл полученного раствора засевают на МПА в чашках Петри. Чашки с посевами помещают в термостат на 48 ч, затем подсчитывают число колоний и определяют количество бактерий в 1 мл или 1 г образца.

#### **4.4. Определение общего количества грибов:**

Определение общего количества грибов проводят на твердой среде Сабуро, на которую засевают 0,5 мл цельного или разведенного 1:10 препарата. Посевы инкубируют при 24<sup>0</sup>С в течение 5 суток, затем подсчитывают число выросших колоний и определяют количество грибов в 1 мл (1 г) препарата.

#### **4.5. Качественное определение условно - патогенных и патогенных микроорганизмов:**

1. Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella).

Посев лекарственных средств производят на среду Эндо и висмут -сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамтрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae.

2. Определение патогенных стафилококков.

Определение патогенных стафилококков производят посевом на кровяной (КА) и желточно - солевой агары (ЖСА). Посевы инкубируют в течение суток при 37С. На следующий день исследуют выросшие колонии на средах. На КА отмечают наличие или отсутствие гемолиза. На ЖСА – вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с радужным венчиком по периферии и перламутровым оттенком. Выделенную чистую культуру исследуют на наличие плазмокоагулазы. Для постановки реакции на плазмокоагулазу плазму крови, разведенную в 2 раза, разливают по 0,4мл в пробирки, вносят туда по одной петле каждой исследуемой культуры стафилококка и помещают в термостат при 37 С. Через 2, 4 и 24 ч отмечают результаты опыта. При наличии плазмокоагулазы образуется сгусток. В некоторых случаях наряду с плазмокоагулазой и лецитиназой определяют фибринолизин, гиалуронидазу и ДНК-азу.

3. Выявление Pseudomonas aeruginosa.

При исследовании воды очищенной инъекционных растворов до стерилизации, глазных капель, смывов с аптечного стекла, инвентаря, оборудования и рук персонала иногда отмечается рост синегнойной палочки, для выделения которой специальные посевы можно не производить, так как рост их колоний удается обнаружить на среде Эндо или питательном агаре. На среде Эндо колонии плоские желтовато-красные, без металлического блеска, со специфическим запахом. На питательном агаре колонии расплывчатые, с просвечивающим краем; среда приобретает зеленоватый цвет. При окраске по Граму палочки грамотрицательные. С целью обнаружения способности продуцировать пигмент, культуры изучают на питательном агаре с добавлением 2% глицерина или маннита. Синегнойная палочка на этой среде образует зеленоватые флуоресцирующие колонии, выделяющие в среду сине - зеленый пигмент.

Идентификация синегнойной палочки проводится по следующим тестам:

- положительная реакция на оксидазу;
- рост на среде Симмонса;
- разжижение желатина;
- рост на бульоне при температуре 42°С;
- отсутствие роста на среде с содержанием хлорида натрия 6,5%.

4. Выявление протей. Производят посевом на МПА по Шукевичу.

Специального посева для выявления этих бактерий можно не проводить, т.к. их удается обнаружить на среде Эндо в виде ползучего вуалеобразного роста. В случае выделения бактерий рода Протея необходимо проводить их видовую идентификацию с применением среды Гисса с мальтозой и изучением способности образовывать индол. Эти тесты дают возможность идентифицировать протейс вульгарис и протейс мирабилис.

Наличие условно - патогенных и патогенных микроорганизмов в лекарственных препаратах недопустимо.

#### **Методика определения микробной загрязненности не инъекционных лекарственных средств**

Для определения микробной загрязненности препарат вносят в питательные среды в разведении 1:5, 1:10, 1:100. Чтобы избежать изменение pH среды, разведение препарата делают в 0,1М фосфатном буферном растворе с pH 7,0. Для определения сапрофитных бактерий препарат вносят в среду в разведении 1:10 и 1:100, для определения грибов – в разведении 1:5 и 1:10. Все другие группы микроорганизмов определяют при разведении препарата 1:10. Для определения всех групп микроорганизмов в жидкие и агаризированные

питательные среды, кроме накопительных вносят по 0,5 мл разведенного препарата. В накопительные среды добавляют по 10 мл разведенного препарата на 100 мл среды.

Количество сапрофитных бактерий определяют путем посева препарата на мясопептонный агар, количество грибов – на агаризованную среду Сабуро. Посевы инкубируют в течении 48 часов при 37° и в течении 5 сут. При 22° соответственно.

Определение бактерий рода Escherichia производят на лактозном бульоне следующего состава: пептон – 5г, лактоза – 5г, гидролизат Хоттингера (150 мг/% аминного азота) или мясная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации 6,7. Посевы инкубируют в течении 24 ч. при 37°. При образовании газа в лактозном бульоне и наличии в мазках грамотрицательных палочек делают высев лактозного бульона на дифференциальную среду Эндо.

Для определения бактерий родов Salmonella и Shigella препарат вносят в среду Киллиана с последующим высевом после инкубирования в течение 24 ч при 37°C на дифференциальные среды Левина и Плоскирева. Дальнейшую идентификацию бактерий родов Escherichia, Salmonella и Shigella производят после изучения их биохимических свойств.

Для определения бактерий рода Proteus препарат высевают на свежеприготовленный скошенный агар по методу Шукевича. Через 24 ч инкубирования выросшие микроорганизмы для окончательной дифференциации переносят в пробирки, содержащие жидкую среду с мочевиной. Среда для определения бактерий рода Proteus содержит : дигидрофосфат калия – 9,1, гидрофосфат натрия – 9,5, мочевины- 20г, феноловый красный – 0,01г, дистиллированную воду – до 1000 мл; pH после стерилизации – 6,8. Бактерии рода Proteus разлагают мочевины через 24ч, с образованием при этом аммиака, который изменяет желтый цвет среды в красный.

Для определения патогенных стафилококков и синегнойной палочки препарат вносят в накопительную среду следующего состава: дрожжевой экстракт – 5г, кислотный гидролизат казеина – 20 г, хлорид натрия – 5 г, пептон – 10 г, глюкоза – 2 г, гидрофосфат калия – 2,5 г, дистиллированная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,2-7,4.

Через 24ч инкубирования при температуре 37°C накопительную среду высевают на маннитно-солевой агар и среду для определения Ps. Aeruginosa. Маннитно-солевой агар применяют для дифференциации патогенных стафилококков и готовят согласно прописи: пептон – 10 г, хлорид натрия – 75 г, D-маннит – 10 г, феноловый красный – 0,025 г, мясопептонный бульон – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,4.

Рост посторонней микрофлоры угнетается в результате присутствия в среде 7,5% хлорида натрия. Патогенные стафилококки растут на ней, образуя колонии, окруженные желтыми зонами. Поскольку наиболее достоверным признаком патогенности для стафилококков в настоящее время считается способность коагулировать плазму крови, изучаются плазмокоагулирующие свойства стафилококков, образовавших желтые зоны при росте на маннитно-солевом агаре. Для этого петлю 24-часовой агаровой культуры вносят в пробирку с 0,5 мл плазмы крови кролика, разведенного в 5 раз 0,9% раствором хлорида натрия, и инкубируют при 37° в течении 1-24 ч. Дифференциальная среда для Ps. Aeruginosa проста по составу и основана на способности этого микроорганизма образовывать сине-зеленый пигмент: пептон – 20 г, глицерин – 10 г, гидрофосфат калия – 1,5 г, сульфат магния – 1,5 г, агар-агар – 15-20 г, дистиллированная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,3

Разработанная НИИ по стандартизации и контролю лекарственных средств Министерства здравоохранения РФ схема может быть использована для определения микробной загрязненности всех форм лекарственных препаратов, не оказывающих антимикробное действие.

Схема может быть использована для определения микробной загрязненности препаратов, оказывающих антимикробное действие, после инактивации этих препаратов тем или иным методом.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Какие среды необходимы для микробиологического контроля нестерильных лекарственных средств?

- 1.МПА
2. Среда Эндо
3. ЖСА
4. Сабуро.
5. Тиогликолевая среда.
6. Все ответы неправильные.

2. Какие среды необходимы для выявления не инъекционных лекарственных средств?

- 1.Полужидкий МПА
- 2.Среда Китта-Тароцци;
- 3.Сабуро.
- 4.Эндо.
- 5.Все ответы неправильные.

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

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

**(ЧАСТЬ I)**

**Учебно-методическое пособие для преподавателей по специальности «Фармация»,  
дополненное и переработанное**

**ВЛАДИКАВКАЗ**

## Лабораторная работа №1.

### Тема: Морфология прокариотов (бактерий).

#### Учебная цель:

1. Изучить морфологию отдельных представителей бактерий.
2. Освоить технику микроскопирования.
3. Освоить простой метод окраски микроорганизмов.

#### План занятия:

1. Знакомство с правилами работы и основами техники безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Устройство и оборудование микробиологической лаборатории, режим работы и назначение.
3. Классификация бактерий.
4. Морфология бактерий, методы изучения (световая, темнопольная, фазовоконтрастная, электронная микроскопия).
5. Этапы приготовления мазка.
6. Простой метод окраски бактерий.
7. Приготовление мазков из культуры стафилококка и кишечной палочки, окраска простым методом.
8. Демонстрация препаратов из микрококков, диплококков, тетракокков, сарцин, стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, бацилл, вибрионов.

#### Самостоятельная работа студентов

1. Приготовление мазка и окраска простым методом (под руководством преподавателя).
2. Освоение техники микроскопирования. Микроскопическое изучение морфологии бактерий:
3. Просмотр демонстрационного мазка из чистой культуры стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Окраска генциан-виолетом.
4. Просмотр демонстрационного мазка из чистой культуры кишечной палочки (*E. coli*). Окраска — водным фуксином.
5. Оформление протокола исследования.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:  
Метиленовый синий – 8 шт.  
Водный фуксин – 8 шт.
3. Пробирки с ростом культур *S.aureus* -8 шт.  
Пробирки с ростом культур *E.coli* – 8 шт.
4. Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
5. Демонстрационные микропрепараты: сарцины, стрептококки, диплококки, кишечная палочка, актиномицеты, стафилококки, спирохеты, вибрионы, антракоид.
6. Таблицы.

#### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

##### 1. Техника приготовления мазков.

Мазки готовят на обезжиренных предметных стеклах, предварительно обрисовав карандашом по стеклу место будущего мазка с противоположной стороны предметного стекла. При росте бактерий на жидкой питательной среде, материал берут стерильной бактериальной петлей, наносят на стекло и растирают над очерченной площадкой. В случае роста бактерий на плотной питательной среде, на предметное стекло предварительно наносят петлей каплю воды и материал растирают.

2. Бактериальную петлю перед использованием с оставшейся культурой стерилизуют в пламени горелки. Приготовленный мазок высушивают на воздухе или держа высоко над пламенем спиртовки.

3. После этого препарат фиксируют, для чего мазок стороной, где нет материала, трехкратно проводят через середину пламени горелки. Фиксация позволяет убить микробы, прикрепить их к стеклу и, наконец, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.

## **2. Техника простых методов окраски**

Окраска бактерий преследует цель сделать их резко отличными от фона, что позволяет изучить под микроскопом их морфологию и структуру. В микробиологии используют простые и сложные методы окраски препаратов.

При ПРОСТОМ СПОСОБЕ окраски, мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным фуксином (2-3 мин.) или метиленовой синью (2-3 мин.), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

## **3. Техника микроскопирования**

В связи с очень малыми размерами бактерий изучение их морфологии возможно только при большом увеличении, достигаемом при помощи иммерсионного масла, которое позволяет создать единую систему между предметным стеклом и особым, х 90- кратным (с черной полоской) объективом.

При микроскопии окрашенных объектов необходимо создать яркое освещение с помощью вогнутого зеркала, поднятого конденсора и полностью открытой диафрагмы.

Каплю иммерсионного масла наносят на область мазка на стекле, лежащем на столе. Затем стекло переносят на столик микроскопа. Иммерсионный объектив погружают в масло осторожно, под контролем глаза до явного контакта объектива с маслом. Затем объектив поднимают, не выводя из капли масла и глядя в окуляр для нахождения объекта исследования («поля зрения»). Четкое изображение препарата достигается регулировкой сначала макровинтом (для обнаружения объекта), а затем микровинтом для регулировки резкости изображения.

### **Морфология основных форм бактерий**

Известны четыре основные формы бактерий:

1. Кокки- микробы округлой формы, имеющие в диаметре 1-2ц. Они отличаются между собой по взаимному расположению отдельных клеток, которое зависит от способа их деления. Если по окончании деления кокки разъединяются на отдельные шарики, получаются одиночные клетки кокков -*Micrococcus*.

2. Группа из двух кокков носит название диплококка -*Diplococcus* (менингококк, гонококк имеют сходство с бобами, и ланцетовидную форму — пневмококк).

3. Если деление кокков происходит лишь в одном направлении и образующиеся кокки не разъединяются, то получается нить из шариков в виде цепи, более или менее длинной в зависимости от числа кокков-*Streptococcus*.

4. При делении в двух взаимно перпендикулярных направлениях возникают сочетания по четыре кокка-*Tetrads*.

5. Если деление происходит в трех взаимно перпендикулярных направлениях, кокки соединяются в виде пакетов (кубиков) и получают название — *Sarcina*.

6. Делясь в различных направлениях без особой правильности, кокки образуют беспорядочные скопления клеток, напоминающие виноградные грозди, почему они и получили название *Staphylococcus*.

*Палочковидные микроорганизмы* представлены самой многочисленной и разнообразной группой бактерий. В классификации палочковидных форм принято именовать бациллами и клостридиями те палочки, которые способны образовывать споры, а палочки неспособные к спорообразованию, называются бактериями. Палочковидные формы различаются по величине, расположению — поодиночке, парами, цепочкой, беспорядочно и под углом. Очертанию концов — закругленные, обрубленные, утолщенные, заостренные.

*Извитые формы*-спириллы и спирохеты имеющие вид штопорообразно извитых клеток. К патогенным спириллам относятся возбудитель содоку (болезнь укуса крыс). К извитым также относятся кампилобактерии, имеющие изгибы как у крыла летящей чайки.

Спирохеты — тонкие, длинные, изогнутые (спиралевидной формы) бактерии, отличающиеся от спирилл подвижностью, обусловленной сгибающимися изменениями клеток. Спирохеты представлены тремя родами патогенными для человека: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*.

### **Методы диагностики инфекционных заболеваний**

1. *Микроскопический метод* заключается в приготовлении препаратов (нативных или окрашенных простыми или сложными методами) из исследуемого материала и их микроскопии с применением различных видов микроскопической техники (световая, темнопольная, фазово-контрастная, электронная). В бактериологии микроскопический метод получил название бактериоскопический, в вирусологии — вирусоскопический.

2. *Культуральный метод* заключается в посеве исследуемого материала на искусственные питательные среды с целью выделения и идентификации чистой культуры возбудителей. В бактериологии культуральный метод получил название бактериологического, а в вирусологии — вирусологического.

3. *Биологический метод* (экспериментальный или биопроба) заключается в заражении исследуемым материалом чувствительных или других биологических объектов (куриные эмбрионы, культуры клеток). Его используют для выделения чистой культуры возбудителя, определения типа токсина, определение активности антимикробных химиотерапевтических препаратов.

4. *Серологический метод* — заключается в определении титра антител в сыворотке крови больного, реже — в обнаружении микробного антигена в исследуемом материале. С этой целью используются реакции иммунитета.

5. *Аллергический метод* заключается в выявлении инфекционной аллергии (ГЗТ) на диагностический микробный препарат — аллерген. С этой целью ставят кожные аллергические пробы с соответствующими аллергенами.

*Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий — патогенные биологические агенты — патогенные для человека микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы, простейшие). В соответствии с типами микроорганизмов выделяют: бактериологические, вирусологические, микологические, протозоологические лаборатории. Регламентация условий работы с возбудителями инфекционных заболеваний произведена в соответствии со степенью опасности микроорганизмов для человека. Выделяют четыре группы возбудителей.*

Группа 1: возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадки Ласса, Эбола.

Группа 2: возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: сибирская язва, холера, лихорадка, сыпной тиф, бешенство.

Группа 3: возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных нозологических форм (коклюш, малярия, полиомиелит, лейшманиозы).

Группа 4: возбудители бактериальных, вирусных, грибковых заболеваний (синегнойной инфекции, амебиаза, аспергиллеза).

Микробиологические лаборатории работают с ПБА с возбудителями особо опасных инфекций (группа 1 и 2). Особый режим максимально изолированные индивидуальным и общественным риском.

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **Лабораторная работа №2.**

#### **Тема: Морфология прокариотов (бактерий).**

##### **Учебная цель:**

1. Изучить отдельные структуры прокариотической клетки.
2. Освоить сложные методы окраски микробов.

##### **План занятия:**

1. Строение и химический состав бактериальной клетки.
2. Особенности строения бактериальной клетки.
3. Сложные методы окраски, цели их использования (методы Грама, Циля-Нельсена, Ожешко, Гинса-Бурри, Нейссера).
4. Демонстрация окрашенных препаратов по методам Грама, Бурри-Гинса, Нейссера, Ожешко, Цилю-Нильсену.
5. Изучение подвижности бактерий, приготовление препаратов «висячая» и «раздавленная» капля.

##### **Самостоятельная работа студентов**

1. Приготовить смешанный мазок из чистых культур стафилококка и кишечной палочки. Окраска водным фуксином.
2. Приготовить смешанный мазок из чистой культуры стафилококка и кишечной палочки. Окраска по Граму.
3. Приготовить препараты «висячая» и «раздавленная» капля.
4. Оформление протокола исследования.

### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования:

- Штатив- 8 шт.
- Пинцет – 8 шт.
- Бактериологическая петля-8 шт.
- Лоток с подставкой - по 8шт.
- Предметные стекла
- Спиртовка -8шт.
- Флакон с физ.р-ром -8шт.
- 2. Набор красок:
  - По Граму: генциановый фиолетовый, р-р Люголя, водный фуксин, этиловый спирт- 2 набора.
  - По Цилью Нильсену: фуксин Циля, метиленовый синий, 5% серная кислота – 2 набора.
  - По Ожешко: 1,5% соляная кислота, фуксин Циля, метиленовый синий, 5% серная кислота – 2 набора.
  - По Нейссеру: синька Нейссера, р-р Люголя, везувин. – 2 набора.
  - По Бурри-Гинсу: Тушь, водный фуксин, стекла с отшлифованными краями – 2 набора.
- 3. Для определения подвижности предметные стекла с луночками и покровные стекла. – 4 шт., вазелин – 4 шт.
- 4. Пробирки с ростом культур *S.aureus* -2 шт.
- Пробирки с ростом культур *E.coli* – 2 шт.
- Мазки из вакцины БЦЖ, для окраски по Цилью Нильсену – 2 шт.
- Культура спорообразующих бактерий на скошенном агаре, для окраски по Ожешко – 2 шт.
- Культура капсульных бактерий на косом агаре, для окраски по Бурри-Гинсу – 2 шт.
- Культура дифтероидов на скошенном агаре, для окраски по Нейссеру – 2 шт.
- Культура подвижных бактерий на бульоне – 4шт.
- 5. Микроскопы – 8 шт.
- Иммерсионное масло – 4 шт.
- 6. Демонстрационные микропрепараты: мазки из мокроты окрашенные по Цилью –Нильсену, мазки капсульных бактерий, окрашенные по Бурри-Гинсу, мазки дифтерийной палочки, окрашенные по Нейссеру, мазки из антракоида, окрашенные по Ожешко, мазки из культур кишечной палочки и стафилококка, окрашенные по Граму.
- 7. Демонстрация подвижности бактерий в темном поле.
- 8. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

### Техника сложных методов окраски

*Сложные способы* окраски включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет предварительно дифференцировать микробы (*дифференциально-диагностические способы*) и выявлять определенные структуры клеток (*специальные способы*).

#### 1. Способ окраски по Граму

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком идентификации бактерий. В результате окраски по Граму все бактерии делятся на две группы; грам-положительные (синего цвета) и грам-отрицательные (красного цвета).

#### Техника окраски по методу Грама

1. Фиксированный мазок кладут на бактериологический мостик и покрывают полоской фильтровальной бумаги, пропитанной раствором генциан -виолета на бумажную полоску наносят воду. Через 2 минуты полоску удаляют.

2. Не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя на 1 минуту. Затем раствор сливают.

3. Препарат обесцвечивают спиртом 20-30 секунд (до отхождения фиолетовых струек краски).

4. Препарат промывают водой.

5. Окрашивают водным фуксином — 2 минуты.

6. Препарат промывают водой.

7. Высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

#### 2. Способ окраски по Цилью-Нильсену

Применяется для обнаружения некоторых микробов, богатых липидами (например, возбудитель туберкулеза, лепры и др.)

1. Для окрашивания используют концентрированный раствор карболового фуксина Циля. С целью улучшения проникновения красителя в клетку препарат с наложенной на него полоской фильтровальной бумаги и красителем подогревают над пламенем горелки трехкратно до появления пара.

2. Затем препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислоты, предварительно удалив фильтровальную бумагу.

3. Промывают водой.

4. Докрашивают метиленовым синим в течении 3-5 минут.

5. Препарат промывают водой.

6. Высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

Обесцвечивание кислотой приводит к потере красителя кислотоподатливыми микробами, и они окрашиваются в синий цвет. Кислотоустойчивые микробы остаются красными.

### **3.Способ окраски по Бурри-Гинсу**

1. Смешивают каплю культуры капсульных бактерий с каплей туши на конце предметного стекла. Затем готовят мазок как обычно его готовят из капли крови.

2. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки.

3. Для обнаружения бактерий мазок окрашивают водным фуксином.

При этом способе окраски бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются как ободок на черно-коричневом фоне вокруг бактерий.

### **4.Способ окраски по методу Нейссера**

1. На фиксированный мазок наносят синьку Нейссера 2-3 мин.

2. Не промывая водой, наносят раствор Люголя 10-30 сек.

3. Мазок промывают водой.

4. Докрашивают раствором везувина — 1 мин.

В культуре дрожжеподобных грибов много зерен волютина. Они представляют собой соединения, имеющие, в отличие от цитоплазмы, щелочную реакцию и потому окрашиваются в темно-синий цвет. Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель везувин и окрашивается в желтый цвет.

### **5.Способ окраски по методу Ожешко**

1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор HCl и подогревают на пламени горелки в течение 2 мин. До появления паров.

2. Препарат промывают водой, высушивают и фиксируют.

3. Докрашивают по методу Циля-Нельсена.

Споры бактерий после данной окраски приобретают красный цвет, а тело бактерий-синий.

## **ХРОНОМЕТРАЖ**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## **Лабораторная работа №3.**

### **Тема: Морфология эукариотов (грибов, простейших).**

**Учебная цель:** Изучить морфологию и строение грибов и простейших.

#### **План занятия:**

1. Морфология и ультраструктура патогенных простейших.
2. Классификация, морфология, ультраструктура и способы размножения грибов.
3. Приготовление нативных препаратов из культур плесневых грибов. Окраска дрожжевых грибов метиленовой синью.
4. Демонстрация морфологических и культуральных свойств плесневых и дрожжевых грибов.

#### **Самостоятельная работа студентов**

1. Приготовление мазков из дрожжевых грибов, окрасить их простым методом (метиленовой синью) и микроскопировать.
2. Приготовление и микроскопирование нативных препаратов из культур плесневых грибов.
3. Просмотр и зарисовка демонстрационных препаратов:
  - а) актиномицетов, окрашенных по Граму;
  - б) нативных препаратов из культур плесневых грибов (мукор, аспергилл, пеницилл);
  - в) дрожжевых грибов, окрашенных метиленовой синей.

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:  
По Граму  
Метиленовый синий – 8 шт.
- 3.Пробирки с культурой дрожжевых грибов- 8шт.  
Пробирки с культурой актиномицета для окраски по Граму-8 шт.
- 4.Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
- 5.Демонстрационные микропрепараты: аспергилла, пеницилла, мукоора, кандиды, таксоплазма( окраска по Романовскому -Гимзе).
- 6.Демонстрация: чашки с посевами грибов.
- 7.Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

**Грибы** (Fungi, Mycetes) — разнородная группа эукариотических микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цито-плазматическую мембрану (которая содержит фосфолипиды и стеролы) и мощную клеточную стенку, состоящую из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др. Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов — фикомицетов — не имеют перегородок. У высших грибов — эумицетов — гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный. Грибы размножаются спорами, половым и бесполом способами, а также вегетативным путем (почкование или фрагментация гиф). Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным. Несовершенными называют грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения. Бесполое размножение осуществляется у грибов с помощью эндогенных спор, созревающих внутри круглой структуры — спорангия, и экзогенных спор — конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

Грибы можно разделить на 7 классов: хитридиомикеты, гифохитридиомикеты, оомикеты, зигомикеты, аскомикеты, базидиомикеты, дейтеромикеты. Подавляющее большинство грибов, вызывающие заболевания у человека (микозы), относятся к несовершенным грибам. Для диагностики микозов могут быть использованы микроскопические (культуральные), аллергические, серологические, биологические и гистологические методы исследования. Материалом для исследования могут быть гной, мокрота, пораженные волосы, ногти, чешуйки кожи, пунктаты костного мозга, лимфатических узлов, внутренних органов, кровь, желчь, испражнения, биоптаты тканей и т. п. Для окраски мазков чаще всего используют методы Грама, Циля-Нильсена, Романовского-Гимзы.

### **Плазмодии малярии.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiiida, подотряд Haemosporina.

К роду Plasmodium относятся более 100 видов простейших, паразитирующих на различных позвоночных: рептилиях, птицах и млекопитающих. Паразитами человека являются 4 вида малярийных плазмодиев. Plasmodium vivax-возбудитель трехдневной малярии, Plasmodium malariae - возбудитель четырехдневной малярии, Plasmodium falciparum – возбудитель тропической малярии и Plasmodium ovale – возбудитель – возбудитель малярии-овале.

Малярийные плазмодии – паразиты со сложным гетероксическим развитием, включающим фазу полового размножения, в течение которого они облигатно связаны с двумя хозяевами (окончательным и промежуточным). Человек является промежуточным хозяином малярийных плазмодиев, так как в его организме происходит бесполой фаза жизненного цикла паразитов. Окончательный хозяин малярийных паразитов – кровососущий комар рода Anopheles, в организме которого проходит половая фаза их жизненного цикла, которая завершается образованием в теле комара большого количества длинных тонких одноядерных клеток – спорозоитов. Они концентрируются в огромных количествах в слюнных железах комара. При укусе комара спорозоиты из слюнных желез попадают в кровь позвоночного хозяина.

Лабораторная диагностика проводится путем микроскопического исследования мазков крови больного, окрашенных красной Романовского – Гимзе. При этом дифференциация видов плазмодиев основана на морфологических особенностях паразитов, а также пораженных эритроцитов. В ряде случаев используется серодиагностика (реакция иммунофлюоресценции, пассивной гемагглютинации,

иммуноферментный анализ).

#### **Токсоплазма.**

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Eimeriina, семейства Eimeriidae.

Возбудитель токсоплазмоза представлен единственным видом *Toxoplasma gondii*.

Возбудитель токсоплазмоза -*Toxoplasma gondii*-внутриклеточный паразит, поражающий практически все органы и ткани теплокровных животных, птиц и человека. В соответствии с отечественной классификацией его относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности (условно-патогенные микроорганизмы).

Паразиты обладают гетероксеническим развитием, включающим половое и бесполое размножение со сменой хозяев. Основным хозяином токсоплазмы является кошка, в эпителиальных клетках кишечника которой образуются ооцисты. Промежуточные хозяева паразита – многочисленные виды птиц и млекопитающих, в том числе и человек. Жизненный цикл токсоплазм включает несколько морфологических стадий: 1) эндоzoиты (трофозоиты) и цистозоиты – вне и внутриклеточные стадии, во время которых паразит находится в разных органах и тканях промежуточных хозяев (включая человека) и размножается бесполом путем (эндоdиогения и эндополигения), 2) мерозоиты – внутри- и внеклеточные формы, паразитирующие в эпителиальных клетках кишечника основного хозяина – кошки. Размножаются посредством шизогонии; 3) микро- и макрогаметы-половые стадии развития, образующиеся в основном хозяине – кошке. При слиянии мужских и женских клеток (соответственно, микрогамет и макрогамет) возникает зигота, которая затем превращается в покоящуюся стадию –ооцисту. Ооцисты выводятся во внешнюю среду вместе с фекалиями кошки; 4) спорозоиты – инвазионная стадия, образующаяся в результате спорогонии внутри ооцисты вне организма основного хозяина.

В качестве материала для исследования используют пунктат лимфатических узлов, спинномозговую жидкость, кровь, гистологические срезы, лимфатических узлов, миндалин, кусочки органов трупа, головной мозг, печень, селезенку, легкие, а в случае патологической беременности – плаценту и околоплодную жидкость.

**Микроскопия.** Исследование мазков и гистологических препаратов требует внимания и опыта, так как количество токсоплазм в материале невелико и их можно спутать с другими образованиями. Токсоплазмы имеют полулунную или аркообразную форму длиной 4-7 мкм, шириной 2-4 мкм. Один конец возбудителя заострен, а другой – несколько закруглен. При окраске по Романовскому-Гимзе цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около 1/3-1/4 его тела, - рубинного красного.

#### **Амебиаз.**

Тип Sarcomastigophora, подтип Sarcodina, класс Lobosea, отряд Amoebida.

Дизентерийная амеба *Entamoeba histolytica* (микроорганизмы 4 группы патогенности) открыта Ф.А. Лешем в 1875 г. Она является обитателем толстой кишки человека и в своем развитии (жизненный цикл) проходит 2 стадии – вегетативную и стадию покоя. На вегетативной стадии развития амеба существует в четырех формах: 1) тканевой; 2) большой вегетативной (форма magna), просветной-мелкой вегетативной (форма minuta) и 4) предцистной.

При остром амебиазе обнаруживают тканевую и большую вегетативную, а у реконвалесцентов и цистовыделителей – просветную и предцистную форму.

Материалом для исследования служат испражнения, гной из пораженных органов, мокрота и др.

**Микроскопия.** Исследуют нативные препараты и мазки, окрашенные раствором Люголя, смесью Сафарлиева, а также препараты, обработанные железным гематоксилином по Гейдегайну или другими красителями.

## **ХРОНОМЕТРАЖ**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## **Лабораторная работа №4.**

**Тема: Морфология неклеточных форм микробов.**

**Сдача модуля по теме: «Морфология прокариотов, эукариотов, неклеточных форм микробов».**

#### **Учебная цель:**

1. Изучить морфологию и ультраструктуру вирусов.
2. Изучить строение и морфологию бактериофагов.

### План занятия:

1. Особенности биологии вирусов.
2. Принципы классификации вирусов.
3. Типы взаимодействия вирусов с клеткой.
4. Морфология и строение бактериофагов, их практическое применение в медицине.
5. Сдача модуля.

### Самостоятельная работа студентов

- Изучение демонстрации феномена бактериофагии на плотных и жидких питательных средах.
- Изучение демонстрации внутриклеточных включений (тельца Бабеша-Негри).

### ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для приготовления мазка:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:  
По Морозову – 8 шт.
3. Готовые мазки из оспинои вакцины, для окраски по Морозову – 8шт.
- 4.Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
- 5.Демонстрационные микропрепараты: внутриядерные включения при Кори, тельца Пашена при оспе, тельца Бабеша –Негри при бешенстве.
6. Демонстрация: бакпрепараты бактериофагов.
- 7.Таблицы.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Вирусы обладают свойствами, не позволяющими применить для их изучения обычные методы микробиологического исследования.

#### **Отличительные свойства вирусов:**

1. Мельчайшие размеры, измеряемые тысячными долями микрона - миллимикронами - от 8-10 м до 300-400 м.
2. Фильтруемость через специальные мелкопористые фильтры, не пропускающие другие микроорганизмы.
3. Неклеточная структура.
4. Абсолютный паразитизм, т.е. способность жить и размножаться только в живых клетках.

#### **Форма вирусных частиц имеет несколько типов:**

1. Палочковидная
2. Сферическая (шаровидная)
3. Кубоидальная
4. Головчатая (сперматозоидообразная)
5. Нитевидная

Зрелые вирусные частицы, называемые *вирионами*, имеют следующую схему строения: в центральной части находится молекула ДНК или РНК, которая образует *нуклеоид*. Вокруг располагается защитная белковая оболочка, называемая *капсидом*, построенная из морфологических единиц, называемых *капсомерами*. Некоторые сложноустроенные вирионы имеют внешнюю оболочку, называемую *суперкапсидом*.

Для микробиологической диагностики вирусных инфекций в настоящее время применяют три основных методических подхода:

1. **Вирусологическая диагностика** - основана на выделении из исследуемого материала вируса и его последующей идентификации.
2. **Серологическая диагностика** - определение специфических иммунологических изменений в организме под действием вирусов (чаще всего с помощью диагностикумов выявляют в сыворотке крови противовирусные антитела).
3. **Молекулярно-биологическая диагностика** - обнаружение в клиническом материале фрагментов нуклеиновых кислот вирусов-возбудителей с помощью зондов (гибридизация НК) или ПЦР.

Отдельные вирусы, размером более 200 нм, могут быть окрашены по Романовскому - Гимзе; вирусы меньших размеров (вирусы оспы) удается обнаружить только при помощи особых способов обработки.

Бактериофаги различаются по химической структуре, типу нуклеиновой кислоты, морфологии и характеру взаимодействия с бактериями. По размеру бактериальные вирусы в сотни и тысячи раз меньше микробных клеток.

Типичная фаговая частица (вирион) состоит из головки и хвоста. Длина хвоста обычно в 2 — 4 раза больше диаметра головки. В головке содержится генетический материал — одноцепочечная или двуцепочечная РНК или ДНК с ферментом транскриптазой в неактивном состоянии, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой — **капсидом**, сохраняющим геном вне клетки.

Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют нуклеокапсид. Бактериофаги могут иметь икосаэдральный капсид, собранный из множества копий одного или двух специфических белков. Обычно углы состоят из пентамеров белка, а опора каждой стороны из гексамеров того же или сходного белка. Более того, фаги по форме могут быть сферические, лимонovidные или плеоморфные. Хвост представляет собой белковую трубку — продолжение белковой оболочки головки, в основании хвоста имеется АТФаза, которая регенерирует энергию для инъекции генетического материала. Существуют также бактериофаги с коротким отростком, не имеющие отростка и нитевидные.

Фаги, как и все вирусы, являются абсолютными внутриклеточными паразитами. Хотя они переносят всю информацию для запуска собственной репродукции в соответствующем хозяине, у них отсутствуют механизмы для выработки энергии и рибосомы для синтеза белка. У некоторых фагов в геноме содержится несколько тысяч оснований, тогда как фаг G, самый крупный из секвенированных фагов, содержит 480 000 пар оснований — вдвое больше среднего значения для бактерий, хотя всё же недостаточного количества генов для важнейшего бактериального органоида как рибосомы.

Большое количество выделенных и изученных бактериофагов определяет необходимость их систематизации. Классификация вирусов бактерий претерпевала изменения: основывалась на характеристике хозяина вируса, учитывались серологические, морфологические свойства, а затем строение и физико-химический состав вириона.

В настоящее время согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов бактериофаги, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты разделяют на ДНК- и РНК- содержащие.

По морфологическим характеристикам ДНК-содержащие фаги выделены в следующие семейства: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Lipothrixviridae, Plasmaviridae, Corticoviridae, Fuselloviridae, Tectiviridae, Microviridae, Inoviridae Plectovirus и Inoviridae Inovirus.

РНК-содержащие: Cystoviridae, Leviviridae

По характеру взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги могут только увеличиваться в количестве посредством литического цикла. Процесс взаимодействия вирулентного бактериофага с клеткой складывается из нескольких стадий: адсорбции бактериофага на клетке, проникновения в клетку, биосинтеза компонентов фага и их сборки, выхода бактериофагов из клетки.

Первоначально бактериофаги прикрепляются к фагоспецифическим рецепторам на поверхности бактериальной клетки. Хвост фага с помощью ферментов, находящихся на его конце (в основном лизоцима), локально растворяет оболочку клетки, сокращается и содержащаяся в головке ДНК инъецируется в клетку, при этом белковая оболочка бактериофага остается снаружи. Инъецированная ДНК вызывает полную перестройку метаболизма клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, РНК и белков. ДНК бактериофага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, который после попадания в бактериальную клетку активируется. Синтезируются сначала ранние, а затем поздние иРНК, которые поступают на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются ранние (ДНК-полимеразы, нуклеазы) и поздние (белки капсида и хвостового отростка, ферменты лизоцима, АТФаза и транскриптаза) белки бактериофага. Репликация ДНК бактериофага происходит по полуконсервативному механизму и осуществляется с участием собственных ДНК-полимераз. После синтеза поздних белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс — созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц.

Продолжительность этого процесса может составлять от нескольких минут до нескольких часов. Затем происходит лизис клетки, и освобождаются новые зрелые бактериофаги. Иногда фаг инициирует лизирующий цикл, что приводит к лизису клетки и освобождению новых фагов. В качестве альтернативы фаг может инициировать лизогенный цикл, при котором он вместо репликации обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в виде плазмиды. Таким образом, вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК хозяина и делением клетки, а подобное состояние фага называется профагом. Бактерия, содержащая профаг, становится лизогенной до тех пор, пока при определенных условиях или спонтанно профаг не будет стимулирован на осуществление лизирующего цикла репликации. Переход от лизогении к лизису называется лизогенной индукцией или индукцией профага. На индукцию фага оказывает сильное воздействие состояние клетки хозяина предшествующее индукции, также как наличие питательных веществ и другие условия, имеющие место в момент индукции. Скудные условия для роста способствуют лизогенному пути, тогда как хорошие условия способствуют лизирующей реакции.

Очень важным свойством бактериофагов является их специфичность: бактериофаги лизируют культуры определенного вида, более того, существуют так называемые типовые бактериофаги, лизирующие варианты внутри вида, хотя встречаются поливалентные бактериофаги, которые паразитируют в бактериях разных видов

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин  |

### **Лабораторная работа №5.**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

#### **Учебная цель:**

1. Освоить бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
2. Изучить типы питания бактерий, принципы культивирования микроорганизмов, классификацию питательных сред.
3. Изучить методику получения чистых культур бактерий из исследуемого материала.

#### **План занятия:**

1. Питание бактерий: типы, механизмы поступления питательных веществ в микробную клетку.
2. Принципы культивирования микроорганизмов.
3. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
4. Питательные среды: требования, предъявляемые к питательным средам; классификация, состав, приготовление.
5. Демонстрация питательных сред.
6. Посев исследуемого материала (взвеси микроорганизмов) на МПА методом Дригальского (1 этап).

#### **Самостоятельная работа студентов:**

1. Посев исследуемого материала по методу Дригальского.
2. Ознакомление с приготовлением питательных сред.

### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Посев по Дригальскому:  
Чашки с МПА 3 шт.-4 набора  
Пробирки с взвесью микроорганизмов -4шт.  
Стерильные шпатели – 4 шт.
3. Демонстрация: питательные среды: МПА, КА, среда Эндо, среда Китта-Тароцци, агар-агар, среды Гисса, ЖСА, ЩА, среда Висмут-сульфит, МПБ.
4. Таблицы.

### **ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ**

**Микробиологическое исследование** проводится с целью выделения чистых культур микроорганизмов, культивирование и изучения их свойств. Оно необходимо при диагностике инфекционных болезней, для определения видовой принадлежности микробов, в исследовательской работе, для получения продуктов жизнедеятельности микробов (токсинов, антибиотиков, вакцин и т. п.). Для выращивания микроорганизмов в искусственных условиях необходимы особые субстраты — питательные среды. Они являются основой

микробиологической работы и определяют результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные условия для жизнедеятельности микробов.

#### ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К СРЕДАМ:

1. Должны быть питательными, т. е. содержать в легкоусвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей микроорганизмов.

2. Иметь оптимальную концентрацию водородных ионов.

3. Быть изотоничными для микробной клетки.

4. Быть стерильными.

5. Быть влажными.

6. Обладать определённым окислительно-восстановительным потенциалом.

7. Быть по возможности унифицированными.

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

| Группа классификации    | Класс                                                                                                                                                                        | Примеры                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>По составу</b>       | <b>Простые</b>                                                                                                                                                               | <i>Жидкие — МПБ, пептон-ная вода Плотные — МПА</i>                                                                                                                                                 |
|                         | <b>Сложные</b>                                                                                                                                                               | <i>Жидкие — сахарный бульон Плотные — сахарный агар, кровяной агар</i>                                                                                                                             |
| <b>По происхождению</b> | <b>Естественные</b>                                                                                                                                                          | <i>Молоко, свёрнутая сыворотка, срез сырого картофеля</i>                                                                                                                                          |
|                         | <b>Искусственные</b>                                                                                                                                                         | <i>Молочно-солевой агар Сывороточный агар Асцит-агар Кровяной агар</i>                                                                                                                             |
|                         | <b>Синтетические</b>                                                                                                                                                         | <i>Среда Игла, среда 199</i>                                                                                                                                                                       |
| <b>По назначению</b>    | <b>Селективные (элективные)</b><br>-для стафилококка:<br>-для грам(-) кокков и дифтероидов:<br>-для энтеробактерий:<br>-для холерного вибриона:<br>-для лактобацилл и грибов | <i>Молочно-солевой агар, жел-точно-солевой агар Сывороточные среды Среды с солями теллура Среды с солями желчных кислот Пептонный бульон и щелочной агар Томат-агар, рисовый агар, агар Сабуро</i> |
|                         | <b>Дифференциально-диагностические</b><br><b>Универсальные</b><br><b>Среды обогащения</b><br><b>Консервирующие</b>                                                           | <i>Эндо, Плоскирева, Левина, Ресселя, Гисса МПБ, МПА, кровяной агар Среда Мюллера Среды с глицерином</i>                                                                                           |
| <b>По консистенции</b>  | <b>Жидкие</b><br><b>Полужидкие</b><br><b>Плотные</b>                                                                                                                         | <i>МПБ, пептонная вода, сахарный МПБ МПЖеле, желатиновая МПА, кровяной агар</i>                                                                                                                    |

#### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа              | 45мин.  |

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **Лабораторная работа №6.**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

#### **Учебная цель:**

1. Освоить методы выделения чистых культур аэробов.
2. Изучить типы дыхания бактерий, способы создания условий анаэробноз.
3. Освоить методы выделения чистых культур анаэробов.

#### **План занятия:**

1. Типы дыхания бактерий.
2. Способы создания условий анаэробноз.
3. Методы выделения чистой культуры аэробов и анаэробов.
4. Посев почвенной болтушки на среду Китта-Тароцци.
5. Питательные среды для анаэробов, методы культивирования и выделение чистой культуры анаэробов.
6. Изучение культуральных свойств бактерий.
7. Изучение колоний, выросших на чашках, засеянных методом Дригальского.
8. Посев микроорганизмов из изученной колонии на скошенный агар для получения чистой культуры (2 этап).
9. Демонстрация пигментообразования бактерий.
10. Демонстрация характера роста бактерий на плотных и жидких питательных средах.

#### **Самостоятельная работа студентов**

1. Завершение 1-го этапа бактериологического метода. Изучение культуральных свойств бактерий.
2. Из выросших колоний на МПА приготовить мазок, окрасить по Граму.
3. Посев из исследуемых изолированных колоний на скошенный агар для накопления чистой культуры.
4. Демонстрация техники анаэробного культивирования и сред для анаэробов: высокий столбик агара, среда Китта-Тароцци, тиогликолевая, Стюарта. Демонстрация микроанаэрозоата. Способы: Фортнера, Вейнберга.

#### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для приготовления мазка:
  - Штатив- 8 шт.
  - Пинцет – 8 шт.
  - Бактериологическая петля-8 шт.
  - Лоток с подставкой - по 8шт.
  - Предметные стекла
  - Спиртовка -8шт.
  - Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:
  - По Граму– 8 шт.
3. Микроскопы – 8 шт.
  - Иммерсионное масло – 4 шт.
4. 3 чашки с ростом колоний на МПА-4шт.
5. Скошенный агар для пересева – 8 шт.
6. Демонстрация техники анаэробного культивирования и сред для анаэробов: высокий столбик агара, среда Китта-Тароцци, тиогликолевая, Стюарта.
7. Демонстрация микроанаэрозоата.
8. Демонстрация пигментообразования бактерий.
9. Демонстрация культуральных свойств на жидких и плотных питательных средах.
8. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

### **Дыхание бактерий. Классификация бактерий по типу дыхания.**

Сущность дыхания у микроорганизмов — получение энергии, образующейся в процессе прямого биологического окисления веществ кислородом или путем дегидрирования субстрата. Накопление энергии происходит в специальных структурах бактерий, называемых мезосомами.

В соответствии с потребностями в кислороде бактерии подразделяют на следующие основные группы:

1. Облигатные (строгие) аэробы- микроорганизмы, которые растут и размножаются только в присутствии кислорода. Например: *Vibrio cholerae* *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Облигатные анаэробы — микроорганизмы, которые растут и размножаются только без доступа кислорода. Например: *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*.

3. Факультативные анаэробы — микроорганизмы, которые могут расти и размножаться как в присутствии кислорода, так и в бескислородных условиях. Например: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*.

4. Микроаэрофилы бактерии — микроорганизмы, которые лучше растут и размножаются при повышенном содержании  $\text{CO}_2$  и низком содержании кислорода. Например: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*.

### **Методы культивирования анаэробов**

#### **Способы создания анаэробных условий**

а) механический — удаление (откачивание) воздуха из анаэростана с помощью вакуумного отсоса. Затем анаэростан заполняют газовой смесью, которая состоит из 80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа;

б) химический — поглощение кислорода за счет химических веществ (щелочной раствор пирогаллола, двууглекислая сода);

в) биологический (метод Фортнера) — совместное культивирование анаэробов и аэробов. При этом на одну чашку Петри с плотной питательной средой (чаще используют среду Цейссlera) засевают культуру анаэробов, на другую — культуру аэробов, способных энергично поглощать кислород. В качестве аэробов используют культуру чудесной палочки (*Serratia marcescens*). Края чашки Петри парафинируют;

г) физико-химический — посев исследуемого материала на специальные среды для анаэробов, например, среды Китта-Тароцци и Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар). Среда перед посевом регенерируют (кипятят на водяной бане в течение 15 минут) для удаления кислорода.

Состав среды Китта-Тароцци:

-кусочки печени — для адсорбции кислорода;

-1% глюкозы — для осуществления анаэробного гликолиза;

-полужидкий агар — не допускает кислород в толщу среды.

### **Получение чистой культуры анаэробов**

#### **1. Метод Вейнберга (метод разведений)**

Для получения изолированных колоний анаэробов из среды Китта-Тароцци с ростом анаэробных бактерий забирают культуру пастеровской пипеткой с запаянным концом и последовательно опускают эту пипетку вначале в 3 пробирки с физиологическим раствором, а затем — 3 пробирки с растопленным полужидким сахарным МПА. После термостатирования при  $37^\circ\text{C}$  в последних наблюдается рост изолированных колоний анаэробов.

#### **2. Метод Перетца.**

Одно из последних разведений по Вейнбергу в полужидком агаре выливают в крышку чашки Петри и закрывают ее дном так, чтобы удалить воздух. Края чашки Петри парафинируют. Посев исследуемого материала на среду Цейссlera секторами с последующим культивированием в анаэростане.

## ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## Лабораторная работа №7.

### Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.

**Учебная цель:** Освоить бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.

#### План занятия:

1. Ферменты, классификация. Ферменты, расщепляющие углеводы, белки, жиры, ферменты патогенности. Питательные среды, используемые для изучения ферментативной деятельности микроорганизмов.
2. Проверка чистоты выделенной культуры макро- и микроскопически.
3. Идентификация чистой культуры бактерий по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, фаголизабельным свойствам (3 этап).
4. Бактериофаги, их применение для идентификации бактерий.
5. Определения антибиотикочувствительности методом стандартных дисков.

#### Самостоятельная работа

1. Приготовление мазка, окраска по Граму.
2. Посев культуры на среды Гисса и МПБ.
3. Определение антибиотикочувствительности.
4. Демонстрация питательных сред для изучения ферментативной активности микроорганизмов.
5. Демонстрация феномена бактериофагии на плотных и жидких питательных средах.
6. Демонстрация выделения чистой культуры подвижных микроорганизмов по методу Шукевича.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для приготовления мазка:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:  
По Граму– 8 шт.
3. Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
4. Пробирки с ростом на скошенном агаре – 8 шт.
5. Среда Гисса (с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой, сахарозой), для посева со скошенного агара- 4 набора.
6. Пробирки с МПБ для посева со скошенного агара, для изучения протеолитических свойств – 4 шт.
7. Индикаторные бумажки на сероводород и индол -4 шт.
8. Чашки с МПА для посева со скошенного агара на антибиотикочувствительность – 4 шт.
9. Индикаторные стандартные бумажные диски с антибиотиками – 4 набора.
10. Стерильный шпатель – 4 шт.
11. Демонстрация феномена бактериофагии на плотных и жидких питательных средах.
12. Демонстрация выделения чистой культуры подвижных микроорганизмов по методу Шукевича.
13. Таблицы.

#### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

**III этап исследования.** Через 24 часа на скошенном МПА обнаружен однородный рост в виде сплошного налета желтоватого цвета. С целью проверки чистоты выделения культуры из пробирки приготавливают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для оценки чистоты культуры необходимо просматривать не менее

10 полей зрения. Нахождение в мазках со скошенного МПА только гроздьевидно расположенных грамположительных кокков, свидетельствует о чистоте выделенных культур.

Для определения биохимических бактерий производят посев выделенной культуры в среды цветного ряда (глюкоза, лактоза, маннит, сахароза, мальтоза и в МПБ для определения индола и сероводорода), или определяют эти свойства с помощью Системы Индикаторных Бумажных дисков (СИБ).

Посевы помещают в термостат при температуре 37°C на 24 часа.

### **ферменты бактерий**

Ферменты являются высокоспецифичными биологическими катализаторами, без которых невозможны жизнь и размножение. Большое количество реакций, происходящих при жизни бактериальной клетки, указывает на существование у бактерий значительного количества ферментов. Ферменты — вещества белковой природы с большим молекулярным весом. Некоторые из них относятся к протеинам, другие являются сложными белками. Они построены из двух частей белка и небелковой части, называемой простетической группой. В состав ее могут входить витамины, нуклеотиды, атомы железа и пр. Связь между белковой частью фермента и его простетической группой может быть прочной и непрочной. При наличии непрочной связи в растворах наступает диссоциация фермента и при этом может освобождаться свободная простетическая группа.

Легко диссоциирующие простетические группы ферментов называются коферментами. Обычно ферменты подразделяются на следующие основные группы:

1. Оксидоредуктазы. все ферменты, катализирующие окислительно восстановительные реакции.
2. Трансферазы. катализирующие перенос тех или иных групп (например аминогрупп, фосфатных остатков и т. д.
3. Гидролазы, расщепляющие путем гидролиза Гт или иные соединения; к этому классу относятся также фосфатазы и дезампназы — ферменты, отщепляющие соответственно гидролитическим путем фосфат или аммонийные группы от различных органических соединений.
4. Лиазы, ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенные группы (например, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SH<sub>2</sub> и т. д.).
5. Изомеразы, катализирующие внутримолекулярные перестройки в субстрате.
6. Лигаза (синтетазы) — класс ферментов, катализирующих присоединение друг к другу двух молекул с одновременным разрывом ппрофосфатной связи в трифосфатах (например, образующие C — O, C — N или C — S связи).

Наиболее высокой ферментативной активностью обладают сапрофиты; в меньшей степени это свойство выражено у патогенных бактерий. Изучение ферментов патогенных бактерий имеет исключительно важное значение, так как на основании определения ферментативной активности микробов можно дифференцировать различные виды и определять природу того или иного возбудителя заболеваний. Наряду с этим ферментативная активность микробов определяет патогенез и клиническую картину инфекционного заболевания.

Ферменты дифференцируют на экзо и эндоферменты. Экзоферменты выделяются клеткой во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции.

Ферменты бактерий подразделяются на конституитивные и индуцибельные. К первой группе относятся те ферменты, которые синтезируются бактериальной клеткой вне зависимости от того, на какой среде бактерия выращивается. Индуцибельные ферменты продуцируются данной бактерией лишь в ответ на действие специфического индуктора, присутствующего в среде.

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **Лабораторная работа №8**

**Тема: Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов.**

**Сдача модуля по теме «Физиология микробов. Принципы культивирования и идентификации микробов».**

#### **Учебная цель:**

1. Изучить методику выделения чистых культур бактерий из исследуемого материала.
2. Изучить методы индикации вирусов, риккетсий и хламидий.

#### План занятия:

1. Выделение чистой культуры аэробных и анаэробных бактерий (заключение).
2. Культивирование риккетсий, хламидий, вирусов.
3. Строение куриного эмбриона.
4. Классификация клеточных культур.
5. Способы заражения лабораторных животных, куриного эмбриона.
6. Изменения, происходящие в организме зараженных животных, куриного эмбриона, тканевых культурах (цитопатическое действие).
7. Методы индикации вирусов, риккетсий, хламидий.
8. Сдача модуля.

#### Самостоятельная работа студентов:

##### IV этап исследования. Учет биохимических свойств.

|         |         |        |          |          |       |             |
|---------|---------|--------|----------|----------|-------|-------------|
| глюкоза | лактоза | маннит | сахароза | мальтоза | индол | сероводород |
| К       | К       | К      | К        | К        | +     | -           |

- К — кислота

**ВЫВОД:** из смеси бактерий выделена и идентифицирована *Staphelococcus* spp. на основании морфологических, тинкториальных (грамположительные, гроздьевидно-расположенные кокки) и культуральных (гладкие выпуклые колонии золотистого цвета) и биохимических свойств.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Среда Гисса с посевом (с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой, сахарозой), для учета результатов- 4 набора.
2. Пробирки с МПБ, для учета результатов протеолитических свойств – 4 шт.
3. Чашки с МПА для учета результатов на антибиотикочувствительность – 4 шт.
4. Демонстрация ферментативной активности на средах Гисса кишечной палочки и стафилококков.
5. Демонстрация ферментативной активности на API -системах кишечной палочки и стафилококков.
6. Демонстрация на антибиотикочувствительность методом серийных разведений.
7. Демонстрация фаготипирования.
8. Демонстрация феномена бактериофагии на жидких и плотных питательных средах.
9. Демонстрация сред для культивирования культур тканей: среды Хенкса, 199, Игла.
10. Демонстрация овоскопа с куриным эмбрионом.
11. Демонстрационные микропрепараты: внутридерные включения при Кори, тельца Пашена при оспе, тельца Бабеша –Негри при бешенстве.
12. Демонстрационные микропрепараты: культур тканей, цитопатическое действие вируса, реакция гемадсорбции.
13. Демонстрация реакции гемагглютинации.
14. Демонстрация цветной пробы.
15. Демонстрация микропрепарата с риккетсиями
16. Демонстрация хламидий методом РИФ.
17. Таблицы.

#### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Риккетсии и хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами. В отличие от вирусов размножаются простым делением и содержат оба типа нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) и многие ферменты, необходимые для энергетического и пластического метаболизма. По типу дыхания риккетсии относятся к аэробам, но в отличие от последних, активно окисляют глютаминовую кислоту и индифферентны к глюкозе. Наличие у риккетсий высокопроницаемой оболочки позволяет им получать из клеток, в которых они размножаются, необходимые ферменты и метаболиты.

Хламидии являются энергетическими паразитами клетки-хозяина, так как у них отсутствуют собственные энергодающие ферментные системы. Вследствие этого искусственные питательные среды даже самого сложного состава не могут удовлетворить потребности риккетсий и хламидий. Для их размножения необходимы живые, метаболизирующие клетки.

Для выделения и культивирования риккетсий и хламидий применяются тканевые культуры, куриные эмбрионы и восприимчивые лабораторные животные.

Вирусы выделены в отдельное «царство»-Vira. Они содержат только один тип нуклеиновой кислоты, не имеют клеточной структуры, не имеют самостоятельного обмена веществ, являясь внутриклеточными паразитами, репродукция вирусов осуществляется разобщенным способом.

По международной классификации все вирусы подразделяются по типу нуклеиновой кислоты на 2 подтипа - РНК- и ДНК-содержащие. Дальнейшее разделение вирусов проводится на основании размеров вирусов, типа симметрии при формировании капсидов, наличия или отсутствия внешних оболочек и количества содержащихся в них капсомеров.

**ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ** является основным и наиболее достоверным, позволяет выделить вирус из исследуемого материала с последующей его идентификацией. С целью накопления вирусосодержащего материала используются куриные эмбрионы и культуры тканей (искусственно культивируемые клетки той или иной ткани). Культуры тканей поддерживаются на естественных (среда 27, Эндерса) и синтетических (среда 199, Игла, Мельника-Риордана) питательных средах, приготовленных на основе растворов Хенкса и Эрла. Культивируются они в обычных пробирках, чашках Карреля, пробирках Барского.

### **Методика заражения куриного эмбриона**

Существует несколько способов заражения куриного эмбриона. Чаще всего материал вводят в аллантоисную и амниотическую полости, на хорионаллантоисную оболочку и в желточный мешок. Перед заражением скорлупу яйца над воздушной камерой обрабатывают 70% спиртом, обжигают на пламени, смазывают 2% йодной настойкой, вторично протирают спиртом и обжигают.

При заражении в аллантоисную полость в скорлупе над воздушной камерой (границы которой заранее обводят карандашом при просвечивании яйца в овоскопе) проделывают небольшое отверстие с помощью ножниц или скальпеля. Туберкулиновым шприцем вводят 0,1-0,2 мл вирусосодержащего материала на глубину 2-3 мм ниже границы воздушной камеры. Прокол в скорлупе заливают расплавленным парафином. Вскрытие зараженных эмбрионов производят в сроки максимального накопления вируса (через 48-72 ч инкубации при температуре 37 °C) после обработки скорлупы спиртом и 2%

раствором йода ее рассекают и сбрасывают, снимают осторожно подскорлупную оболочку и рассматривают хорионаллантоисную оболочку вокруг места заражения на наличие очагов поражений (геморрагий, белесоватых очагов поражений).

Классификация клеточных культур:

- **первичные** получают непосредственно из тканей животного и человека путем разрушения протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа) межклеточного вещества. Разобщенные клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя монослой - слой толщиной в одну клетку. С помощью специальных реактивов клетки можно снять с поверхности одного сосуда и пересадить в другой. Такая манипуляция называется **пассажем**. Первичные культуры выдерживают не более 5-10 пассажей.

- **перевиваемые** (пассажные) клеточные культуры способны выдерживать неограниченное количество пассажей. Они происходят из опухолевых клеток, утративших дифференциацию и не имеющих ограничений роста.

- **полуперевиваемые** (диплоидные) культуры - фибробластоподобные клетки, которые способны к быстрому размножению, выдерживают до 30-60 пассажей и сохраняют исходный набор хромосом.

Вирусы могут репродуцироваться только в клетках живого организма. В связи с этим вирусы культивируются путем заражения куриных эмбрионов или культур тканей, а также животных-сосунков.

### **Выявление (индикация) вирусов**

#### **Обнаружение вируса в курином эмбрионе**

1. Гибель
2. Появление запаха при вскрытии
3. Помутнение жидкости в полости
4. Образование язвочек и кровоизлияний на оболочках

**Биологический метод исследования** заключается в заражении чувствительного к вирусу животного исследуемым материалом, изучении клинической и патологоанатомической картины заболевания. В рамках этого метода используются различные животные: обезьяны, кролики, морские свинки, собаки, мыши, крысы. Способы заражения: субдуральный, внутримозговой, интраназальный и другие.

Способы обнаружения вируса в организме лабораторных животных различаются в зависимости от вида животного и типа вируса.

#### **Обнаружение вирусов в культуре клеток**

Выявление по цитопатическому действию (ЦПД). ЦПД представляет собой дегенеративные изменения в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов.

Различают полную и частичную дегенерацию клеток монослоя.

При полной дегенерации, вызываемой, например вирусами полиомиелита, Коксаки и ЕСНО, клетки монослоя подвергаются значительным изменениям, большее их количество слущивается со стекла. Оставшиеся единичные клетки сморщены

Частичная дегенерация имеет несколько разновидностей:

1. По типу гроздьобразования (аденовирусы);
2. По типу очаговой деструкции (оспа, грипп);
3. По типу симпластообразования (корь, паротит, парагрипп, герпес, ВИЧ).

Пролиферативный тип изменений характерен для некоторых онкогенных вирусов, трансформирующих клетки в злокачественные.

*Внутриклеточные включения* образуются при репродукции некоторых вирусов в цитоплазме и ядре клеток (оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др.) Их обнаруживают при микроскопии после окраски монослоя по Романовскому - Гимзе, а также при люминесцентной микроскопии.

**Цветная проба Солка.** В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты. В результате этого цвет входящего в состав среды индикатора (фенолового красного) становится оранжевым. При заражении культуры клеток такими цитопатогенными вирусами, как энтеровирусы или реовирусы, метаболизм клеток подавляется, pH среды и ее цвет не меняются (среда остается красной).

**Реакция гемагглютинации.** В основе этой реакции лежит способность вирусов, содержащих рецепторы-гемагглютинины, «склеивать» эритроциты. Если есть гемагглютинины - РГА+(зонтик), если нет - РГА - (пуговка).

**Реакция гемадсорбции.** Механизм сходен с РГА.

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### Лабораторная работа №9

**Тема: Экология микробов. Нормальная микрофлора организма человека.**

#### Учебная цель:

1. Освоить закономерности синергизма и антагонизма в мире микробов.
2. Изучить нормальную микрофлору организма человека.

#### План занятия:

1. Природные микробиоценозы. Экологические связи в микробиоценозах.
2. Симбиоз, мутуализм, комменсализм, конкуренция, антагонизм, паразитизм.
3. Роль микробов в круговороте веществ в природе.
4. Этапы и факторы симбиоза человека с микробами.
5. Условия формирования ассоциации резидентов.
6. Как происходит регуляция резидентной микрофлоры?
7. Отличия патогенов от резидентов.
8. Состав резидентной микрофлоры кожных покровов человека.
9. Нормальная микрофлора организма человека.
10. Аутохтонная и аллохтонная микрофлора. Понятие об экотопах (стерильные и нестерильные экотопы организма).
11. Какими методами можно изучать микрофлору человека?
12. Факторы, оказывающие влияние на количественный и видовой состав микрофлоры организма человека.
13. Понятия: эубиоз, дисбиоз и дисбактериоз.
14. Медицинские иммунобиологические препараты для коррекции дисбиоза (пре-, про- и синбиотики).

#### Самостоятельная работа студентов

1. Изучить рост колоний на кровяном агаре.
2. Приготовить мазок из выросших колоний на кровяном агаре, окрасить его по

- Граму, изучить под микроскопом.
- Посев материала с пальцев рук на чашку с МПА (метод отпечатков).
  - Провести подсчет количества колоний микробов, выросших в отпечатках кожи пальцев рук (отпечаток пальца немытого, вымытого с мылом и обработанного спиртом).
  - Провести макроскопическое и микроскопическое изучение колоний, выросших в отпечатках кожи пальцев рук.

### ОСНАЩЕНИЕ

- Набор для микробиологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
- Набор красок:  
По Граму– 8 шт.
- Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
- Чашки Петри с МПА, разделенные на сектора для посева отпечатков пальцев рук-4шт.
- Чашки Петри с КА, для посева мазка из зева -4шт.
- Демонстрация бакпрепаратов: эубиотики.
- Таблицы.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Микроорганизмы находятся в различных взаимоотношениях друг с другом. Совместное существование двух различных организмов называется *симбиозом*. Различают несколько вариантов полезных взаимоотношений: метабиоз, мутуализм, комменсализм, сателлитизм.

*Антагонистические взаимоотношения* выражаются в виде неблагоприятного воздействия одного вида микроорганизма на другой, приводящего к повреждению и даже гибели последнего. Формы антагонизма: конкуренция, хищничество, паразитизм.

#### Микрофлора организма человека

Организм человека заселен примерно 500 видами микробов, составляющими его нормальную микрофлору, в виде сообщества микроорганизмов (*микробиоценоз*). Они находятся в состоянии равновесия (*эубиоза*) друг с другом и организмом человека. Различают нормальную микрофлору различных биотопов: кожи, слизистых оболочек полости рта, верхних дыхательных путей, ЖКТ и мочеполовой системы. В организме выделяют постоянную и транзитную микрофлору. *Постоянная* микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. *Транзитная* микрофлора не способна к длительному существованию в организме. Постоянную микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. Облигатная микрофлора (бифидо-бактерии, лактобактерии, пептострептококки, кишечная палочка и др.) является основой микробиоценоза, а факультативная микрофлора (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.) включает меньшую часть микробиоценоза. Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, заключены в высокогидратированный экзополисахаридномуциновый матрикс, образуя биологическую пленку, устойчивую к различным воздействиям.

### Протокол исследования

| № | Исследуемый материал | Результаты исследования | Графическое изображение |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------------|
|   |                      |                         |                         |

### ХРОНОМЕТРАЖ

- Определение исходного уровня знаний 25 мин.
- Самостоятельная работа 45мин.
- Проверка протоколов 10мин.
- Уборка рабочего стола 10мин.
- Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. 15 мин

## Лабораторная работа №10

### Тема: Микрофлора лекарственных растений, лекарственного сырья и объектов окружающей среды.

#### Учебная цель:

1. Изучить фитопатогенные микроорганизмы, роль микрофлоры в порче растительного лекарственного сырья и лекарственных средств, санитарно-показательные микроорганизмы.
2. Изучить принципы санитарно-микробиологических исследований почвы, воды, воздуха; санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук аптечных работников, посуды и оборудования.

#### План занятия:

1. Роль микробов ризосферы в жизни растений.
2. Болезни лекарственных растений, вызываемые фитопатогенными бактериями, грибами и вирусами.
3. Роль микрофлоры в порче растительного лекарственного сырья и лекарственных средств.
4. Источники и пути попадания паразитических микробов в почву, воду и воздух.
5. Источники и пути микробного загрязнения (контаминации) растительного лекарственного сырья и готовых лекарственных средств.
6. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.
7. Принципы санитарно-микробиологических исследований почвы, воды, воздуха.
8. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с рук аптечных работников, посуды и оборудования.
9. Значение санитарно-микробиологических исследований в оценке санитарного состояния аптечных помещений, производственных цехов в соответствии с требованиями нормативных документов.

#### Самостоятельная работа

1. Санитарно-бактериологическое исследование воды.
2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха
3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с аптечной посуды.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для микробиологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром -8шт.
2. Набор красок:  
По Граму– 8 шт.
3. Микроскопы – 8 шт.  
Иммерсионное масло – 4 шт.
4. Чашки Петри с МПА с отпечатками пальцев, для изучения роста колоний (результаты занятия №9).
5. Чашки Петри с КА, для изучения роста колоний (результаты занятия №9).
6. Приготовление мазка из колоний и окраска по Граму.
7. Смыв с аптечной посуды:  
исследуемый флакон,  
пробирка со стерильным р-ром NaCl,  
чашка с ЖСА.
8. Определение ОМЧ воздуха:  
чашки с МПА – 2 шт.,  
аппарат Кротова.

8. Демонстрация определения коли-индекса методом мембранных фильтров - чашки Петри со средой Эндо и фильтром с колониями кишечной палочки.

9. Определение микробного числа воды:

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

10. Таблицы

### Методические указания к выполнению самостоятельной работы

#### 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 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.

#### 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 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.

### 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 1 м <sup>3</sup> |

|                                                    |  |  |  |
|----------------------------------------------------|--|--|--|
| 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.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

### МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ, ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Растительное лекарственное сырье может обсеменяться микроорганизмами в процессе его получения: инфицирование происходит через воду, нестерильную аптечную посуду, воздух производственных помещений и руки персонала. Обсеменение происходит также за счет нормальной микрофлоры растений и фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей заболеваний растений. Фитопатогенные микроорганизмы способны распространяться и заражать большое количество растений.

Микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растений, относятся к эпифитам (греч. *epi* – над, *phyton* – растение). Они не наносят вреда, являются антагонистами некоторых фитопатогенных микроорганизмов, растут за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Эпифитная микрофлора препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, усиливая тем самым иммунитет растений. Наибольшее количество эпифитной микрофлоры составляют грамотрицательные *Erwinia herbicola*, образующие на мясопептонном агаре золотисто-желтые колонии. Эти бактерии являются антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей. Обнаруживают в норме и другие бактерии – *Pseudomonas fluorescens*, реже *Bacillus mesentericus* и небольшое количество грибов. Микроорганизмы находятся не только на листьях, стеблях, но и на семенах растений. Нарушение поверхности растений и их семян способствует накоплению на них большого количества пыли и микроорганизмов. Состав микрофлоры растений зависит от вида, возраста растений, типа почвы и температуры окружающей среды. При повышении влажности численность эпифитных микроорганизмов возрастает, при понижении влажности уменьшается.

В почве, около корней растений, находится значительное количество микроорганизмов. Эта зона называется *ризосферой* (от греч. *rhiza*-корень, *sphaïra*- шар). В ризосфере часто присутствуют неспорообразующие бактерии (псевдомонады, микобактерии и др.), встречаются также актиномицеты, спорообразующие бактерии и грибы. Микроорганизмы ризосферы переводят различные субстраты в соединения доступные для растений, синтезируют биологически активные соединения (витамины, антибиотики и др.), вступают в симбиотические взаимоотношения с растениями, обладают антагонистическими свойствами против фитопатогенных бактерий.

Микроорганизмы поверхности корня растений (микрофлора ризопланы) в большей степени, чем ризосфера, представлены псевдомонадами. Симбиоз мицелия грибов с корнями высших растений называют микоризой (т.е. грибокорнем) (от греч. *mykes* –гриб, *rhiza*- корень). Микориза улучшает рост растений.

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, вирусы и грибы. Болезни, вызываемые бактериями называют бактериозами. Среди возбудителей бактериозов встречаются псевдомонады, микобактерии, эрвинии, коринебактерии, агробактерии и др. К бактериозам относятся различные виды гнилей, некрозы тканей, увядание растений, развитие опухолей и др.

Различают общие и местные бактериозы. Общие бактериозы вызывают гибель всего растения или его отдельных частей. Они могут проявляться на корнях (корневые гнили) или в сосудистой системе растений. Местные бактериозы ограничиваются поражением отдельных участков растений, проявляясь на паренхимных тканях.

Род *Erwinia* включает виды, вызывающие болезни типа ожога, увядания, мокрой или водянистой гнили, например *E.amylovora* – возбудитель ожога яблонь и груш, *E.carotovora* – возбудитель мокрой бактериальной гнили.

К роду *Pseudomonas* относят различные виды, в частности вызывающие бактериальную пятнистость (*P.syringae*), при этом на листьях образуются пятна разной окраски и размеров в зависимости от видов растений.

Бактерии рода *Xanthomonas* поражают листья, вызывая пятнистость; проникая в сосудистую систему растения, закупоривая ее элементы, они вызывают гибель растения. Различают возбудителей сосудистого бактериоза – *X.campestris*, туберкулеза – *X.betica*, черной бактериальной пятнистости – *X.vesicatoria* и др.

Представители рода *Corynebacterium* вызывают сосудистые и паренхиматозные заболевания растений. Гликопептиды этих бактерий повреждают клеточные мембраны сосудов, в результате чего происходит закупорка сосудов и гибель растений. Они поражают растения из семейства разноцветных и бобовых (*C.fascians*), вызывают увядание растений семейства бобовых (*C.insidiosum*), бактериальный рак (*C.michiganense*).

Агробактерии способствуют развитию различных опухолей у растений. Образование опухолей вызывается онкогенной плазмидой, передающейся агробактериями в растительные клетки. Эти бактерии вызывают у растений образование корончатых галлов – опухолей. После развития опухоли агробактерии в тканях обычно отсутствуют.

Передача возбудителей бактериозов происходит через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух, путем переноса насекомыми, моллюсками, нематодами. Бактерии проникают в растения через устьица, нектарники и другие части растений, а также даже через небольшие повреждения. При проникновении бактерий внутрь растений происходит повреждение растительных клеток, они мацерируются и отслаиваются друг от друга. Такой путь проникновения называется интрацеллюлярным и межклеточным, а заболевания – паренхиматозными. В случаях распространения и размножения бактерий в сосудистых пучках происходит как бы закупоривание их просвета бактериальной массой. В результате этого процесса и действия бактериальных токсинов растения увядают.

Вирусы, вызывающие болезни растений, делят на возбудителей мозаики и желтухи. При мозаичной болезни растений появляется мозаичная (пятнистая) расцветка пораженных листьев и плодов, растения отстают в росте. Желтуха проявляется карликовостью растений, измененными многочисленными боковыми побегами, цветками и т.д.

Грибы, поражающие растения, могут в случае приготовления из пораженного зерна продуктов питания вызывать пищевые отравления – микотоксикозы. Примером микотоксикоза является эрготизм – заболевание, возникающее при употреблении продуктов, приготовленных из зерна, зараженного спорыньей (гриб *Claviceps purpurea*). Гриб поражает в поле колоски злаковых: образуются склероции гриба, называемые рожками.

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### Лабораторная работа №11

#### Тема: Основы генетики микробов.

**Учебная цель:** Изучить материальную основу наследственности, формы изменчивости микроорганизмов, генетические рекомбинации.

#### План занятия:

1. Материальная основа наследственности микроорганизмов.
2. Понятие о генотипе и фенотипе.
3. Бактериальная хромосома. Функции хромосомы.
4. Плазмиды бактерий. Разновидности плазмид: трансмиссивные, нетрансмиссивные, интегративные, неинтегративные. Плазмиды вирулентности.
5. Изменчивость микроорганизмов. Модификации. Мутации, их классификация.
6. Использование достижений генетики в разработке новых лечебно-профилактических средств и диагностических препаратов.

#### Самостоятельная работа студентов:

1. Просмотр и зарисовка демонстрационных препаратов:
  - а) R-S диссоциация бактерий.

### ОСНАЩЕНИЕ

1. Учет результатов посева на ЖСА смывов с аптечной посуды.

2. Учет результатов определения ОМЧ воздуха на МПА.
3. Учет результатов определения микробного числа воды на чашках с МПА.
4. Демонстрация: чашка с МПА с R- Сдиссоциацией бактерий.
5. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Изменчивость представляет собой явление, при котором изменяются отдельные признаки и свойства живого организма в процессе его развития. Изменчивость свойственна каждому виду микробов и возникает в определенных условиях внешней среды или в результате переноса генетического материала от одной клетки к другой.

Существующие формы изменчивости микроорганизмов подразделяются на две группы: первую группу составляет фенотипическая изменчивость, которая включает модификации, описанные в литературе под названием диссоциации с характерными изменениями морфологических, культуральных, ферментативных и некоторых других биологических свойств микробов; вторую группу составляет генотипическая изменчивость, которая включает: 1) мутации, т. е. наследуемую изменчивость микробов, не связанную с поступлением новой генетической информации, 2) рекомбинации — наследуемую изменчивость, связанную с поступлением новой генетической информации.

### *Модификационная изменчивость*

Модификации представляют собой фенотипические ненаследуемые изменения, которые возникают у бактерий в результате воздействия факторов внешней среды.

Фенотип — форма выражения генотипа, проявляющаяся комплексом новых признаков и свойств микроорганизма в определенных условиях внешней среды. Для фенотипа характерны появление нитевидных, шаровидных форм штаммов, образование споры, капсулы и атипичная ферментация углеводов. Примером может служить штамм *E. coli* с генотипом *lac* +, который синтезирует фермент р-галактозидазу, катализирующий ферментацию лактозы, но этот генотип проявляется в фенотипе при условии их культивирования на среде с лактозой. Переход типичной формы микробов в атипичные затрудняет микробиологический диагноз болезни.

Впервые сообщения об изменении культуральных свойств микробов появились в работах Поль де Крайфа (1921), наблюдавшего расщепление культуры кроличьей септицемии на вирулентные и авирулентные штаммы. Сущность этого явления состоит в том, что при расщепе на плотной питательной среде бактериальной культуры из одного типичного штамма (вида) в основном появляются два типа колоний, отличающихся друг от друга определенными формами. S-форма (гладкая) является нормальным типом колоний для многих грамотрицательных бактерий, кишечной и других групп; R-форма (шероховатая) — измененный тип колоний. Бактерии ки-шечно-тифозно-дизентерийной группы вирулентны в S-форме колоний, а в R-форме не обладают вирулентными свойствами. Бактерии чумы, туберкулеза, сибирской язвы вирулентны в R-форме, а бруцеллы — в S-форме.

В условиях культивирования микробов возможен переход от S-формы к R-форме. При этом капсульные бактерии теряют капсулы, лишаются биохимической активности и становятся неполноценными в антигенном отношении, приобретая неспецифические антигены. Подвижные бактерии теряют жгутики.

Переход S-формы в R-форму происходит в основном через промежуточные O и слизистые M-колонии. В процессе расщепления культур еще наблюдаются карликовые (D-dwarf), G-колонии (gonidial), появляющиеся как дочерние колонии на поверхности или на краю нормально развивающихся.

В условиях нарушения температурного режима, старения культуры, повышенной концентрации солей, применения антибиотиков и фагов понижается вирулентность, изменяются антигенные и иммуногенные свойства, появляются антибиотикоустойчивые и фаго-устойчивые штаммы, аэробы становятся факультативными анаэробами, утрачивают некоторые имеющиеся ферменты или приобретают новые ферменты. Если культивировать кишечные палочки на среде с добавлением лактозы, то у нее появляется новый, фермент р-галактоза. Изменение метаболизма у бактерий можно вызвать ультрафиолетовым облучением и рентгеновскими лучами. Изменяя параметры среды обитания, можно установить пределы и границы отклонения микробных клеток. Таким образом, широк диапазон фенотипических изменений. В основе этих изменений лежит прежде всего приспособительная активность обменных функций. Адаптация — это закон живого, и по этому закону живут и развиваются микроорганизмы.

Историческое наблюдение и экспериментальные исследования показывают, что наследственность и изменчивость представляют собой как бы две стороны одного и того же явления, т. е. в природе происходит закономерный процесс не только изменчивости, но и передачи наследственных свойств. Живой организм, находясь в условиях внешней среды, в одном случае приспособляется к новым условиям, изменяя свой обмен веществ, а в другом — погибает, если происходит резкое изменение внешней среды.

## ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## Лабораторная работа №12

**Тема: Основы генетической инженерии и медицинской биотехнологии.**

### **Учебная цель:**

1. Изучить способы передачи генетической информации между бактериями: трансдукция, трансформация и конъюгация.
2. Изучить основы биотехнологии и генетической инженерии.

### **План занятия:**

1. Медицинская биотехнология.
2. Генетические рекомбинации: трансдукция, конъюгация, трансформация
3. Роль генетических рекомбинаций в генетической инженерии и медицинской биотехнологии.
4. Использование плазмид в генно-инженерных исследованиях.
5. Применение генетических и молекулярно-биологических методов в диагностике инфекционных заболеваний: ПЦР, метод молекулярных зондов.
6. Биопрепараты, получаемые методом генной инженерии (вакцины, моноклональные антитела, гормоны, диагностикумы).

### **Самостоятельная работа студентов**

1. Учет результатов опыта трансформации.
2. Учет результатов опыта трансдукции.
3. Учет результатов опыта конъюгации.
4. Указать правильные ответы в тестовых заданиях.
5. Зарисовка таблиц.

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Демонстрация опыта конъюгации.
2. Демонстрация опыта трансформации.
3. Демонстрация опыта трансдукции.
4. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

### Постановка опыта трансформации

Реципиент — штамм *Bacillus subtilis* Str (сенная палочка, чувствительная к стрептомицину); донор — ДНК, выделенная из штамма *B. Subtilis* Str (устойчивого к стрептомицину). Селективная среда для отбора рекомбинантов (трансформантов) питательный агар, содержащий 100 ЕД/мл стрептомицина.

К 1 мл бульонной культуры *B. Subtilis* добавляют 1 мкг/мл раствора ДНКазы в 0,5 мл раствора хлорида магния для разрушения ДНК, не проникшей в бактериальные клетки реципиентного штамма, и выдерживают в течение 5 мин. Для определения количества образовавшихся стрептомицинустойчивых рекомбинантов (трансформантов) 0,1 мл неразведенной смеси высевают на селективную среду в чашку Петри. Для определения количества клеток реципиентной культуры в изотоническом растворе хлорида натрия готовят 10-кратные разведения до  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  (для получения сосчитываемого количества колоний), высевают по 0,1 мл на питательный агар без стрептомицина, а для контроля — на агар со стрептомицином. На последней среде реципиентная культура не должна расти, поскольку она чувствительна к стрептомицину. Посев инкубируют, при  $37^{\circ}\text{C}$ . На следующий день считают результаты опыта и определяют частоту трансформации по отношению количества выросших рекомбинантных клеток к числу клеток реципиентного штамма.

Допустим, что при высеве 0,1 мл культуры реципиентного штамма в разведении  $10^{-5}$  выросло 170 колоний, а при высеве 0,1 мл неразведенной смеси — 68 колоний рекомбинантного штамма. Поскольку каждая колония образовалась в результате размножений только одной бактериальной клеткой, то в 0,1 мл засеянной культуры реципиента содержится  $170 \times 10^5$  жизнеспособных клеток, а в 1 мл —  $170 \times 10^6$ , или  $1,7 \times 10^8$ . В то же время в 0,1 мл смеси находится 68 рекомбинантных клеток, а в 1 мл — 680, или  $6,8 \times 10^2$ .

Таким образом, частота трансформации в данном опыте будет равна:

$$\frac{6,8 \cdot 10^{-2}}{1,7 \cdot 10^8} = 4,0 \cdot 10^{-6}$$

### Постановка опыта специфической трансдукции

Реципиент — штамм *E. coli* lac<sup>-</sup>, лишенный 3-галактозидазного оперона, контролирующего ферментацию лактозы. Трансдуцирующий фаг — фаг X dgal, в геноме которого часть генов замещена (3-галактозидазным опероном *E. coli*). Он является дефектным, т. е. не способен вызывать продуктивную инфекцию, заканчивающуюся лизисом кишечной палочки, и обозначается буквой d (фаг dgal) с названием содержащегося в геноме бактериального оперона gal. Селективная среда — среда Эндо, на которой лактозоотрицательные бактерии реципиентного штамма образуют бесцветные колонии, а лактозоположительные колонии рекомбинантного штамма приобретают красный цвет с металлическим оттенком. К 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиентного штамма добавляют 1 мл трансдуцирующего фага dgal в концентрации  $10^6$ - $10^7$  частиц в 1 мл. Смесь инкубируют в течение 60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , после чего готовят ряд 10-кратных разведений (в зависимости от предполагаемой концентрации бактерий) для получения сосчитываемого количества колоний. Из пробирки с разведением  $10^{-6}$  делают высев по 0,1 мл культуры на 3 чашки Петри со средой Эндо и равномерно распределяют жидкость шпателем по поверхности среды.

Посевы инкубируют в течение 1 суток, после чего отмечают результаты опыта и вычисляют частоту трансдукции по отношению количества клеток рекомбинантов (трансдуктантов), обнаруженных на всех чашках, к числу клеток реципиентного штамма.

Например, после посева 0,1 мл смешанной культуры в разведении  $10^{-6}$  на 3 чашках со средой Эндо выросло соответственно 138, 170 и 160 бесцветных колоний реципиентного штамма, на первой и последней чашках — 5 и 1 колонии трансдуктантов красного цвета. Следовательно, частота трансдукции в этом случае будет равна:

$$\frac{(5+1) \cdot 10 \cdot 10^{-6}}{(138+170+160) \cdot 10 \cdot 10^{-6}} = \frac{6}{486} = 1,3 \cdot 10^{-2}$$

### Постановка опыта конъюгации с целью передачи фрагмента хромосомы, который содержит ген *leu*, контролирующий синтез лейцина.

Донор — штамм *E. coli* K12 Hfr *leu*<sup>S</sup>; реципиент — штамм *E. Coli* K12 F<sup>-</sup> *leu*<sup>+</sup> Str<sup>R</sup>. Hfr — обозначение состояния, для которого характерна высокая частота рекомбинации. Селективная среда для выделения рекомбинантов — минимальная глюкозосолевая среда:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,5 г,  $\text{MgSO}_4$  — 0,1 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1 г,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,001 г,  $\text{FeSO}_4$  — 0,0005 г, глюкозы — 2 г, стрептомицина — 200 ЕД/мл, дистиллированной воды — 1 л.

К 2 мл 3-часовой культуры реципиента добавляют 1 мл бульонной культуры донора. Посевы инкубируют при 37° С в течение 30 мин. Затем смесь разводят до 10<sup>-2</sup>-10<sup>3</sup> и высевают по 0,1 мл на селективную агаровую среду в чашки Петри, на которой вырастут только колонии рекомбинантов. В качестве контроля на ту же среду высевает донорский и реципиентный штаммы, которые не будут расти на ней, т. к. первый штамм чувствителен к стрептомицину, а второй аутокотрофен по лейцину. Кроме того, культуру донорского штамма высевает на селективную среду без стрептомицина, а культуру реципиентного штамма — на полную среду (питательный агар) с антибиотиками для определения числа жизнеспособных клеток. Посевы инкубируют при 37° С до следующего дня. После подсчета числа выросших колоний определяют частоту рекомбинаций по отношению количества рекомбинантных клеток к реципиентным.

Например, после посева 0,1 мл смеси донорских и реципиентных культур в разведении 10<sup>-2</sup> выросло 150 колоний рекомбинантов, а после посева 0,1 мл культуры реципиента из разведения 10<sup>-6</sup> 75 колоний. Таким образом, частота рекомбинации будет равна:

$$\frac{150 \cdot 10 \cdot 100}{75 \cdot 10 \cdot 10^6} = \frac{1,5 \cdot 10^5}{7,5 \cdot 10^8} = 2,0 \cdot 10^{-4}$$

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — один из современных молекулярно-генетических методов, основанный на принципе многократного копирования (амплификации) определенного участка ДНК или РНК. В результате этого процесса количество определяемой ДНК в пробе возрастает в десятки миллионов раз, что делает возможной последующую детекцию амплифицированной ДНК. Таким образом, ПЦР позволяет выявлять ничтожно малые фрагменты ДНК, характерные для определенного вида микробов, и точно идентифицировать этот вид.

ПЦР в клетке была открыта более 30 лет назад Нобелевскими лауреатами А.Кронбергом и Д.Ледебергом. Принцип метода ПЦР *in vitro* был разработан К.Мюлисом в 1983 году, также ставшим Нобелевским лауреатом. Почти немедленно появились сообщения о его практическом применении. Однако в этот период из-за отсутствия необходимого оборудования ПЦР проводили путем ручного переноса пробирок в термостаты с нужной температурой. Необходимый для синтеза ДНК фермент ДНК-полимераза разрушался после каждого этапа денатурации (при 95°С), поэтому требовалось постоянное добавление его новых порций.

В 1988 г была получена термостабильная ДНК-полимераза из бактерии *Thermophilus aquaticus*, живущей в горячих источниках. Были разработаны специальные приборы для амплификации (термоциклеры). Созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это привело к тому, что ПЦР стал доступным для широкого применения в лабораторной практике.

**В настоящее время наиболее быстро развиваются пять основных направлений генной диагностики:**

- инфекционных заболеваний (туберкулез, гонорея, вирусные инфекции — гепатиты В и С, ВИЧ, ЦМВ и др.),
- онкологических заболеваний,
- генетических заболеваний,
  - идентификация личности (трансплантация органов и тканей, судебная медицина, определение отцовства),
  - диагностика патогенов в пище.

**Исследуемый материал:** кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы.

**Постановка ПЦР включает следующие этапы:**

#### **1. Выделение ДНК (РНК) из исследуемого материала (пробоподготовка).**

Клетки лизируют детергентами или высокой температурой. Затем отделяют ДНК от клеточных обломков и разрушают клеточные нуклеазы. Все это обеспечивают приборы: миницентрифуги, развивающие скорость 12000 -14000 оборотов в минуту, вортексы для перемешивания, минитермостаты для пробирок, обеспечивающие быстрое изменение температуры от +30°С до +100°С.

#### **2. Непосредственная амплификация выделенных участков (копий) нуклеиновых кислот.**

ПЦР обеспечивает быстрое и многократное умножение, амплификацию (*amplification* — усиление, увеличение) количества фрагментов генома. Для этого в пробирку с выделенной ДНК добавляют необходимые реактивы и помещают в амплификатор (термоциклер). Этот прибор позволяет циклически изменять и поддерживать перепады температур в пробирке на несколько десятков градусов за несколько секунд. Если в пробирке есть искомая ДНК, то в ней происходит ряд процессов:

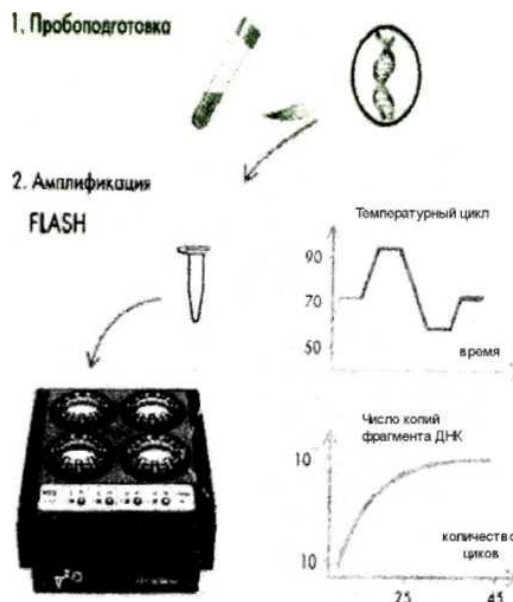
- В результате нагревания до 94 -95°С двойная цепь ДНК разделяется на две отдельные цепи.
- К одноцепочечной ДНК-мишени присоединяется праймер.

Праймер — это последовательность из 15 — 30 нук-леотидов, комплементарная маркерному фрагменту ДНК. При создании оптимальной температуры (45-70°С) происходит связывание (отжиг) праймера с соответствующим участком ДНК: один праймер — на одной нити, другой — на второй нити ДНК. Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина — цитозин.

- Синтез (элонгация) — достраивание второй цепи

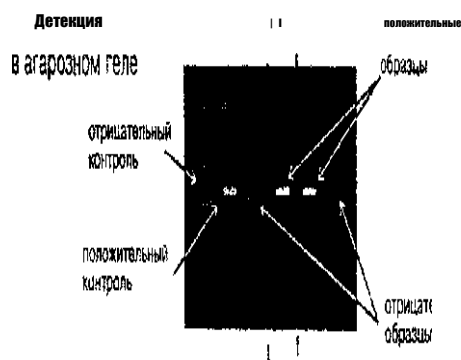
ДНК.

ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к праймерам, достраивая двухцепочечные фрагменты ДНК (~ при 72°C). Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат матрицей для синтеза новых цепей в следующем цикле амплификации — это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируется  $10^6$  копий фрагмента. Через 30 — 40 циклов синтезируется такое количество ДНК, которое можно визуально учитывать после электрофореза в агарозном геле или другими способами.



### 3. Определение (детекция) продуктов ПЦР, полученных на втором этапе.

Выявление наработанного продукта чаще всего проводят при помощи электрофореза в 2-3% агарозном геле, содержащем бромид этидия (специфический флюоресцентный краситель ДНК). Поглощая ультрафиолетовый свет краситель, связанный с ДНК, флюоресцирует. В результате видна оранжевая полоска на уровне контрольной ДНК. Кроме того, используют ферментно-гибризационный метод или ПЦР в режиме «реального времени» с помощью флюоресцентных красителей.



**Под генной (генетической) инженерией** подразумевают целый комплекс технологий, методов, процессов, посредством которых получают рекомбинантные (созданные благодаря биотехнологии на основе ДНК) РНК и ДНК, а также гены из клеток организмов, осуществляют различные манипуляции с генами и вводят их в другие организмы. Генная инженерия не является наукой – это только набор инструментов, использующий современные достижения клеточной и молекулярной биологии, генетики, микробиологии и вирусологии

Учёные, биохимики и молекулярные биологи научились модифицировать гены или создавать совершенно новые, комбинируя гены различных организмов. Они научились также синтезировать гены, причём точно по заданным схемам. Они научились вводить такие искусственные гены в живые организмы и заставили их там работать. Это было начало генетической инженерии. Задумаемся над следующим обстоятельством.

Основа микробиологической, биосинтетической промышленности — бактериальная клетка. Необходимые для промышленного производства клетки подбираются по определённым признакам, самый главный из которых — способность производить, синтезировать, при этом в максимально возможных количествах, определённое соединение — аминокислоту или антибиотик, стероидный гормон или органическую кислоту.

Иногда надо иметь микроорганизм, способный, например, использовать в качестве «пищи» нефть или сточные воды и перерабатывать их в биомассу или даже вполне пригодный для кормовых добавок белок. Иногда нужны организмы, способные развиваться при повышенных температурах или в присутствии веществ, безусловно смертельных для других видов микроорганизмов. Задача получения таких промышленных штаммов очень важна, для их видоизменения и отбора разработаны многочисленные приёмы активного воздействия на клетку — от обработки сильно действующими ядами до радиоактивного облучения.

**Медицинская биотехнология** - объединение области биотехнологии, медицинских приложений, в частности в области здравоохранения.

Большинство фармацевтических препаратов относительно так называемых *simple molecules* найдены путем проб и ошибок для лечения симптомов болезни или заболевания. Биофармацевтика *large biological molecules*, белков, - это относительно молодая отрасль. Ее продукция взаимодействует с недоступными традиционным лекарствам проблемами организма. Пациент обычно принимает *small molecule* в качестве таблетки, в то время как *large molecule* вводят.

Малые молекулы производят химическим путем, большие же выращивают из живых клеток подобных тем, что находятся в организме человека: например, клеток бактерий, дрожжевых, животных или растительных.

Фармакогеномика - это изучение того, как индивидуальное генетическое наследие организма реагирует на различные лекарства. То есть изучение взаимосвязи между фармацевтическими препаратами и генетикой. Задача фармакогеномики в разработке и производстве лекарственных препаратов, генетически подходящих любому человеку. Фармакогеномика ведет разработки по следующим направлениям:

1. Развитие индивидуальных лекарств. Благодаря фармакогеномике фармацевтические компании могут создавать препараты на основе белков, ферментов и РНК молекул, связанных с конкретными генами и заболеваниями.

2. Более точные методы определения необходимой дозы препарата. Знание генетики пациента позволит врачам определить насколько хорошо его тело может переносить медицинское воздействие. Это позволит максимально увеличить стоимость медикаментов и уменьшить возможность передозировки.

3. Совершенствование лекарств. Находить возможные методы лечения проще, зная генетическую структуру цели. Гены связаны с возникновением многочисленных заболеваний и расстройств, с современной биотехнологией они могут быть использованы в качестве мишеней для разработки новых эффективных методов лечения, которые значительно сократили бы процесс открытия новых лекарств.

4. Повышение качества вакцин. Безопасные вакцины могут быть изготовлены организмом, измененном при помощи генной инженерии. Эти вакцины будут вызывать иммунный ответ без соответствующего инфекционного риска. Такие вакцины будут недорогими, стабильными, легко хранящимися, и могут быть настроены на несколько патогенов одновременно.

Генетическое тестирование включает в себя непосредственно изучение ДНК молекулы. И для определения мутировавшей последовательности ученые сканируют ДНК пациента.

Существует два типа генетического тестирования. В первом, исследователь может определять короткие отрезки ДНК, чьи последовательности дополняют мутировавшие. Во втором, проводить путем генной терапии сравнение последовательности ДНК в геноме пациента со здоровым образцом.

Генетическое тестирование в настоящее время может обнаружить мутации, связанные с редкими генетическими нарушениями, такими как кистозный фиброз или серповидно-клеточная анемия. Однако генетические тесты не могут обнаруживать каждую мутацию, связанную с определенным условием, поскольку многие из них еще не открыты.

## ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа              | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                 | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола               | 10мин.  |

5. Контроль конечного уровня знаний и  
Задание на дом.

15 мин.

### Лабораторная работа №13

**Тема: Влияние физических факторов окружающей среды на жизнедеятельность микробов.**

#### Учебная цель:

1. Изучить методы стерилизации (физические, механические, химические).
2. Изучить методы контроля эффективности стерилизации.

#### План занятия:

1. Методы стерилизации: физические, химические, биологические, механические.
2. Устройство и применение печи Пастера, автоклава, аппарата Коха.
3. Стерилизация различных лекарственных средств в зависимости от их природы, формы, лабильности к физическим факторам.
4. Контроль качества стерилизации.
5. Понятие об асептике, антисептике и дезинфекции.
6. Антисептики и дезинфектанты.
7. Принципы контролирования качества дезинфекции.
8. Демонстрация антисептических и дезинфицирующих средств.

#### Самостоятельная работа студентов:

1. Провести и учесть результаты опыта по определению действия высокой температуры (80°C) на спорообразующие (антракоид) и аспорогенные (кишечная палочка и стафилококк) микроорганизмы.
  - Заполнить протокол по форме:

| Учет роста культуры | Стафилококк | Кишечная палочка | Антракоид |
|---------------------|-------------|------------------|-----------|
| до прогревания      |             |                  |           |
| после прогревания   |             |                  |           |

Вегетативные формы патогенных микроорганизмов погибают при 50-60°C в течении 30 минут, а при температуре 70° С в течении 5-10 минут. Споры бактерий обладают большей устойчивостью к высоким температурам, что объясняется содержанием в них воды в связанном состоянии, большим содержанием солей кальция, липидов и плотностью, многослойностью оболочки. Следовательно, стафилококк и кишечная палочка после прогревания погибают, а споры антракоида выживают. Это и надо учитывать в оценке результатов посева.

- Заполнить самостоятельно таблицу:

| №  | Способ стерилизации     | Аппарат | Надёжность | Стерилизуемый материал |
|----|-------------------------|---------|------------|------------------------|
| 1. | Стерилизация в пламени  |         |            |                        |
| 2. | Плазменная Стерилизация |         |            |                        |
| 3. | Сухой жар               |         |            |                        |
| 4. | Паром под давлением     |         |            |                        |
| 5. | Текучим паром           |         |            |                        |
| 6. | Тиндализация            |         |            |                        |
| 7. | Фильтрация              |         |            |                        |

|     |                                                  |  |  |  |
|-----|--------------------------------------------------|--|--|--|
| 8.  | Физические факторы (УФЛ, гамма-лучи, ультразвук) |  |  |  |
| 9.  | Газовая стерилизация                             |  |  |  |
| 10. | Пастеризация                                     |  |  |  |

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для микробиологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла  
Спиртовка -8шт.  
Флакон с физ.р-ром – 8шт.
2. Для опыта:  
Пробирка с взвесью кишечной палочки – 2шт.  
Пробирка с взвесью стафилококка- 2шт.  
Пробирка с взвесью антракоида- 2 шт.  
Водяная баня -1 шт.  
Стерильные скошенные агары -12 шт.
3. Демонстрация: печи Пастера, автоклава, аппарата Коха.
4. Демонстрация антисептических и дезинфицирующих средств.
5. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Стерилизация-это обеспложивание, т. е. полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор.

Стерилизацию производят различными способами:

**1. Физическими** (воздействие высокой температуры, УФ-лучей, повышенного давления, пара, гамма-лучей, ультразвука).

**2. Химическими** (использование различных дезин-фектантов, антисептиков).

**3. Биологическим** (применение антибиотиков).

**4. Механическими** (фильтрация).

В лабораторной практике обычно применяют физические способы стерилизации.

Возможность и целесообразность использования того или иного способа стерилизации обусловлена особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими и химическими свойствами.

К *физическим* способам стерилизации можно отнести прокаливание в пламене, стерилизацию сухим жаром в печи Пастера, кипячение, стерилизацию текучим паром в аппарате Коха, паром под давлением в автоклаве, тинда-лизацию, пастеризацию, стерилизацию УФЛ, ультразвуком.

*Механическая* стерилизация осуществляется фильтрованием с помощью бактериальных фильтров, изготовленных из различных мелкопористых материалов, поры фильтров должны быть достаточно мелкими, чтобы обеспечить механическую задержку бактерий. Этим методом стерилизуют питательные среды, содержащие белок, сыворотки, антибиотики; отделяют бактерии от вирусов, фагов, экзотоксинов.

В микробиологической практике используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные фильтры (свечи) Шамберлана и Беркефельда.

а) *фильтры Зейтца* — диски из смеси асбеста с целлюлозой, толщина их 3-5мм, диаметр 35-140мм;

б) *мембранные* фильтры -из нитроцеллюлозы, толщиной 0,1 мм и диаметром 35мм. В зависимости от размера пор обозначают 1,2,3,4,5;

в) *свечи Шамберлана и Беркефельда* — полые цилиндры, закрытые с одного конца, готовят их из каолина с примесью песка и кварца.

*Химические* способы стерилизации применяют ограниченно, но они служат для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов (вакцин и сывороток).

*Биологическая* стерилизация основана на применении антибиотиков, иногда фагов.

*Дезинфекция* — использование химических веществ (фенол, лизол, хлорамин, перекись водорода, сулема, спирт, и т. д.) для уничтожения патогенных бактерий в отработанном патологическом материале.

### Систематизация приборов, процессов обработки и средств для дезинфекции и стерилизации

| Классификация инструментов                                                                                                               | Основные типы инструментов                                                                                                                                                    | Характер обработки и виды воздействий                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Критические</b><br>- проникают в стерильные ткани или сосуды                                                                          | Все инвазивные хирургические инструменты, имеющие контакт с кровоснабжаемыми тканями, скальпели, иглы шприцов, имплантаты, боры, корневые иглы, экскаваторы, зонды, гладилки. | <b>Стерилизация</b> - вирулицидные, спороцидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.<br><b>Длительная экспозиция:</b> гамма-лучи, плазма, длительная газовая и химическая стерилизация, автоклавирование (2 атм. 15 мин), сухой жар (максим. режим, 2 часа)       |
| <b>Полукритические</b> - соприкасаются со слизистыми оболочками (за исключением ряда стоматологических инструментов, перечисленных выше) | Гибкие эндоскопы, катетеры, инструменты аналогичные гибким эндоскопам, зеркала, коронки, наконечники турбин, а также оттиски (слепки) зубов.                                  | <b>Дезинфекция высокого уровня</b> - вирулицидные, спороцидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.<br><b>Кратковременная экспозиция:</b> гамма-лучи, плазма, кратковременная газовая и химическая стерилизация, автоклавирование (1-1,5 атм. 15 мин), сухой жар. |
|                                                                                                                                          | Термометры для измерения температуры слизистой оболочки, ванны для гидротерапии.                                                                                              | <b>Дезинфекция среднего уровня:</b> вирулицидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                          | УЗ-ванночки и УФ-лампы стоматологов, физиотерапевтические инструменты, ложки для слепков.                                                                                     | <b>Средства для химической дезинфекции</b> с указанием на маркировке туберкулоцидной активности.                                                                                                                                                                          |
| <b>Некритические</b> соприкасаются с неповрежденной кожей                                                                                | Термометры для измерения температуры кожных покровов, стетоскопы, манжетки аппаратов для измерения давления, настольные приборы                                               | <b>Дезинфекция уровня:</b> бактерицидные воздействия. <b>Средства для химической дезинфекции</b> без указания на маркировке наличия туберкулоцидной активности.                                                                                                           |

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и Задание на дом. | 15 мин. |

### Лабораторная работа №14

**Тема: Противомикробные химиотерапевтические средства.**

**Сдача модуля по теме: «Влияние факторов окружающей среды на жизнедеятельность микробов.**

**Генетика. Противомикробные препараты».**

#### Учебная цель:

1. Изучить механизм действия антибиотиков на микробную клетку.
2. Изучить методику определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

#### План занятия:

1. Антибиотики, определение, классификация по химической структуре, спектру, типам и механизму действия.

2. Химиотерапевтические препараты, механизм их действия на микробную клетку.
3. Механизмы лекарственной устойчивости бактерий.
4. Побочное действие антибиотиков и синтетических противомикробных лекарственных средств.
5. Методы и единицы измерения антимикробной активности.
6. Противовирусные химиотерапевтические препараты.
7. Демонстрация антибиотиков с различным механизмом и спектром действия.
8. Сдача модуля.

### Самостоятельная работа студентов

1. Учесть результаты дисковой антибиотикограммы.
2. Учесть результаты кассетного микрометода.
3. Оформить протокол исследования.

### ОСНАЩЕНИЕ

1. Чашки Петри с МПА с антибиотикочувствительностью –4 шт.
2. Демонстрация: индикаторные бумажные диски с антибиотиками.
3. Демонстрация: метод серийных разведений.
4. Демонстрация: антибиотики различного спектра действия.
5. Таблицы.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Все антибиотики обладают избирательностью действия. Их относительная безвредность для человека определяется, прежде всего, тем, что они специфически подавляют такие метаболические процессы в микробной клетке или вируса, которые отсутствуют в эукариотной клетке или недоступны для них. В этом отношении уникальным является механизм действия бета-лактамов антибиотиков. Мишенями для них являются транспептидазы, которые завершают синтез пептидогликана клеточной стенки. Поскольку клеточная стенка есть только у прокариот, в эукариотной клетке нет мишени для бета-лактамов антибиотиков. Транспептидазы представляют собой набор белков-ферментов, локализованных в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Отдельные бета-лактамы различаются по степени родства к тому или иному ферменту, которые получили название пеницил-линсвязывающих белков. Поэтому биологический эффект бета-лактамов антибиотиков различен: бактериостатический, бактерицидный, литический.

Кроме бета-лактамов антибиотиков, синтез клеточной стенки поражают такие антибиотики, как бацитрацин, фосфомицин, циклосерин, ванкомицин, ристомин, однако иным путем, чем пенициллин. Все они, кроме циклосерина, вызывают бактерицидный эффект.

Механизм действия таких антибиотиков, как хлорамфеникол, тетрациклины, стрептомицин, аминогликозиды, эритромицин, олеандромицин, спирамицин и другие макролиды, линкозамиды, фузидиевая кислота, связан с угнетением синтеза белка на уровне рибосом 70S. Хотя бактериальные рибосомы 70S имеют такую же в принципе структуру, как рибосомы 80S эукариотных клеток, их белки и белковые факторы, участвующие в работе белоксинтезирующей системы, отличаются от таковых рибосом 80S. Этим объясняется избирательность действия указанных антибиотиков на белковый синтез бактерий.

Разные антибиотики по-разному блокируют синтез белка. Тетрациклины блокируют связывание ат-РНК на А-участке рибосомы 70S. Хлорамфеникол подавляет пептидилтрансферазную реакцию. Стрептомицины препятствуют превращению инициаторного комплекса в функционально активную рибосому. Эритромицин блокирует реакцию транслокации. Пуромицин, присоединяясь к растущему концу синтезируемой полипептидной цепи, вызывает преждевременное отделение ее от рибосомы. Механизм действия фторхинолонов связан с их избирательным подавлением бактериальных ферментов ДНК-гираз, участвующих в репликации ДНК. Фторхинолоны связываются со специфическими участками ДНК, которые создаются воздействием ДНК-гиразы, и подавляют ее активность.

Рифампицины угнетают активность ДНК-зависимых РНК-полимераз, вследствие чего у бактерий подавляются процессы транскрипции.

Активность противоопухолевых антибиотиков связана с тем, что они либо являются ингибитором синтеза ДНК (брунеомицин), либо подавляют активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы, т. е. блокирует транскрипцию (антрациклины, актиномицины, оливомицин).

Учёт результатов определения чувствительности выделенных из исследуемого материала микроорганизмов к антибиотикам проводится следующим способом: на рабочем столе находится чашка Петри, на которой был высеван выделенный из исследуемого материала микроб и были нанесены на равном расстоянии друг от друга диски с антибиотиками (методика этой работы изложена в практическом руководстве).

Студенту необходимо сделать вывод о степени чувствительности выделенной культуры к антибиотикам. Смысл данного исследования сводится к следующему: поверхность питательной среды на чашке смачивают взвесью выделенной чистой культуры в физ. растворе и таким образом достигается равномерное распределение культуры по всей чашке. «Поверх» посева накладываются диски с антибиотиками и чашки инкубируют в

термостате. С дисков, пропитанных каждый отдельным антибиотиком, происходит диффузия антибиотиков в толщу агара. Чем чувствительнее культура к антибиотику, тем меньше его эффективность концентрации и тем больше диаметр зоны задержки роста культуры вокруг определенного диска. При этом результат учитывается по следующей схеме (таблица).

|                                  |                                                       |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Культура<br>высокочувствительна  | диаметр зоны угнетения роста бактерий 30 и более мм.  |
| Культура<br>средне чувствительна | диаметр зоны угнетения роста бактерий не менее 20 мм. |
| Культура<br>слабо чувствительна  | диаметр зоны угнетения роста бактерий не более 10 мм. |

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### Лабораторная работа №15

**Тема: Учение об инфекции. Медицинская иммунология. Физиологические механизмы иммунитета.**

#### Учебная цель:

1. Изучить вопросы условий возникновения, формы и характеристики инфекций.
2. Изучить периоды инфекционных болезней.
3. Изучить патогенность, вирулентность, токсичность, факторы патогенности бактерий.

#### План занятия:

1. Определение понятия «инфекция», «инфекционные процесс», «инфекционная болезнь». Условия возникновения инфекционного процесса.
2. Формы инфекции. Источники инфекции. Механизмы и пути передачи инфекции. Периоды инфекционной болезни.
3. Патогенность, вирулентность, токсичность микробов.
4. Факторы патогенности бактерий, их характеристика. Характеристика бактериальных токсинов.
5. Патогенетические особенности вирусных инфекций.
6. Иммунная система человека. Имуногенез.
7. Понятие о механических, физико-химических и биологических барьерах.
8. Фагоцитоз. Методы определения фагоцитарной активности.

#### Самостоятельная работа студентов:

Просмотр и зарисовка демонстрационного материала. Факторы патогенности микроорганизмов:

- Токсинообразование (гемолизин, гистотоксин дифтерийной палочки).
- Ферменты патогенности (плазмакоагулаза, лецитиназа, ферментация маннита в анаэробных условиях).
- Капсулообразование (окраска по Бурри — Гинсу).
- Дать правильные ответы на тестовые задания.
- Зарисовать таблицы.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Демонстрация - Факторы патогенности микроорганизмов:

- Токсинообразование (гемолизин на кровяном агаре).
- Ферменты патогенности (плазмакоагулаза, лецитиназа, ферментация маннита в анаэробных условиях).
- Капсулообразование (микропрепарат, окраска по Бурри — Гинсу).
- 2. Демонстрация : незавершенный фагоцитоз гонококка.
- 3. Демонстрация: определение активности лизоцима слюны.
- 4. Демонстрация: определения бактериоцидной активности кожи.
- 5. Таблицы

### Методические рекомендации

Термин «**инфекция**» (infectio- заражать) или синоним **инфекционный процесс** обозначает совокупность физиологических восстановительно-приспособительных реакций, возникающих в восприимчивом макроорганизме при определенных условиях окружающей внешней среды в результате его взаимодействия с проникшими и размножающимися в нем патогенными или условно-патогенными бактериями, грибами и вирусами и направленными на поддержание постоянства внутренней среды макроорганизма (гомеостаза). Сходный процесс, но вызванный простейшими, гельминтами и насекомыми — носит название **инвазия**.

Любое инфекционное заболевание характеризуется последовательной сменой разных периодов. Различают следующие периоды: инкубационный, продромальный, клинический (разгар болезни), реконвалесценции (выздоровления):

- инкубационный период-время, которое проходит с момента заражения до начала клинических проявлений болезни;
- продромальный период-время появления первых клинических симптомов общего характера, неспецифических для данного заболевания;
- период острых проявлений заболевания в разгар болезни;
- период реконвалесценции-период угасания и исчезновения типичных симптомов и клинического выздоровления.

**Формы инфекции:** протекает в разнообразной форме в зависимости от происхождения, локализации возбудителя и других факторов. Экзогенная инфекция возникает в результате поступления микроорганизмов из окружающей среды с пищей, водой, воздухом, выделениями человека, реконвалесцента и носителя. При эндогенной инфекции возбудитель находится в организме в составе облигатной или транзитной микрофлоры. Довольно часто такая форма вызывается условно-патогенными микроорганизмами при ослаблении защитных свойств макроорганизма в случае переохлаждения, ранее перенесенных заболеваний. В зависимости от локализации возбудителя различают очаговую инфекцию, при которой микроорганизмы локализуются в местном очаге и не распространяются по организму. В случае проникновения возбудителя из первичного очага в кровь и распространения его гематогенным путем по организму развивается бактериемия или вирусемия.

**Патогенность, вирулентность:** возникновение инфекционного заболевания зависит от многих факторов: патогенности и вирулентности микроорганизма, его дозы, способа проникновения, состояния макроорганизма.

Фенотипическим признаком патогенного микроорганизма является его вирулентность, свойство штамма проявляется в определенных условиях. Вирулентность можно повышать, понижать, измерять, т.е. является мерой патогенности. Количественные показатели вирулентности могут быть выражены в DLM (минимальная летальная доза), DL50 (доза вызывающая гибель 50 % экспериментальных животных). При этом учитывает вид животных, пол, массу тела.

Патогенность видовой признак, передающийся по наследству закрепленный в геноме микроорганизма. Потенциальная возможность микроорганизма проникать и инфицировать, размножаться, инвазировать.

**Факторы патогенности:** факторы вирулентности определяют способность микроорганизмов прикрепляться (адсорбироваться) на клетках (адгезия), размножаться на их поверхности (колонизация), проникать в клетки (пенетрация), противостоять факторам неспецифической резистентности и иммунной защиты организма (агрессия).

Начальной стадией инфекционного процесса является проникновение микроорганизмов во внутреннюю среду организма путем преодоления ими механических барьеров (кожа, слизистые оболочки бактериостатические вещества кожи, пищеварительного тракта — ферменты, соляная кислота желудка и т.д.). Адгезия и колонизация, связанные с прикреплением микроорганизмов на чувствительные клетки с последующим размножением возбудителя на поверхности этих клеток. У каждого вида или штамма микроорганизма имеются свои адгезины, обладающими уникальными структурами, что обеспечивает высокую специфичность взаимодействия бактериальной клетки с клеткой хозяина.

Патогенные бактерии могут пенетрировать (проникать) внутрь клеток макроорганизма.

Агрессия осуществляется за счет структур бактериальной клетки: капсулы, клеточной стенки, липополисахаридов грамотрицательных бактерий, которые подавляют миграцию лейкоцитов, препятствуют фагоцитозу. Для подавления иммунитета патогенные микроорганизмы продуцируют ферменты: протеазы, разрушают иммуноглобулины; коагулазу, свертывающую плазму крови; фибринолизин, растворяющий сгустки фибрина; лецитиназу, растворяющую лецитин в оболочках клеток человека.

Токсические вещества — синтезируемые бактериальной клеткой, делят на две группы-экзотоксины и эндотоксины. Бактериальные токсины могут быть секретируемыми (экзотоксин) и несекретируемыми (эндотоксин). Экзотоксины делятся на четыре типа.

Цитотоксины блокируют синтез белка на субклеточном уровне. Мембранотоксины повышают проницаемость поверхностной мембраны эритроцитов (гемолизин) и лейкоцитов (леикоцидины) разрушая их.

Функциональные блокаторы — токсины, блокирующие функции определенных тканевых систем.

Энтеротоксины (холероген и др.) активируют адени-латциклазу, что приводит к повышению проницаемости стенки тонкой кишки и повышению выхода жидкости в ее просвет, т.е. диарею. Эксофолиатины и эритрогенины образуются некоторыми штаммами золотистого стафилококка, скарлатинозного стрептококка. Эндотоксины отличаются от экзотоксинов меньшей специфичностью действия, меньшей токсичностью и большей термостабильностью.

#### Характеристика бактериальных экзо-и эндотоксинов

| Свойства                         | Экзотоксины                                                              | Эндотоксины                                                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Химическая природа               | Белки (9-19 аминокислот)                                                 | ЛПС с белком                                                                                       |
| Происхождение                    | Выделяются в процессе жизнедеятельности. Чаще грамположительные бактерии | Связаны со структурами бактерий; выделяются при разрушении клетки. Чаще грамотрицательные бактерии |
| Отношение к температуре          | Термолабильны                                                            | Термостабильны                                                                                     |
| Степень ядовитости               | Очень токсичны                                                           | Менее ядовиты                                                                                      |
| Скорость действия                | После инкубации 18-72 часа                                               | Довольно быстро                                                                                    |
| Специфичность действия           | Выражена                                                                 | Лишена тропизма                                                                                    |
| Отношение к химическим веществам | Чувствительны к спирту, кислотам, щелочам, пищеварительным ферментам     | Мало чувствительны к химическим веществам, не переходят в анатоксины                               |
| Линейные свойства                | Активные антигены                                                        | Слабые антигены                                                                                    |

Возбудителями инфекционных болезней являются вирусы, прионы, бактерии, грибы, простейшие, гельминты. Все они являются паразитами. Паразитизм-форма отношений между двумя организмами разных видов, из которых один, называется паразитом, использует другого, именуемого хозяином, как источник питания. К паразитам относятся все возбудители инфекционных и инвазионных болезней человека.

Под видовым иммунитетом понимают невосприимчивость, обусловленную врожденными биологическими особенностями, присущими данному виду животных или человеку. По сути дела это видовой признак, передающийся по наследству, подобно любому другому признаку вида. Примером подобной формы невосприимчивости может служить иммунитет человека к чуме рогатого скота, животных — к брюшному тифу, дизентерии и т. д. Видовой иммунитет может проявляться у животных одного и того же вида ко многим инфекционным агентам и у разных видов к одному и тому же возбудителю, например, к полиомиелиту невосприимчивы все млекопитающие, кроме обезьян, человека и некоторых видов грызунов. В основе видовой невосприимчивости лежат различные механизмы естественной неспецифической резистентности. В связи с этим многие ученые предполагают, что данную форму невосприимчивости правильней называть не иммунитетом, естественной неспецифической резистентностью. Характерными особенностями ее являются наследственная передача и отсутствие специфичности.

К неспецифическим факторам защиты организма человека относятся следующие:

- механические (кожа и слизистые оболочки);
- физико-химические (ферменты, реакция среды и др.);
- иммунобиологическую защиту, осуществляемую нормальными неиммунными клетками (фагоциты, естественные киллеры) и гуморальными компонентами (комплемент, интерферон, некоторые белки крови).

**Механические факторы.** Кожа и слизистые оболочки механически препятствуют проникновению микроорганизмов и других антигенов в организм. Последние все же могут попадать в организм при заболеваниях и повреждениях кожи (травмы, ожоги, воспалительные заболевания, укусы насекомых, животных и т.д.), а в некоторых случаях и через нормальную кожу и слизистую оболочку, проникая между клетками или через клетки эпителия (например, вирусы). Механическую защиту осуществляет также реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей, так как движение ресничек постоянно удаляет слизь вместе с попавшими в дыхательные пути инородными частицами и микроорганизмами.

**Физико-химические факторы.** Антимикробными свойствами обладают уксусная, молочная, муравьиная и др. кислоты, выделяемые потовыми и сальными железами кожи; соляная кислота желудочного сока, а также протеолитические и др. ферменты, имеющиеся в жидкостях и тканях организма. Особая роль в антимикробном действии принадлежит ферменту лизоциму. Этот проте-олитический фермент, открытый в 1909 г. П. Л. Лашенко и выделенный в 1922 г. А Флемингом, получил название «мурамидаза», так как разрушает клеточную

стенку бактерий и других клеток, вызывая их гибель и способствуя фагоцитозу. Лизоцим вырабатывают макрофаги и ней-трофилы. Содержится он в больших количествах во всех секретах, жидкостях и тканях организма (кровь, слюна, слёзы, молоко, кишечная слизь, мозг и др.) Снижение уровня фермента приводит к возникновению инфекционных и других воспалительных заболеваний. В настоящее время осуществлен химический синтез лизоцима, и он используется как медицинский препарат для лечения воспалительных заболеваний.

**Иммунобиологические факторы.** В процессе эволюции сформировался комплекс гуморальных и клеточных факторов неспецифической резистентности, направленных на устранение чужеродных веществ и частиц, попавших в организм. Гуморальные факторы неспецифической резистентности состоят из разнообразных белков, содержащихся в крови и жидкостях организма. К ним относятся белки системы комплемента, интерферон, трансферрин, (3-лизины, белок пропердин, фибронектин и др. Белки системы комплемента обычно неактивны, но приобретают активность в результате последовательной активации и взаимодействия компонентов комплемента. Интерферон оказывает иммуномодулирующий, пролифе-ративный эффект и вызывает в клетке, инфицированной вирусом, состояние противовирусной резистентности. (3-лизины вырабатываются тромбоцитами и обладают бактерицидным действием. Трансферрин конкурирует с микроорганизмами за необходимые для них метаболиты, без которых возбудители не могут размножаться. Белок пропердин участвует в активации комплемента и других реакциях. Сывороточные ингибиторы крови, например (3-ингибиторы ((3-липопротеины), инактивируют многие вирусы в результате неспецифической блокады их поверхности.

Большое значение в неспецифической резистентности имеют клетки, способные к фагоцитозу, а также клетки с цитотоксической активностью, называемые естественными киллерами, или НК-клетками. НК-клетки представляют собой популяцию лимфоцитоподобных клеток (большие гранулосодержащие лимфоциты), обладающие цитотоксическим действием против чужеродных клеток (раковых, клеток простейших и клеток, пораженных вирусом). Видимо, НК-клетки осуществляют в организме противоопухолевый надзор.

**Фагоцитоз**, процесс активного захватывания и поглощения живых и неживых частиц одноклеточными организмами или особыми клетками (фагоцитами) многоклеточных животных организмов. Явление фагоцитоза было открыто И. И. Мечниковым, который проследил его эволюцию и выяснил роль этого процесса в защитных реакциях организма высших животных и человека, главным образом при воспалении и иммунитете. Большую роль фагоцитоз играет при заживлении ран. Способность захватывать и переваривать частицы лежит в основе питания примитивных организмов. В процессе эволюции эта способность постепенно перешла к отдельным специализированным клеткам, вначале пищеварительным, а затем – к особым клеткам соединительной ткани. У человека и млекопитающих животных активными фагоцитами являются нейтрофилы (микрофаги, или специальные лейкоциты) крови и клетки ретикуло-эндотелиальной системы, способные превращаться в активных макрофагов. Нейтрофилы фагоцитируют мелкие частицы (бактерии и т.п.), макрофаги способны поглощать более крупные частицы (погибшие клетки, их ядра или фрагменты и т.п.). Макрофаги способны также накапливать отрицательно заряженные частицы красителей и коллоидных веществ. Поглощение мелких коллоидных частиц называют ультрафагоцитозом, или коллоидопексией.

Фагоцитоз требует затраты энергии и связан прежде всего с активностью клеточной мембраны и внутриклеточных органоидов – лизосом, содержащих большое количество гидролитических ферментов. В ходе фагоцитоза различают несколько стадий. Вначале фагоцитируемая частица прикрепляется к клеточной мембране, которая затем обволакивает её и образует внутриклеточное тельце – фagosому. Из окружающих лизосом в фagosому попадают гидролитические ферменты, переваривающие фагоцитируемую частицу. В зависимости от физико-химических свойств последней переваривание может быть полным или неполным. В последнем случае образуется остаточное тельце, которое может оставаться в клетке длительное время.

## ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

**Тема: Физиологические механизмы иммунитета. Реакции иммунитета (агглютинации и преципитации).**

**Учебная цель:**

1. Изучит физиологические механизмы иммунитета.
2. Изучить серологические методы лабораторной диагностики.

**План занятия**

1. Антигены, их природа. Гаптены. Антигены бактерий.
2. Антитела, классификация. Структура иммуноглобулинов, основные классы.
3. Гуморальный и клеточный иммунный ответ
4. Серологические реакции, их сущность и механизм, практическое применение. Серодиагностика. Сероидентификация.
5. Реакция агглютинации, методы постановки, фазы реакций, практическое применение.
6. Реакция преципитации, способы постановки, практическое применение.
7. Диагностикумы, классификация, применение.
8. Диагностические сыворотки, получение и виды диагностических сывороток – агглютинирующие (адсорбированные и неадсорбированные, моно- и поливалентные), преципитирующие.
9. Демонстрация развернутой реакции агглютинации, реакции гемолиза.
10. Постановка реакции кольцепреципитации.
11. Демонстрация диагностикумов и диагностических сывороток.

**Самостоятельная работа студентов:**

1. Постановка и учет ориентировочной реакции агглютинации на предметном стекле с целью идентификации выделенной чистой культуры грамотрицательных палочек.
2. Постановка и учет развернутой реакции агглютинации с целью серодиагностики брюшного тифа.
3. Постановка и учет реакции термокольцепреципитации с целью сероиндикации сибирской язвы.

**ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для микробиологического исследования:  
Штатив- 8 шт.  
Пинцет – 8 шт.  
Бактериологическая петля-8 шт.  
Лоток с подставкой - по 8шт.  
Предметные стекла.  
Спиртовка -8шт.  
Флаконы с физ. р-ром.-8шт.
2. Постановка и учет ориентировочной реакции агглютинации на предметном стекле с целью идентификации выделенной чистой культуры грамотрицательных палочек:  
Пробирка со скошенным агаром с ростом E.coli – 4 шт.  
Предметное стекло -4шт.  
Пробирка с поливалентной коли-сывороткой -4 шт.
3. Постановка и учет развернутой реакции агглютинации с целью серодиагностики брюшного тифа.  
Исследуемая сыворотка-8шт.  
Диагностикум «О» -2шт.  
Диагностикум «Н» - 2шт.  
Диагностикум «ОН (А)» -2 шт.  
Диагностикум «ОН(В)»- 2 шт.  
Пробирки чистые 8шт.- 8 наборов.  
Пробирки с физиологическим раствором - 8шт.  
Стерильные пипетки.
4. Постановка и учет реакции термокольцепреципитации Асколи с целью сероиндикации сибирской язвы.  
Пробирка с иммунной сывороткой- 4 шт.

- Пробирка с нормальной сывороткой – 4шт.  
Пробирка с физиологическим раствором – 4шт.  
Преципитиноген – 4шт.  
Пастеровские пипетки – 4шт.
5. Демонстрация: реакция Видаля.
  6. Демонстрация реакции преципитации в геле по Оухтерлони.
  7. Демонстрация бакпрепаратов: сыворотки, диагностикумы.
  8. Демонстрация: РПГА.
  9. Таблицы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Под **иммунитетом** (от лат. *immunitas* — освобождение, избавление от чего-либо) в биологии и медицине понимают комплекс реакций организма, направленных на сохранение его структурной и функциональной целостности при воздействии на организм генетически чужеродных веществ, как поступающих извне, так и образующихся внутри организма.

Различают несколько основных видов иммунитета:

-*Наследственный иммунитет* (врождённый, видовой) обусловлен выработкой в процессе филогенеза генетически закреплённой невосприимчивости вида к данному антигену или микроорганизму.

-*Приобретённый иммунитет* специфичен и не передаётся по наследству. Он формируется естественно и создается искусственно. Естественный приобретённый иммунитет появляется после перенесённого инфекционного заболевания (оспа, корь и др.). Искусственный приобретённый иммунитет возникает при вакцинации.

Иммунитет бывает *активный* и *пассивный*. *Активный иммунитет* вырабатывается организмом в результате воздействия антигена на иммунную систему (например, при вакцинации). *Пассивный иммунитет* обусловлен антителами, передаваемыми от иммунной матери ребёнку при рождении или путем введения иммунных сывороток, а также при пересадке иммунных клеток.

Активный иммунитет может быть *гуморальным* (обусловлен антителами), *клеточным* (обусловлен иммунокомпетентными клетками) и *клеточно-гуморальным* (обусловлен и антителами, и иммунокомпетентными клетками). Например, антитоксический иммунитет к ботулизму и столбняку является гуморальным, так как он обусловлен антителами, циркулирующими в крови; иммунитет к лепре или туберкулезу — клеточный, а к оспе — клеточно-гуморальный.

Различают также иммунитет *стерильный*, сохраняющийся в отсутствие микроорганизма, и *нестерильный*, который существует только при наличии возбудителя в организме. Классическим примером нестерильного иммунитета является иммунитет при туберкулезе.

Отдельно выделяют так называемый *местный иммунитет*, который защищает отдельные участки организма, например, слизистые оболочки от возбудителей инфекционных болезней. Он формируется при участии секреторного иммуноглобулина А и характеризуется более активным фагоцитозом.

**Антигены** — это любые генетически чужеродные для данного организма вещества (обычно биополимеры), которые, попав во внутреннюю среду организма или образуясь в организме, вызывают ответную специфическую иммунологическую реакцию: синтез антител, появление сенсибилизированных лимфоцитов или возникновение толерантности к этому веществу, гиперчувствительности замедленного или немедленного типов, иммунологической памяти.

Антигены обладают специфичностью, которая связана с определённой химической группой в составе молекулы, называемой детерминантой, или эпитопом. Детерминанты антигена — это те его части, которые распознаются антителами и иммунокомпетентными клетками.

Различают *полноценные* и *неполноценные (гаптены) антигены*. Антигены, вызывающие полноценный иммунный ответ, имеющие 2 и более детерминанты, называются *полноценными*. Это органические вещества микробного, растительного и животного происхождения. *Гаптенами* могут быть химические вещества с малой молекулярной массой или более сложные химические вещества, не обладающие свойствами полноценного антигена: некоторые бактериальные полисахариды, полипептид туберкулёзной палочки (РРД), ДНК, РНК, липиды, пептиды. *Гаптены* из-за небольшой молекулярной массы не фиксируются иммунокомпетентными клетками макроорганизма и не могут вызвать ответную иммунологическую реакцию. *Полугаптены* — неорганические радикалы (йод, бром, нитрогруппа, азот и др.), присоединившиеся к белковой молекуле, могут менять иммунологическую специфичность белка.

**Антителообразование.** В ответ на введение антигена иммунная система вырабатывает антитела — белки, способные специфически соединяться с антигеном, вызвавшим их образование и, таким образом, участвовать в иммунологических реакциях. Относятся антитела к у-глобулинам, т. е. наименее подвижной в электрическом поле фракции белков сыворотки крови. В организме у-глобулины вырабатываются особыми клетками — плазмочитами. В соответствии с Международной классификацией у-глобулины, несущие функции антител, получили название иммуноглобулинов и обозначаются символом Ig. Следовательно, антитела — это иммуноглобулины, вырабатываемые в ответ на введение антигена и способные специфически взаимодействовать с этим же антигеном.

**Функции антител.** Первичная функция антител состоит во взаимодействии их активных центров с комплементарными им детерминантами антигенов. Вторичная функция антител состоит из их способности:

- связывать антиген с целью его нейтрализации и элиминации из организма;
- участвовать в распознавании «чужого» антигена;
- обеспечивать кооперацию иммунокомпетентных клеток (макрофагов, Т- и В- лимфоцитов);
- участвовать в различных формах иммунного ответа (фагоцитоз, киллерная функция, иммунологическая толерантность, иммунологическая память, гиперчувствительность немедленного типа, гиперчувствительность замедленного типа).

Белки иммуноглобулинов по химическому составу относятся к гликопротеидам, так как состоят из протеина и сахаров; построены из 18 аминокислот. Различают 5 классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Иммуноглобулины М, G, А имеют подклассы. Например, IgG имеет четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

**Иммунологической памятью** называют способность организма при повторной встрече с одним и тем же антигеном реагировать более активным и более быстрым формированием иммунитета, т.е. реагировать по типу вторичного иммунного ответа.

**Иммунологическая толерантность** явление противоположное иммунологической памяти. В этом случае в ответ на повторное введение антигена организм вместо энергичной выработки иммунитета проявляет ареактив-ность, не отвечает иммунной реакцией, т. е. толерантен антигену.

#### **I. Реакция агглютинации на предметном стекле**

Нанести на предметное стекло на достаточном расстоянии друг от друга три капли: физиологического раствора, брюшнотифозной агглютинирующей сыворотки (№ 1) и дизентерийной агглютинирующей сыворотки (№ 2). Исследуемую культуру внести в каплю физиологического раствора и тщательно растереть в ней до появления выраженного помутнения. Бактериальной петлей подготовленную взвесь перенести в сыворотку № 1 и тщательно перемешать. Далее бактериологическую петлю необходимо простерилизовать прокаливанием. Затем взять бактериальной петлей материал из взвеси культуры в капле физиологического раствора и внести ее в каплю сыворотки № 2. Стекло слегка и осторожно покачивать для тщательного перемешивания. Учет результатов реакции производят спустя 1-2 минуты: в капле физиологического раствора сохраняется равномерное помутнение, тогда как в капле одной из сывороток отмечается агглютинация. Признаками агглютинации являются: выпадение зерен агглютината и просветление жидкости. В случае обнаружения в контрольной капле с физиологическим раствором спонтанной агглютинации результаты реакции не подлежат дальнейшему учету, а сама реакция требует повторной постановки.

#### **II. Развернутая реакция агглютинации**

Развернутая реакция агглютинации поставлена с целью определения титра антител в сыворотке крови больного.

Исследуемая сыворотка разводится физиологическим раствором в 50 раз, и полученное таким образом разведение (1:50) считается исходным. Далее исходное разведение сыворотки последовательно двукратно разводится физиологическим раствором. Для этого (см. схему постановки):

- а) во все агглютинационные пробирки, кроме № 6, вносятся по 1,0 мл физиологического раствора;
- б) в пробирку № 1 и № 6 вносится по 1,0 мл сыворотки в исходном разведении 1:50, и, таким образом, сыворотка в пробирке № 1 разводится еще вдвое, то есть в 100 раз;
- в) 1,0 мл сыворотки из пробирки № 1 переносится в пробирку № 2 к имеющимся в ней 1,0 мл физиологического раствора, вследствие чего сыворотка разводится еще вдвое, то есть в 200 раз, и так далее, вплоть до пробирки № 5, где разведение достигает 1:1600;
- г) очевидно, что в пробирках № 1 -№ 4 содержится по 1,0 мл сыворотки, тогда как в пробирке № 5 содержится 2,0 мл ее — избыточные 1,0 мл удаляются, и, таким образом, объемы в опытных пробирках № 1 — № 5 уравниваются. В пробирке № 6 осуществляется контроль сыворотки. Далее в каждую пробирку, за исключением пробирки № 6, вносят по 2 капли ДИАГНОСТИКУМА — обработанной формалином взвеси в физиологическом растворе клеток культуры *Salmonella typhi*, в каждом миллилитре которой содержится 2 миллиарда бактериальных тел. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  на 2 часа. После выдержки в термостате штатив с реакцией выдерживают при комнатной температуре или «на холоду» ( $+3^{\circ}$   $+5^{\circ}\text{C}$ ) в течение 18 часов.

| Компоненты реакции                  | Опыт      |           |           |           |            | сыворотки | диагностикум<br>а |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-------------------|
|                                     | 1         | 2         | 3         | 4         | 5          |           |                   |
| 1. Физ. Раствор                     | 1,0       | 1,0       | 1,0       | 1,0       | 1,0        | 1,0       | 1,0               |
| 2. Исследуемая сыворотка (1:50); мл | 1,0 1:100 | 1,0 1:200 | 1,0 1:400 | 1,0 1:800 | 1,0 1:1600 | 1,0 1:100 | 1,0               |
| 3. Диагностикум, капли              | 2         | 2         | 2         | 2         | 2          | -         | 2                 |

Учет результатов производят через сутки в следующей последовательности: в первую очередь оценивают состояние контрольных пробирок (№6 и №7), во вторую очередь — опытных. В пробирке №6 (контроль сыворотки) должна быть абсолютно прозрачная, лишенная какого-либо осадка жидкость. В пробирке №7 (контроль диагностикума) — равномерное помутнение. Результаты опытных пробирок следует оценивать, начиная с пробирки с наибольшим разведением сыворотки (№5). Результат реакции учитывается по выпадению на дно пробирки хлопьев агглютината и одновременному просветлению содержимого пробирки; при легком постукивании по стенке пробирки или осторожном встряхивании агглютинат легко отделяется от дна, всплывает и, не изменяя своей структуры, возвращается в исходное положение.

### III. Реакция коаггуляционной

Реакция коаггуляции используется чаще всего для определения наличия в материале растворимых антигенов. В контрольную коаггуляционную пробирку, приблизительно до половины ее объема вносится нормальная сыворотка. В опытную пробирку вносится то же количество коаггулирующей сыворотки. Далее в каждую пробирку вносится небольшое количество исследуемого материала — например, экстракта из шкуры животного (овцы), погибшей предположительно от сибирской язвы. Исследуемый материал следует вносить путем осторожного насаивания на внутреннюю стенку коаггуляционной пробирки, удерживаемой в руке на высоте 30-35 см от поверхности рабочего стола под углом 45° к горизонтали.

В опытной пробирке на границе сыворотки и исследуемого материала наблюдается образование коагулята: белесоватого «диска», необратимо разрушающегося при встряхивании пробирки. В контрольной пробирке образования коагулята не наблюдается.

### IV. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РПГА)

РПГА основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами (эритроцитарный диагностикум), взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных вызывает выпадение эритроцитов в осадок на дно пробирки (лунки) в виде «фаскрасованного зонтика».

Исследуемую сыворотку больного разводят в 10 раз и прогревают при 65°C 20 минут на водяной бане для удаления неспецифических гемагглютининов, затем готовят ряд ее разведений от 1:100 до 1:3200 и разливают в лунки по 0,5 мл. В каждую лунку добавляют по 0,5 мл диагностикума. В каждый ряд лунок добавляется соответствующий эритроцитарный диагностикум: к шигеллам Зонне, Флекснера, Ньюкаста и поливалентный сальмонеллезный.

Одновременно ставят контроли диагностикумов и контроль исследуемой сыворотки. Результат реакции учитывают после инкубации в термостате в течение 2 часов при 37°C или при комнатной температуре в течение 1824 часов. Реакция считается положительной при условии расположения эритроцитов в виде «зонтика» по всей поверхности дна лунки и оценивается как «+».

#### Схема постановки

| Разведение исследуемой сыворотки | ДИАГНОСТИКУМЫ |           |           |                    | КОНТРОЛЬ |      |      |      |    |
|----------------------------------|---------------|-----------|-----------|--------------------|----------|------|------|------|----|
|                                  | Зонне         | Флекс-нер | Нью-кастл | Саль-мон. поливал. | Кд 1     | Кд 2 | Кд 3 | Кд 4 | Кс |
| 1:100                            |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| 1:200                            |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| 1:400                            |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| 1:800                            |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| 1:1600                           |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| 1:3200                           |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| Инкубация при t 37° C; 24 часа.  |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |
| Учет результатов                 |               |           |           |                    |          |      |      |      |    |

#### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## Лабораторная работа №17

**Тема: Реакции иммунитета с участием комплемента.**

**Реакции иммунитета с мечеными компонентами.**

### Учебная цель:

1. Изучить комплементзависимые серологические реакции,
2. Изучить реакции иммунитета с мечеными компонентами.

### План занятия:

1. Реакции иммунного лизиса, компоненты.
2. Реакция гемолиза.
3. Реакция связывания комплемента (РСК). Постановка и учет реакции связывания комплемента.
4. Реакция иммунофлюоресценции, прямая и непрямая.
5. Иммуноферментный анализ, компоненты, применение.
6. Радиоиммунный анализ, компоненты, применение.

### Самостоятельная работа студентов:

1. Постановка и учет реакции связывания комплемента с целью серодиагностики сифилиса.

### ОСНАЩЕНИЕ

1. Постановка реакции связывания комплемента с целью серодиагностики сифилиса:  
Исследуемая сыворотка - 8 шт.  
Кардиолипидный антиген - 8 шт.  
Комплемент 1,0 - 4 шт.  
Пробирка с физ. р-ром 4,0 - 4 шт.  
Пробирка с взвесью эритроцитов барана - 8 шт.  
Пробирка с гемолитической сывороткой - 8 шт.  
Чистые пробирки 2 шт. - 8 наборов.  
Пипетки стерильные.  
Термостат.
2. Демонстрация: РСК, ИФА.
3. Демонстрация РИФ.
4. Демонстрация бакпрепаратов: антиген, комплемент, гемолизин, иммунофлюоресцентные сыворотки;
5. Таблицы.

### ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

#### Принципиальная схема постановки реакции связывания комплемента

| Компоненты реакции                                                       | № пробирки |            |            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|
|                                                                          | 1 (опыт)   | 2 (контр.) | 3 (контр.) |
| 1. Исследуемая сыворотка (1:5)                                           | 0,5        | 0,5        | -          |
| 2. Антиген в рабочей дозе                                                | 0,5        | -          | 0,5        |
| 3. Комплемент в рабочей дозе                                             | 0,5        | 0,5        | 0,5        |
| 4. Физиологический раствор                                               | -          | 0,5        | 0,5        |
| Инкубация при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ — 40 минут.                        |            |            |            |
| 5. Гемолитическая система (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка) | 1,0        | 1,0        | 1,0        |

Инкубация при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  — 40 минут.

Учет результатов \_\_\_\_\_ Гемолиз + Гемолиз +

### Вывод:

При наличии антител в исследуемой сыворотке (положительная реакция) в опытной пробирке гемолиз отсутствует. При отрицательной реакции (нет антител) во всех трех пробирках наблюдается гемолиз.

Реакция связывания комплемента проходит в две фазы: 1-ая фаза — взаимодействие исследуемой сыворотки с антигеном и комплементом. 2-ая фаза — индикаторная — определение наличия в смеси свободного комплемента путем добавления гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к эритроцитам барана. Если в первой фазе реакции происходит образование комплекса антиген-антитело, комплемент связывается этим комплексом и во второй фазе гемолиз эритроцитов отсутствует (реакция положительная). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, комплемент в первой фазе реакции остается свободным и во второй фазе реакции присоединяется к комплексу эритроцит-гемолитическая сыворотка, вызывая гемолиз (реакция отрицательная).

**Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)** — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала.

К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

**Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)** — серологическая реакция, основанная на взаимодействии с антигеном флуоресцирующих антител. Различают прямую и непрямую РИФ. При прямой РИФ специфические поли- или моноклональные антитела, меченные изотианатфлуоресцеином, взаимодействуют с антигеном.

Эта реакция используется в иммунологии (для идентификации ИКК методом проточной цитофлуорометрии); в вирусологии (для идентификации вирусов); в микробиологии (для идентификации бактерий, грибов, простейших).

При непрямой РИФ антивидовые антитела, меченные изотианатфлуоресцеином (например, античеловеческие, антикроличьи, антимышинные), взаимодействуют с комплексом специфических поли- или моноклональных антител и антигенов. Данная реакция используется для выявления в крови специфических противомикробных антител, тканевых антигенов, иммунофенотипирования ИКК, выявления фиксированных иммунных комплексов.

### ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### Лабораторная работа №18

**Тема: Вакцины. Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины.**

**Сдача модуля: «Учение об инфекции. Медицинская иммунология. Реакции иммунитета.**  
**Иммунобиологические препараты».**

**Учебная цель:** изучить иммунобиологические препараты и их основные группы: вакцины, иммуноглобулины, лечебно-профилактические сыворотки.

**План занятия:**

1. Вакцины, способы получения.
2. Классификация вакцин, адъюванты, применение вакцин.
3. Иммуноглобулины, получение, применение.
4. Лечебно-профилактические сыворотки, получение, классификация. Практическое применение.
5. Демонстрация вакцин, лечебно-профилактических сывороток, иммуноглобулинов.
6. Сдача модуля.

**Самостоятельная работа**

1. Ознакомление с демонстрационными препаратами (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, диагностикумы).
2. Изучение аннотации по применению вакцин, иммуноглобулинов, лечебно-профилактических сывороток.
3. Записать в тетрадь этапы приготовления вакцины.

**ОСНАЩЕНИЕ**

1. Демонстрация вакцин, лечебно-профилактических сывороток, иммуноглобулинов.
2. Таблицы.

**ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ**

Вакцины-препараты, получаемые из микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности; применяются для активной иммунизации людей и животных с профилактической и лечебной целями. Вакцины состоят из действующего начала — специфического антигена; консерванта для сохранения стерильности (в неживых В.); стабилизатора, или протектора, для повышения сроков сохранности антигена; неспецифического активатора (адъюванта), или полимерного носителя, для повышения иммуногенности антигена (в химических, молекулярных вакцинах). Специфические антигены, содержащиеся в В., в ответ на введение в организм вызывают развитие иммунологических реакций, обеспечивающих устойчивость организма к патогенным микроорганизмам. В качестве антигенов при конструировании В. используют: живые ослабленные (аттенуированные) микроорганизмы; неживые (инактивированные, убитые) цельные микробные клетки или вирусные частицы; извлеченные из микроорганизмов сложные антигенные структуры (протективные антигены); продукты жизнедеятельности микроорганизмов — вторичные метаболиты (например, токсины, молекулярные протективные антигены); антигены, полученные путем химического синтеза или биосинтеза с применением методов генетической инженерии.

В соответствии с природой специфического антигена В. делят на живые, неживые и комбинированные (как живые, так и неживые микроорганизмы и их отдельные антигены). Живые В. получают из дивергентных (естественных) штаммов микроорганизмов, обладающих ослабленной вирулентностью для человека, но содержащих полноценный набор антигенов (например, вирус коревой оспы), и из искусственных (аттенуированных) штаммов микроорганизмов. К живым В. можно отнести также векторные В., полученные генно-инженерным способом и представляющие собой вакцинный штамм, несущий ген чужеродного антигена (например, вирус оспенной вакцины со встроенным антигеном вируса гепатита В).

Неживые В. подразделяют на молекулярные (химические) и корпускулярные. Молекулярные В. конструируют на основе специфических протективных антигенов, находящихся в молекулярном виде и полученных путем биосинтеза или химического синтеза. К этим В. можно отнести также анатоксины, которые представляют собой обезвреженные формалином молекулы токсинов, образуемых микробной клеткой (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.). Корпускулярные В. получают из цельных микроорганизмов, инактивированных физическими (тепло, ультрафиолетовое и другие излучения) или химическими (фенол, спирт) методами (корпускулярные, вирусные и бактериальные вакцины), или из субклеточных над-молекулярных антигенных структур, извлеченных из микроорганизмов (субвирионные вакцины, сплит-вакцины, вакцины из сложных антигенных комплексов).

Молекулярные антигены, или сложные протективные антигены бактерий и вирусов,

используют для получения синтетических и полусинтетических вакцин, представляющих собой комплекс из специфического антигена, полимерного носителя и адъюванта. Из отдельных В. (моновакцин), предназначенных для иммунизации против одной инфекции, готовят сложные препараты, состоящие из нескольких моновакцин. Такие ассоциированные вакцины, или поливакцины, поливалентные вакцины обеспечивают иммунитет одновременно против нескольких инфекций. Примером может служить ассоциированная АКДС-вакцина, в состав которой входят адсорбированные дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшный корпускулярный антиген. Существует также семейство полианатоксинов: ботулинический пентаанатоксин, противогангренозный тетраанатоксин, дифтерийно-столбнячный дианатоксин. Для профилактики полиомиелита применяют единый поливалентный препарат, состоящий из аттенуированных штаммов I, II, III серотипов (сероваров) вируса полиомиелита.

Насчитывается около 30 вакцинных препаратов, применяемых с целью профилактики инфекционных болезней; примерно половина из них живые, остальные инаktivированные. Среди живых В. выделяют бактериальные — сибиреязвенную, чумную, туляремию, туберкулезную, против Ку-лихорадки; вирусные — оспенную, коревую, гриппозную, полиомиелитную, паротитную, против желтой лихорадки, краснухи. Из неживых В. применяют коклюшную, дизентерийную, брюшнотифозную, холерную, герпетическую, сыпнотифозную, против клещевого энцефалита, геморрагических лихорадок и другие, а также анатоксины — дифтерийный, столбнячный, ботулинический, газовой гангрены.

Основным свойством В. является создание активного поствакцинального иммунитета, который по своему характеру и конечному эффекту соответствует постинфекционному иммунитету, иногда отличаясь от него лишь количественно. Вакцинальный процесс при введении живых В. сводится к размножению и генерализации аттенуированного штамма в организме привитого и вовлечению в процесс иммунной системы. Хотя по характеру поствакцинальных реакций при введении живых В. вакцинальный процесс и напоминает инфекционный, однако он отличается от него своим доброкачественным течением.

Вакцины при введении в организм вызывают ответную иммунную реакцию, которая в зависимости от природы иммунитета и свойств антигена может носить выраженный гуморальный, клеточный или клеточно-гуморальный характер.

Эффективность применения В. определяется иммунологической реактивностью, зависящей от генетических и фенотипических особенностей организма, от качества антигена, дозы, кратности и интервала между прививками. Поэтому для каждой В. разрабатывают схему вакцинации. Живые В. обычно используют однократно, неживые — чаще двукратно или трехкратно. Поствакцинальный иммунитет сохраняется после первичной вакцинации 6—12 мес. (для слабых вакцин) и до 5 и более лет (для сильных вакцин); поддерживается периодическими ревакцинациями. Активность (сила) вакцины определяется коэффициентом защиты (отношением числа заболеваний среди непривитых к числу заболевших среди привитых), который может варьировать от 2 до 500. К слабым вакцинам с коэффициентом защиты от 2 до 10 относятся гриппозная, дизентерийная, брюшнотифозная и др., к сильным с коэффициентом защиты от 50 до 500 — оспенная, туляремиальная, против желтой лихорадки и др.

В зависимости от способа применения В. делят на инъекционные, пероральные и ингаляционные. В соответствии с этим им придается соответствующая лекарственная форма: для инъекций применяют исходные жидкие или регидратированные из сухого состояния В.; пероральные В. — в виде таблеток, конфет (драже) или капсул; для ингаляций используют сухие (пылевые или регидратированные) вакцины. В. для инъекций вводят накожно (скарификация), подкожно, внутримышечно.

Наиболее просты в изготовлении живые В., так как технология в основном сводится к выращиванию аттенуированного вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами (микоплазмы, онковирусы) с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата. Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные среды) в аппаратах — ферментаторах емкостью от 0,1 м<sup>3</sup> до 1—2 м<sup>3</sup>. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов. Вирусные и риккетсиозные живые В. получают выращиванием вакцинного штамма в эмбрионах кур или перепелов, свободных от вирусов лейкоза, либо в культурах клеток, лишенных микоплазм. Используют или первично-трипсинизированные клетки животных или перевиваемые диплоидные клетки человека. Живые аттенуированные штаммы бактерий и вирусов, применяемые для приготовления живых В., получены, как правило, из природных штаммов путем их селекции или пассажей через биологические системы (организм животных, эмбрионы кур, культуры клеток, питательные среды).

В связи с успехами генетики и генетической инженерии появились возможности целенаправленного конструирования вакцинных штаммов. Получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа, а также штаммы вируса вакцины со встроенными генами протективных антигенов вируса гепатита В. Инаktivированные корпускулярные бактериальные В. или целновирионные инаktivированные В.

получают соответственно из культур бактерий и вирусов, выращенных на тех же средах накопления, что и в случаях получения живых вакцин, и затем подвергнутых инаktivации нагреванием (гретые вакцины), формалином (формолвакцины), ультрафиолетовым излучением (УФ-вакцины), ионизирующим излучением (радиовакцины), спиртом (спиртовые вакцины). Инаktivированные В. ввиду недостаточно высокой иммуногенности и повышенной реактогенности не нашли широкого применения.

Производство молекулярных В. — более сложный технологический процесс, т.к. требует извлечения из выращенной микробной массы протективных антигенов или антигенных комплексов, очистки и концентрирования антигенов, введения в препараты адьювантов. Выделение и очистка антигенов с помощью традиционных методов (экстракции трихлоруксусной кислотой, кислотного или щелочного гидролиза, ферментативного гидролиза, высаливания нейтральными солями, осаждения спиртом или ацетоном) сочетаются с применением современных методов (скоростного ультрацентрифугирования, мембранной ультрафильтрации, хроматографического разделения, аффинной хроматографии, в т.ч. на моноклональных антителах). С помощью этих приемов удается получать антигены высокой степени очистки и концентрирования. К очищенным антигенам, стандартизированным по числу антигенных единиц, с целью повышения иммуногенности добавляют адьюванты, чаще всего сорбенты-гели (гидрат окиси алюминия и др.). Препараты, в которых антиген находится в сорбированном состоянии, называют сорбированными или адсорбированными (дифтерийный, столбнячный, ботулинический сорбированные анатоксины). Сорбент играет роль носителя и адьюванта. В качестве носителя в синтетических вакцинах предложены всевозможные полимеры.

Интенсивно разрабатывается генно-инженерный способ получения протективных белковых антигенов бактерий и вирусов. В качестве продуцентов используют обычно эшерихии, дрожжи, псевдомонады со встроенными в них генами протективных антигенов. Получены рекомбинантные штаммы бактерий, продуцирующие антигены возбудителей гриппа, коклюша, кори, герпеса, гепатита В, бешенства, ящура, ВИЧ-инфекции и др. Получение протективных антигенов генно-инженерным способом целесообразно в том случае, когда выращивание микробов связано с большими трудностями или опасностями, или когда трудно извлекать антиген из микробной клетки. Принцип и технология получения В. на основе генно-инженерного способа сводятся к выращиванию рекомбинантного штамма, выделению и очистке протективного антигена, конструированию конечного препарата.

Препараты В., предназначенные для иммунизации людей, проверяют на безвредность, реактогенность и иммуногенность. Безвредность включает проверку на лабораторных животных и других биологических системах токсичности, пирогенности, стерильности, аллергенности, тератогенности, мутагенности препарата В. Реактогенность, т.е. побочные местные и общие реакции на введение В., оценивают на животных и при прививках людей. Иммуногенность проверяют на лабораторных животных и выражают в иммунизирующих единицах, т.е. в дозах антигена, защищающих 50% иммунизированных животных, зараженных определенным числом инфицирующих доз патогенного микроба или токсина. В противоэпидемической практике эффект вакцинации оценивают по соотношению инфекционной заболеваемости в привитых и непривитых коллективах. Контроль В. осуществляют на производстве в отделах бактериологического контроля и в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасовича по разработанной и утвержденной МЗ СССР нормативно-технической документации.

Вакцинопрофилактика занимает значительное место в борьбе с инфекционными болезнями. Благодаря вакцинопрофилактике ликвидирована оспа, сведена к минимуму заболеваемость полиомиелитом, дифтерией, резко снижена заболеваемость корью, коклюшем, сибирской язвой, туляремией и другими инфекционными болезнями. Успехи вакцинопрофилактики зависят от качества вакцин и своевременного охвата прививками угрожаемых контингентов. Большие задачи стоят по совершенствованию В. против гриппа, бешенства, кишечных инфекций и других, а также по разработке В. против сифилиса, ВИЧ-инфекции, сапа, мелиоидоза, болезни легионеров и некоторых других. Современные иммунология и вакцинопрофилактика подвели теоретическую базу и наметили пути совершенствования В. в направлении создания очищенных поливалентных адьювантных синтетических В. и получения новых безвредных эффективных живых рекомбинантных вакцин.

#### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

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

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

**(ЧАСТЬ II)**

**Учебно-методическое пособие для преподавателей по специальности  
«Фармация», дополненное и переработанное**

**ВЛАДИКАВКАЗ**

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ** (возбудители кишечного эшерихиоза, кишечного иерсиниоза).

**Учебная цель:** обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики кишечного эшерихиоза и кишечного иерсиниоза.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

##### **Бактериологический метод исследования**

Выделение чистой культуры из исследуемого материала (испражнения больного).

1. Посев исследуемого материала на дифференциально- диагностическую среду Эндо (демонстрация).
2. Учет результатов посева исследуемого материала на среду Эндо. Отбор "подозрительных" колоний и их изучение на среде Эндо, макроскопическая характеристика колоний (демонстрация).
3. Высев "подозрительных колоний" на среду Ресселя и МПБ.
4. Оформление протокола исследования.

#### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования  
Штатив – 8 шт.  
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 – 8шт.
5. Чашки со средой Эндо с ростом кишечной палочки -8шт.
6. Пробирки со средой Ресселя - 8шт.
7. Пробирки с МПБ - 8 шт.
8. Чашки Петри с индикаторными полосками на индол- 8 шт
9. Чашки Петри с индикаторными полосками на сероводород- 8 шт
10. Бак препараты
11. Таблицы.

#### **ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ**

| №№<br>П/П | Исследуемый материал | Результаты<br>исследования | Графическое<br>изображение |
|-----------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
|           |                      |                            |                            |

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

В связи с трудностью дифференциации возбудителей кишечных заболеваний, вызывающих сходные

клинические проявления, необходимо проведение комплексного микробиологического исследования, включающего одновременный поиск в исследуемом материале возбудителей эшерихиозов, шигеллезов, сальмонеллезов и холеры.

1. Исследуемый материал (испражнения больного) засевают на поверхность одной из дифференциально-диагностических сред для выделения возбудителя кишечных заболеваний (среду Эндо) и 1 % щелочной агар для выделения возбудителя холеры.

Посев проводится штрихом на поверхности плотной питательной среды с целью механического разъединения микробов и получения изолированных колоний.

Чашки с 1 % щелочным агаром инкубируют при 37 град. 10-12 часов, чашки со средой Эндо - 18-24 часа.

2. После инкубации в термостате посевы на чашках со средами Эндо и 1 % щелочном агаре просматривают в проходящем и преломляющем свете. При отсутствии каких-либо признаков роста микробов на щелочном агаре, дается отрицательный ответ в отношении нахождения возбудителя холеры в исследуемом материале.

На среде Эндо через 18-24 ч. роста в термостате отмечается наличие колоний малиново-красных (ферментирующих лактозу, входящую в состав среды) и бесцветных (не ферментирующих лактозу).

3. Бесцветные ("подозрительные") колонии высевают на среду Ресселя. Состав среды Ресселя: МПА, 1 % лактозы, 0,1 % глюкозы и индикатор Андрее.

Посев производится следующим образом: снятую колонию осторожно, не задевая края пробирки, вносят в конденсационную жидкость, затем штрихами засевают всю скошенную поверхность среды и делают укол в глубину столбика. Пробирку с посевом на среде Ресселя ставят в термостат (37°C) на сутки (18-24 ч.).

Одновременно для изучения протеолитической активности культуры лактозонегативные колонии высевают в пробирку с МПБ с индикаторными бумажками, пропитанными ацетатом свинца и щавелевой кислотой для определения образования сероводорода и индола. Пробирку помещают в термостат (37°C, 18-24 ч.)

**Эшерихиоз (кишечная колиинфекция)** — острая кишечная инфекция, вызванная различными серологическими группами энтеропатогенных кишечных палочек (ЭПКП), протекающая с симптомами общей интоксикации и синдромом поражения желудочно-кишечного тракта.

Этиология эшерихиоза.

Возбудители — энтеропатогенные кишечные палочки — принадлежат к виду *Escherichia*, роду *Escherichia*, семейству *Enterobacteriaceae*, представляют собой грамотрицательные палочки, устойчивые во внешней среде. Могут месяцами сохраняться в почве, воде, испражнениях. Хорошо растут на обычных питательных средах. Быстро погибают при кипячении и воздействии дезинфицирующих средств. Эшерихии имеют сложную антигенную структуру: соматический О-антиген (термостабильный), поверхностный (капсульный) К-антиген и жгутиковый Н-антиген (термолabile).

Кишечные инфекции, вызванные ЭПКП, встречаются чаще у детей раннего возраста

Классификация эшерихиозов:

- Энтеропатогенный (сальмонеллезоподобный).
- Энтеротоксический (холероподобный).
- Энтероинвазивный (дизентериеподобный).
- Энтерогеморрагический.

Диагноз эшерихиоза может быть установлен только при выделении возбудителя. Для бактериологического исследования отбирают фекалии, рвотные массы, промывные воды желудка, при генерализованных формах — кровь, СМЖ. Проводить исследование испражнений нужно сразу же, как только больной обратился за помощью к врачу, так как с течением времени вероятность выделения возбудителя быстро снижается. Сбор испражнений проводится после естественной дефекации или с помощью тампонов в пробирки с глицериновой смесью в количестве не более 1/3 объема консерванта, а рвотных масс и промывных вод желудка — в стеклянные баночки емкостью 200-250 мл. В лечебном учреждении должно быть проведено не менее трех диагностических исследований (первое — при поступлении больного до назначения ему антибиотиков, химиопрепаратов).

С целью выделения ЭПКП и ЭТКП следует отбирать пробы испражнений из последних порций, при исследовании ЭИКП — пробы с примесью слизи.

Отобранный материал в течение первых 2 ч доставляют в лабораторию, если это невозможно — помещают в холодильник и направляют в лабораторию не позднее 12 ч после забора.

При решении вопроса об этиологической роли возбудителя при возникновении кишечной инфекции необходимо учитывать следующие критерии:

• выделение эшерихий определенных сероваров, относящихся к ЭПКП, ЭИКП, ЭТКП, ЭГКП или ЭАКП, в монокультуре в сочетании с непатогенными сероварами эшерихий; если эшерихия патогенна, диагноз может быть установлен по одному положительному бакпосеву;

• массивное выделение ЭТКП (10<sup>6</sup>/г фекалий и более) и значительное их преобладание над представителями другой условно-патогенной флоры.

Определенное диагностическое значение имеют серологические методы исследований, хотя они и менее информативны, неубедительны, так как возможны ложноположительные результаты из-за антигенного сходства с другими энтеробактериями. Используются для ретроспективной диагностики, особенно во время

вспышки. В настоящее время из серологических методов исследования используют РНГА (диагностический титр 1:200 – 1:400 для взрослых, 1:40 – 1:80 для детей); реакцию иммунофлуоресценции; реакцию иммунной сорбции антител, меченных ферментами; реакцию нейтрализации; реакцию агглютинации с аутокультурой при нарастании титра антител в 4 и более раз в динамике заболевания.

Перспективным методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Чтобы доказать патогенность эшерихии, нужно убедиться, что она имеет рецепторы, обеспечивающие адгезивность, может продуцировать термолabileный и термостабильный токсины, содержит плазмидную ДНК, кодирующую токсинообразование (Протасов С.А., 2003).

Если выделяются непатогенные эшерихии, надо подходить к диагностике как к таковой при других ОКИ, вызванных условно-патогенной флорой: трехкратный массивный рост микроорганизма, отсутствие высева патогенных возбудителей.

Диагноз «эшерихиоз», как отмечалось, неправомерен без бактериологического, а также серологического подтверждения. Исключение составляет клинико-эпидемиологическое обоснование диагноза.

Инструментальные методы обследования (ректороманоскопия, колоноскопия) при эшерихиозах малоинформативны.

При оформлении заключительного диагноза указывается вид выделенного возбудителя, синдром поражения пищеварительного тракта, степень тяжести заболевания. При затяжном течении отмечается также характер течения болезни. Например: эшерихиоз (*E. coli* O111) в форме острого гастроэнтерита, средней степени тяжести.

Диагноз бактерионосительства может быть установлен только в тех случаях, когда клинические симптомы заболевания отсутствуют в настоящее время и не отмечались в предыдущие 1-1,5 мес. Бактерионосительство, как правило, кратковременное (1-2-кратное выделение возбудителя). В таких случаях при оформлении диагноза указывается только вид возбудителя. Например: бактерионоситель энтеропатогенных эшерихий O125.

Этиология. Возбудитель (*Yersinia enterocolica*) - грамотрицательная палочка, анаэроб, хорошо растет на обычных питательных средах при низких температурах. Известно 30 сероваров. Заболевание у человека чаще вызывают 3-й, 5-й, 8-й и 9-й серовары.

#### **Кишечный иерсиниоз.**

*Эпидемиология.* Источником инфекции являются человек и животные, больные и носители. Особенно часто возбудитель обнаруживается у мышевидных грызунов, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек, в молочных продуктах, мороженом. Заражение человека происходит через рот при употреблении инфицированной пищи, воды или контактным путем.

Заболевание встречается в течение всего года.

*Патогенез.* Возбудитель размножается в тонком кишечнике, вследствие чего развивается энтероколит или гастроэнтероколит. В тяжелых случаях в области терминального отдела тонкой кишки возникает язвенный процесс с вовлечением мезентериальных лимфатических узлов. При проникновении возбудителя в кровь отмечаются бактериемия и генерализация процесса с развитием воспаления в органах.

*Клиника.* Инкубационный период — 2-3 дня. Клиническая симптоматика у больных практически не отличается от таковой при псевдотуберкулезе. Однако необходимо иметь в виду, что при кишечном иерсиниозе заболевание часто начинается с кишечных расстройств (обильный водянистый стул с примесью крови), а поражение внутренних органов возникает как бы вторично на высоте клинических проявлений и чаще в тяжелых случаях.

*В диагностике кишечного иерсиниоза* ведущую роль играют бактериологический и серологический методы исследования. *Yersinia enterocolica* можно выделить из кала, крови, мочи, гноя, слизи из зева, лимфатического узла. Из методов серологической диагностики используют реакцию агглютинации и реакцию непрямой гемагглютинации. Диагностический титр 1:100 и выше. Более достоверно нарастание титра специфических антител в динамике заболевания.

Профилактика кишечного иерсиниоза проводится так же, как при других кишечных инфекциях. Специфическая профилактика не разработана.

#### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                        |         |
|--------------------------------------------------------|---------|
| 6. Определение исходного уровня знаний                 | 25 мин. |
| 7. Самостоятельная работа                              | 45мин.  |
| 8. Проверка протоколов                                 | 10мин.  |
| 9. Уборка рабочего стола                               | 10мин.  |
| 10. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ** (возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов).

**Учебная цель:** обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей брюшного тифа, сальмонеллезов.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики брюшного тифа, сальмонеллезов.
- 1.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики брюшного тифа, сальмонеллезов.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Учет результатов на дифференциально-диагностическую среду Эндо, висмут-сульфитный агар (демонстрация).
2. Учет результатов на среде Ресселя и МПБ.
3. Учет результатов реакции Видаля.

#### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования:
  - Штатив – 8 шт.
  - 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 – 8шт.
5. Чашки Петри с висмут-сульфитом с ростом колоний – 8шт.
6. Пробирки со средой Ресселя – 8шт. (учет результата занятия №1)
7. Пробирки с МПБ - 8 шт. (учет результата занятия №1).
8. Развернутая реакция агглютинации Видаля (демонстрация) – 2 шт.
9. Среда Раппопорт (демонстрация) – 2 шт.
8. Бак препараты.
9. Таблицы.

#### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Брюшной тиф** — острая циклически протекающая кишечная антропонозная инфекция, вызываемая бактериями *Salmonella typhi* (*Salmonella enterica* серотип *typhi*), с алиментарным путем передачи (фекально-оральный), характеризующаяся лихорадкой, явлениями общей интоксикации с развитием тифозного статуса, розеолезными высыпаниями на коже, гепато- и спленомегалией и специфическим поражением лимфатической системы нижнего отдела тонкой кишки.

Возбудитель — *Salmonella typhi* из семейства Enterobacteriaceae рода *Salmonella*, подвижная грамотрицательная палочка с закругленными концами, хорошо окрашиваемая всеми анилиновыми красителями. Вырабатывает эндотоксин, патогенный только для человека. Не образует споры.

Бактерии брюшного тифа довольно устойчивы во внешней среде: в пресной воде водоемов они сохраняются до месяца, на овощах и фруктах — до 10 дней, а в молочных продуктах могут размножаться и накапливаться.

Под воздействием 3 % раствора хлорамина, 5 % раствора карболовой кислоты, сулемы (1:1000), 96 % этилового спирта они гибнут через несколько минут.

Сальмонеллы брюшного тифа имеют сложную антигенную структуру. Различные серовары содержат характерный набор антигенных факторов, которые складываются из сочетания О- и Н-антигенов.

Лабораторная диагностика прежде всего заключается в бактериологическом исследовании крови, кала, мочи, желчи. Метод гемокультуры можно использовать с первых дней заболевания и до конца лихорадочного периода, желательно до начала лечения. Для этого 5-10 мл крови из локтевой вены у постели больного засевают на 20 % желчный бульон или среду Рапопорта, мясопептонный бульон с 1 % глюкозы, либо даже в стерильную дистиллированную воду. Объем среды — 50-100 мл. Соотношение материала и среды должно быть 1:10. Кал, мочу, дуоденальное содержимое исследуют со 2-й недели от начала заболевания, засевая на среды Плоскирева, Левина, Мюллера и др. Предварительный результат этих исследований получают через 2 дня, окончательный — через 4 дня.

Для выявления брюшной тифозной палочки в фекалиях, моче, дуоденальном содержимом используют РИФ с мечеными сыворотками к О- и Vi-антигенам. Предварительный ответ может быть получен в течение 1 ч, окончательный — через 5-20 ч.

Из серологических методов используют РА (Видаля) и РПГА с цистеином. Реакцию Видаля ставят с Н- и О-антигенами с 7-9-го дня заболевания повторяют на 3-4-й неделе для определения нарастания титра (от 1:200 до 1:400-1:800-1:1600). Последнее имеет значение для исключения положительного результата реакции, который может быть обусловлен предшествовавшей иммунизации против брюшного тифа. Ответ может быть получен через 18-20 ч. При постановке РПГА учет результатов проводят после инкубирования пластин при 37° С в течение 1,5-2 ч и повторно — через 24 ч нахождения при комнатной температуре. Положительный считается реакция в титре 1:40 и выше.

**Сальмонеллёзы** — острые кишечные инфекции животных и человека, вызываемые сальмонеллами. Острое инфекционное зооантропонозное заболевание, вызываемое сальмонеллами и характеризующееся, в общем случае, развитием интоксикации и поражением желудочно-кишечного тракта.

Сальмонеллёзы у человека рассматривают как определённое заболевание (нозологическую форму), отличая его от брюшного тифа и паратифов. Основным источником инфекции — пищевые продукты, реже — больное животное, в отдельных случаях источником заражения может быть человек (больной или бактерионоситель). Заражение происходит через инфицированные пищевые продукты, как правило, животного происхождения (мясо и мясные продукты, молоко, яйца, особенно утиные и гусиные), при вынужденном, неправильном убое животных, нарушении правил хранения и приготовления продуктов (соприкосновение готовой и сырой продукции, недостаточная термическая обработка продуктов перед употреблением и т. д.). Сальмонеллёзы развиваются в тех случаях, когда в организм попадают накопившиеся в продуктах живые сальмонеллы.

На территории РФ наиболее часто встречаются следующие серовары вида *Salmonella enterica* подвид *enterica*: *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Infantis*.

Клинические проявления сальмонеллёзов разнообразны — от бессимптомного носительства возбудителя инфекции до тяжёлых септических форм. Инкубационный период колеблется от 2—6 часов до 2—3 суток.

Различают несколько клинических форм сальмонеллёза:

1. Желудочно-кишечная форма
2. Тифоподобная форма
3. Септическая форма

В 15—17 % случаев сальмонеллёзов в периоде реконвалесценции наблюдается кратковременное бактерионосительство. Возможны «транзитное» носительство (однократное выделение сальмонелл без клинических проявлений) и хроническое бактерионосительство.

*Диагностика* сальмонеллеза осуществляется комплексно с учетом эпидемиологических данных, симптоматики и результатов лабораторных исследований, направленных на изоляцию и типирование возбудителя. Основным способом типирования сальмонелл является реакция агглютинации. Для ее проведения до недавнего времени пользовались гипериммунными сыворотками, но в настоящее время им на смену пришли моноклональные антитела к сальмонеллам.

*Профилактика.*

Ветеринарно-санитарный надзор за убоем скота и обработкой туш; выполнение санитарных правил приготовления, хранения и реализации пищевых продуктов; обследование поступающих на работу на предприятия общественного питания и торговли, детские учреждения.

## ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа              | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                 | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола               | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и  |         |

**ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3**  
**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
**(возбудители шигеллеза, холеры).**

**Цель занятия:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики кишечных заболеваний.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей шигеллеза, холеры.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики шигеллеза, холеры.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики шигеллеза, холеры.

**САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Учет результатов экспресс-диагностики холеры (демонстрация).
2. Учет результатов посева на дифференциально-диагностической среде Плоскирева (макро- и микроскопическое исследования).

**ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования  
Штатив – 8 шт.  
Пинцет -8 шт.  
Бактериологическая петля -8 шт.  
Флакон с физ.р-ром – 8 шт.  
Спиртовка -8 шт.  
Лоток с подставкой – 8 шт.
2. Микроскопы – 8 шт.
3. Иммерсионное масло.
4. Набор красок по Граму – 8 шт.
5. Чашки со средой Плоскирева с ростом колоний – 8 шт.
6. Демонстрация: триада Полевой-Ермольевой – 4 шт.
7. Демонстрация: микропрепараты холерного вибриона, шигелл.
8. Бак препараты.
9. Таблицы.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Шигеллёзы** — сборная группа инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями рода шигелл (*Shigella*).

Дизентерия — шигеллёз, протекающий с явлениями интоксикации и преимущественным поражением дистального отдела толстой кишки.

*Этиология.*

Возбудители — грамотрицательные неподвижные (родовой признак) бактерии рода *Shigella* семейства *Enterobacteriaceae*.

*Эпидемиология.*

Источник инфекции — больные лица и бактерионосители. Шигеллёз регистрируют в течение всего года с подъёмом заболеваемости в тёплый сезон.

*Механизмы передачи* — фекально-оральный и контактно-бытовой, через воду, пищевые продукты. Определённую роль в распространении инфекции играют насекомые-переносчики: мухи, тараканы.

Инфицирующая доза составляет 200—300 живых клеток, что обычно достаточно для развития заболевания.

Инкубационный период длится 1—7 дней.

*Патогенез шигеллеза.* Входными воротами инфекции является кишечник, где происходит размножение шигелл. Инвазия шигелл происходит преимущественно в энтероциты дистального отдела толстой кишки, что приводит к разрушению энтероцитов, развитию местных воспалительных изменений в виде отека, гиперемии, эрозии, поверхностных изъязвлений. Эндотоксины шигелл, попадая в кровь, вызывают общую интоксикацию, вплоть до развития эндотоксического шока, нарушение всех видов обмена веществ — белкового, жирового, водно-солевого, с развитием эксикоза различной степени.

## Лечение

Этиотропное (воздействие на возбудителя) лечение производится препаратами:

препараты нитрофуранового ряда (фуразолидон, фурадонин),  
хинолины (хлорхинальдон),  
фторхинолоны (ципрофлоксацин).

Патогенетическое лечение состоит в дезинтоксикационной терапии изотоническими солевыми растворами (раствор Рингера), энтеросорбентами (энтеросорб, Активированный уголь, Полифепан, Смекта), а так же витаминотерапии. Проводят коррекцию дисбактериоза.

### Лабораторная диагностика шигеллеза.

1. Общий анализ крови. Выявляют лейкоцитоз, нейтрофильный сдвиг влево, повышенную СОЭ; степень изменений обычно соответствует тяжести состояния.

2. Бактериологический метод. Материалом для исследования служат испражнения больного и рвотные массы. Используют дифференциально-диагностические среды (Плоскирева, Эндо или Левина).

3. Серологический метод. Исследуют парные сыворотки в РПГА с эритроцитарным диагностикумом для обнаружения антител и нарастания их титра.

Минимальным условно-диагностическим титром антител к диагностикуму шигелл Флекснера для детей до 3-х лет считают реакцию в разведении 1:100, для остальных диагностикумов 1:200 или 4-х кратное нарастание титра антител в динамике болезни.

4. Применяют также иммунофлюоресцентный метод, позволяющий обнаружить антиген в фекалиях, моче, крови; реакцию нарастания титра фага (РНФ), реакцию нейтрализации антител (РНА), иммуноферментный метод (ИФА) и иммунорадиометрический анализ (ИРА).

5. Копроцитологическое исследование проводят с первых дней болезни. При микроскопическом исследовании учитывают повышенное количество лейкоцитов, эритроцитов, клеток кишечного эпителия, наличие крахмала, жира и продуктов его расщепления, цисты простейших, яйца глистов.

**Холера** (лат. cholera (греч. cholera, от cholē желчь + rheō течь, истекать)) — острая кишечная антропонозная инфекция, вызываемая бактериями вида *Vibrio cholerae*. Характеризуется фекально-оральным механизмом заражения, поражением тонкого кишечника, водянистой диареей, рвотой, быстрой потерей организмом жидкости и электролитов с развитием различной степени обезвоживания вплоть до гиповолемического шока и смерти.

**Этиология.** Известно более 150 серогрупп *Vibrio cholerae*; их разделяют на агглютинирующиеся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae* O1) и на не агглютинирующиеся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae* non O1).

«Классическая» холера вызывается холерным вибрионом серогруппы O1 (*Vibrio cholerae* O1). Различают два биовара (биотипа) этой серогруппы: классический (*Vibrio cholerae* biovar cholerae) и Эль-Тор (*Vibrio cholerae* biovar eltor).

По морфологическим, культуральным и серологическим характеристикам они сходны: короткие изогнутые подвижные палочки, имеющие жгутик, грамотрицательные аэробы, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, спор и капсул не образуют, растут на щелочных средах (pH 7,6-9,2) при температуре 10-40 °С. Холерные вибрионы Эль-Тор в отличие от классических способны гемолизировать эритроциты барана (не всегда).

Каждый из этих биотипов по О-антигену (соматическому) подразделяется на серотипы. Серотип Инаба (Inaba) содержит фракцию С, серотип Огава (Ogawa) — фракцию В и серотип Гикосима (правильнее Гикосима) (Hikojima) — фракции А, В и С. Н-антиген холерных вибрионов (жгутиковый) — общий для всех серотипов. Холерные вибрионы образуют холерный токсин — белковый энтеротоксин.

*Vibrio cholerae* non-O1 вызывают различной степени тяжести холероподобную диарею, которая также может закончиться летальным исходом

Как пример можно привести большую эпидемию, вызванную *Vibrio cholerae* серогруппы O139 Bengal. Она началась в октябре 1992 в порту Мадрас Южной Индии и, быстро распространяясь по побережью Бенгалии, достигла Бангладеш в декабре 1992, где только за первые 3 месяца 1993 вызвала более чем 100000 случаев заболевания.

**Лабораторная диагностика.** Цель диагностики: индикация *Vibrio cholerae* в испражнениях и/или рвотных массах, воде, определение агглютининов и вибриоцидных антител в парных сыворотках крови больных

**Методика диагностики.** Посев бактериологического материала (испражнения, рвотные массы, вода) на тиосульфат-цитрат-жёлчносолевой-сахарозный агар (англ. TCBS), а также на 1 % щелочную пептонную воду; последующий пересев на вторую пептонную воду и высев на чашки со щелочным агаром.

Выделение чистой культуры, идентификация.

Исследование биохимических свойств выделенной культуры — способность разлагать те или иные углеводы, т. н. «ряд сахаров» — сахарозу, арабинозу, маннит.

Реакция агглютинации со специфическими сыворотками

**Профилактика.** Предупреждение заноса инфекции из эндемических очагов

Соблюдение санитарно-гигиенических мер: обеззараживание воды, мытьё рук, термическая обработка пищи, обеззараживание мест общего пользования и т. д.

Раннее выявление, изоляция и лечение больных и вибрионосителей

Специфическая профилактика холерной вакциной и холероген-анатоксином. Холерная вакцина имеет короткий (3-6 мес.) период действия.

В настоящее время имеются следующие пероральные противохолерные вакцины:

*Вакцина WC/rBS* — состоит из убитых целых клеток *V. Cholerae* O1 с очищенной рекомбинантной В-субъединицей холерного анатоксина (WC/rBS) — предоставляет 85-90-процентную защиту во всех возрастных группах в течение шести месяцев после приёма двух доз с недельным перерывом.

*Модифицированная вакцина WC/rBS* — не содержит рекомбинантной В-субъединицы. Необходимо принимать две дозы этой вакцины с недельным перерывом. Вакцина лицензирована только во Вьетнаме.

*Вакцина CVD 103-HgR* — состоит из ослабленных живых оральных генетически модифицированных штаммов *V. Cholerae* O1 (CVD 103-HgR). Однократная доза вакцины предоставляет защиту от *V. Cholerae* на высоком уровне (95 %). Через три месяца после приёма вакцины защита от *V. Cholerae* El Tor была на уровне 65 %.

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(возбудители бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза).

**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ-ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ».**

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
5. Сдача модуля.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Постановка и учет результатов реакции Хеддельсона и Райта при бруцеллезе.
2. Постановка и учет результатов РОНГА при ботулизме и лептоспирозе.

### ОСНАЩЕНИЕ

- a. Демонстрация: реакции Хеддельсона– 4 шт.
- b. Постановка реакции Райта:
  - А) Чистые пробирки 7 шт. – 8 наборов.
  - Б) Стерильные пипетки.
  - В) Диагностикум бруцеллезный – 8шт.
  - Г) Исследуемая сыворотка – 8шт.
  - Д) Флаконы с физ. р-ром – 8шт.

- с. Демонстрация: микропрепараты возбудителей бруцеллеза, ботулизма, лептоспироза.
- d. Демонстрация: РОНГА при ботулизме и лептоспирозе.
- e. Бак препараты.
- f. Таблицы

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ БРУЦЕЛЛЕЗА

В сыворотке больных бруцеллезом накапливаются агглютинирующие (вначале Ig M, затем Ig G), неполные блокирующие (Ig A , IgG ) и опсонические (Ig G) антитела. Для их выявления с диагностической целью используют реакцию Райта и Хеддельсона. Реакция агглютинации- один из основных диагностических методов при бруцеллезе.

1. Постановка реакции Райта проводится с целью определения содержания в сыворотке крови больного специфических антител. Компоненты реакции:

- а) исследуемая сыворотка в разведении 1:25;
- б) антиген — взвесь убитых бруцелл (диагностикум Райта).

**СХЕМА РЕАКЦИИ РАЙТА.**

| № пробирок                   | 1    | 2     | 3      | 4     | 5     | 6   | 7   |
|------------------------------|------|-------|--------|-------|-------|-----|-----|
| Компоненты                   |      |       |        |       |       |     |     |
| 1. Физиологический раствор   | 0,5  | 0,5   | 0,5    | 0,5   | 0,5   | 0,5 | 0,5 |
| 2. Сыворотка больного (1:25) | 0,5  | 0,5   | 0,5    | 0,5   | 0,5   | -   | 0,5 |
| 3. Разведения сыворотки      | 1:50 | 1:100 | 1: 200 | 1:400 | 1:800 | -   | -   |
| 4. Диагностикум Райта        | 0,5  | 0,5   | 0,5    | 0,5   | 0,5   | -   | -   |

Учет результатов проводится через 18-20 часов, поэтому на занятии предлагается демонстрация реакции Райта. Студенты проводят учет результатов и делают вывод.

2. Постановка реакции Хеддельсона.

Реакция ставится при массовом обследовании на бруцеллез с использованием стеклянных пластин.

Компоненты реакции:

- а) неразведенная сыворотка крови больного;
- б) антиген - взвесь убитых и окрашенных кристалл-виолетом бруцелл.

**СХЕМА РЕАКЦИИ ХЕДДЕЛЬСОНА**

| № квадратов                | 1    | 2    | 3    | 4    | Контроль  |         |
|----------------------------|------|------|------|------|-----------|---------|
|                            |      |      |      |      | сыворотка | антиген |
| 1. Физиологический раствор | -    | -    |      |      | 0,03      | 0,03    |
| 2. Сыворотка больного      | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,02      | -       |
| 3. Диагностикум Райта      | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | -         | 0,03    |

Студенты проводят реакцию самостоятельно и делают заключение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

### ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

| №№<br>П/П | Исследуемый<br>материал | Результаты<br>Исследования | Графическое<br>изображение |
|-----------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
|           |                         |                            |                            |

**Бруцеллёз (лат. brucellosis)** — зоонозная инфекция, передающаяся от больных животных человеку, характеризующаяся множественным поражением органов и систем организма человека.

Возбудитель заболевания — группа микроорганизмов рода бруцелл. Патогенными для человека являются три: возбудитель бруцеллёза мелкого рогатого скота (*Brucella melitensis*), возбудитель бруцеллёза крупного рогатого скота (*Brucella abortus*), возбудитель бруцеллёза свиней (*Brucella suis*).

Возбудители бруцеллёза — бактерии рода бруцелла — хорошо переносят низкие температуры и замораживание, в воде сохраняются до 5 мес, в почве — 3 мес. и более, в коровьем молоке — до 45 дней, в брынзе — до 60 дней, в масле, сливках, простокваше и свежих сырах — в течение всего периода их пищевой ценности; в замороженном мясе — св. 5 мес, в засоленных шкурах — 2 мес, в шерсти — до 3—4 мес. При кипячении и пастеризации молока бруцеллы погибают. Дезинфицирующие средства убивают бактерии в течение нескольких минут.

Наиболее часто бруцеллёзом болеют домашние животные (козы, овцы, коровы, свиньи), при этом у животных наблюдаются аборт и рождение мертвого плода. Бруцеллы выделяются в окружающую среду с молоком, мочой больных животных и отделяемым матки (во время аборта). Возбудители бруцеллёза также содержатся в мясе больных животных.

В организм человека бруцеллы проникают через слизистые оболочки пищеварительного и дыхательного тракта, а также через поврежденную кожу (ссадины, царапины). Человек заражается бруцеллёзом при употреблении сырого молока от больных животных и приготовленных из него молочных продуктов (сыр, масло, творог, брынза), а также недостаточно проваренного и прожаренного мяса. Заражение может произойти и на производстве, связанном с обработкой кожи и шерсти, а также при уходе за больными животными и через предметы, зараженные их выделениями. Наиболее часто болеют доярки, телятницы, пастухи, чабаны, вет. работники, зоотехники.

*Инкубационный период* (скрытый) продолжается от одной недели до нескольких месяцев, чаще 1—3 нед. бруцеллёз характеризуется многообразием клинических симптомов; течение его может быть различной степени тяжести. Заболевание начинается постепенно: появляются недомогание, бессонница, иногда раздражительность, головная боль, боли в мышцах и суставах, снижается аппетит, температура повышается до 37,1—37,3°. Чаще бруцеллёз начинается остро: температура повышается до 39—40°, появляются озноб, слабость, обильное потоотделение, резкие боли в мышцах, тугоподвижность и боли в суставах. Характерно поражение кровеносных сосудов, нервной системы и костно-суставного аппарата, иногда могут быть психические расстройства. Болезнь длится в среднем 3 мес, но может затягиваться до 1—2 лет и более. Стойкие остаточные явления после перенесенного бруцеллёза могут привести к инвалидности. У беременных женщин при бруцеллёзе возможен самопроизвольный выкидыш.

*Лабораторное подтверждение* бруцеллеза существенно ограничено тем, что бруцеллы относятся к опасным возбудителям, выделение которых может проводиться только в специальных лабораториях, оборудованных в соответствии с требованиями профилактики. При серологических и аллергологических исследованиях нужно учитывать, что у привитых против бруцеллеза (прививаются группы риска, профессионально контактирующие с животными) могут быть и довольно длительное время положительные результаты как серологических реакций, так и особенно аллергических проб.

Из серологических реакций наиболее информативной является реакция агглютинации (реакция Райта). Агглютинация на стекле (реакция Хеддльсона) для диагностики не используется, она предложена для выявления лиц, подлежащих обследованию на бруцеллез, при массовых обследованиях по эпидемиологическим показаниям. Реакция Хеддльсона часто дает ложноположительные результаты. В какой-то степени это связано с перекрестными реакциями с рядом антигенов (иерсинии, возбудитель туляремии, противохолерная вакцинация и др.). Следует учитывать, что *Bg. melitensis* и *Bg. abortus* имеют перекрестные реакции между собой, но не с *Bg. canis*, так что для выявления антител к этой бруцелле необходим специальный диагностикум, который пока еще не выпускается. Возможно, это одна из причин редкого выявления данной разновидности бруцеллеза.

При остросептической форме бруцеллеза антитела начинают выявляться на 2-й неделе болезни и в дальнейшем титр их нарастает. Аллергическая проба становится положительной в конце 1-й и на 2-й неделе. При хронических формах нарастания титра антител часто выявить не удается. Следует учитывать, что постановка

аллергической пробы (проба Бюрне) может приводить к появлению антител или к нарастанию титра. Другие серологические реакции (РСК, РПГА, ОФР) менее информативны по сравнению с реакцией Райта и не имеют существенного значения. Отрицательные результаты пробы Бюрне позволяют исключить бруцеллез (за исключением ВИЧ-инфицированных, у которых исчезают все реакции ГЗТ).

**Ботулизм** (от лат. *botulus* — колбаса: название связано с тем фактом, что первые описанные случаи заболеваний были обусловлены употреблением кровяных и ливерных колбас) — тяжёлое токсикоинфекционное заболевание, характеризующееся поражением нервной системы, преимущественно продолговатого и спинного мозга, протекающее с преобладанием офтальмоплегического и бульбарного синдромов.

Развивается в результате попадания в организм пищевых продуктов, воды или аэрозолей, содержащих ботулотоксин, продуцируемый спорообразующей палочкой *Clostridium botulinum*. Ботулотоксин поражает мотонейроны передних рогов спинного мозга, вследствие чего нарушается иннервация мышц, развивается прогрессирующая острая дыхательная недостаточность.

Входными воротами являются слизистые оболочки дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, повреждённая кожа и лёгкие. От человека к человеку инфекция не передаётся. Несмотря на то, что ботулизм регистрируется гораздо реже, чем другие кишечные инфекции и отравления, он продолжает оставаться актуальным и опасным для жизни заболеванием.

Возбудитель ботулизма *Clostridium botulinum* относится к роду *Clostridium*, семейству *Bacillaceae*. Это анаэробная, подвижная, грамположительная, спорообразующая палочка размерами (0,6—1,0)х(4—9) мкм. В мазках имеет вид палочек с закруглёнными концами, образуют субтерминально расположенные споры, диаметр которых превышает поперечник вегетативной формы. Из-за спор возбудитель имеет форму теннисной ракетки (чем характерно отличается от других клостридий). Не образуют капсулы, подвижны, перитрихи, облигатные анаэробы, располагающиеся беспорядочными скоплениями или небольшими цепочками. Известно 7 типов возбудителя (сероваров) — А, В, С (подтипы C1 и C2), D, E, F и G, различающихся по антигенной структуре выделяемого экзотоксина. Из них патогенны типы А, В, Е и, реже, F.

В России преимущественно встречаются типы А, В, Е. Возбудители ботулизма широко распространены в природе и обитают в почве. Бактерия размножается и вырабатывает токсин в процессе жизнедеятельности. Токсины вырабатываются вегетативными формами. Оптимальные условия роста вегетативных форм — крайне низкое остаточное давление кислорода (0,40—1,33 кПа) и температурный режим в пределах 28—35 °С. В процессе жизнедеятельности происходит характерное для большинства клостридий газообразование (визуально на консервированных продуктах определяется как 'бомбаж'-вздутие крышки или жестяной банки). Прогревание при температуре 80 °С в течение 30 мин вызывает гибель вегетативных форм, однако его споровые формы способны выживать в течение нескольких часов при температуре 100 °С, и, попадая в благоприятную среду, переходить в вегетативные формы. Для полного уничтожения применяют дробную пастеризацию-тиндализацию. Ботулотоксин относится к полипептидам и при кипячении в течение свыше 30 мин инактивируется.

Оптимальный рост клостридий и токсинообразование происходят в анаэробных условиях при температуре 35 °С. Вегетативные формы бактерий погибают при 80 °С в течение 30 мин, при кипячении — в течение 5 мин. Токсин устойчив к действию пепсина и трипсина, выдерживает высокие концентрации (до 18 %) поваренной соли, не разрушается в продуктах, содержащих различные специи. Хорошо нейтрализуется в щелочной среде.

Ботулотоксин является одним из наиболее сильных природных ядов (летальная доза для человека 5—50 нг/кг массы тела). Также описаны продуцирующие ботулотоксин штаммы других видов — *Clostridium butyricum* и *Clostridium baratii*, но они чрезвычайно редки.

*Материалом для бактериологического исследования* служат фекалии и рвотные массы больного, промывные воды желудка и кишечника, содержимое ран (при раневом ботулизме), подозреваемая пища. Так как сразу поставить диагноз «ботулизм» у взрослого больного сложно, то проводят обнаружение токсина в исследуемом материале.

Исследование проводят на белых мышах. Им внутрибрюшинно вводят жидкость, полученную после центрифугирования сыворотки крови больного в смеси с противоботулинической сывороткой типов А, В, Е.

Исследование проходит 4 дня. За это время мыши, не защищённые тем типом антитоксина, которым вызвано заболевание у пациента, погибают. Остаются живыми мыши, которым вводили сыворотку, соответствующую типу токсина, циркулирующего в крови больного.

Серологических исследований не проводят, так как заболевание не сопровождается выработкой выраженных титров антител, что связано с незначительной дозой токсина, вызвавшей поражение.

*Критерии диагноза.*

В первые дни заболевания определить диагноз очень сложно. Постановке диагноза помогает наличие следующих факторов:

употребление больным пищи, которая может быть заражена токсином *Clostridium botulinum*;  
отсутствие лихорадки;  
прогрессирующая мышечная слабость;  
выраженная гипосаливация (сухость во рту);  
вздутие живота, задержка стула;

наличие глазных симптомов (нечёткость зрения, мидриаз и другие);  
признаки дыхательной недостаточности;  
чувство дискомфорта, изменение тембра голоса.

*Алгоритм лечения больных.*

Алгоритм интенсивной терапии больных ботулизмом включает [18]:

промывание желудка для удаления остатков токсина из желудка;  
кишечный диализ (5 % раствором соды);  
антитоксическая сыворотка (тип А, С, Е по 10 000 МЕ, тип В 5 000 МЕ);  
парентеральное введение инфузионных сред с целью дезинтоксикации, коррекции водно-электролитных и белковых нарушений;  
антибактериальная терапия;  
гипербарическая оксигенация как средство устранения гипоксии;  
лечение осложнений.

*Антитоксические сыворотки* получают иммунизацией лошадей возрастающими дозами анатоксинов. Антитоксические сыворотки выпускают с определённым содержанием антитоксинов, измеряемым в международных единицах (МЕ), принятых ВОЗ. За 1 МЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое способно нейтрализовать определённую дозу токсина. Действие сывороток сводится к нейтрализации токсинов, вырабатываемых возбудителем.

Для профилактики и лечения ботулизма применяют противоботулиновые лечебно-профилактические антитоксические сыворотки, выпускаемые в виде комплекта моновалентных или поливалентных сывороток. Сыворотку применяют после обязательного определения чувствительности пациента к лошадиному белку при помощи внутрикожной пробы. При положительной реакции сыворотку вводят по абсолютным показаниям под наблюдением врача с особыми предосторожностями. Заболевшим и всем лицам, употреблявшим продукт, вызвавший отравление, назначают антитоксическую поливалентную сыворотку.

Активную иммунизацию осуществляют очищенным сорбированным пентаанатоксином, обеспечивающим защиту от ботулинических токсинов типов А, В, С, О, Е, и секстаанатоксином. Препараты предназначены для иммунизации ограниченного контингента населения. Одна лечебная доза для антитоксинов типа А, С, Е составляет по 10 000 МЕ, типа В по 5 000 МЕ.

**Лептоспироз** — острая инфекционная болезнь, вызываемая возбудителем из рода лептоспир. Характеризуется поражением капилляров, часто поражением печени, почек, мышц, явлениями интоксикации, сопровождается волнообразной лихорадкой. Ранее это заболевание имело название иктеро-геморрагическая лихорадка, болезнь Васильева — Вейля. В 1883 году Н. П. Васильев выделил это заболевание из всех желтух, в 1886 г. детально описал 4 случая. Адольф Вейль описал заболевание в 1886 году, когда он сообщил об «остром инфекционном заболевании с увеличением селезёнки, желтухой и нефритом».

Лептоспироз распространён во всех регионах, кроме Арктики. Заболеваемость высокая. Более половины случаев протекает в тяжелой форме и требует реанимационных мероприятий.

*Этиология*

Лептоспиры — имеют спиралевидную форму, обладают прямолинейной и ротационной подвижностью. В жидких средах для лептоспир характерно вращение вокруг длинной оси, делящиеся клетки резко изгибаются в точке намеченного деления. Лептоспиры способны перемещаться в направлении среды, обладающей большей вязкостью. Концы лептоспир изогнуты в виде крючков, но могут быть и бескрючковые варианты. Длина лептоспир 6-20 мкм, а поперечник 0,1-0,15 мкм. Количество завитков зависит от длины (в среднем около 20). Лептоспиры культивируются на средах, содержащих сыворотку крови.

Лептоспиры относятся к гидрофилам. Важным условием для их выживания во внешней среде является повышенная влажность и рН в пределах 7,0-7,4, оптимальный рост лептоспир наблюдается при температуре 28-30°C. Растут лептоспиры медленно, рост их обнаруживается на 5-7-й день. Отличительным признаком сапрофитических штаммов лептоспир является их рост при 13°C.

Не окрашивается анилиновыми красителями, видна только в темнопольном микроскопе. Имеет около 200 сероваров, 19 серологических групп. Размножение происходит в болотистой местности.

*Эпидемиология*

Источники инфекции: грызуны (крысы, мыши), промысловые животные (сурки), домашние животные (крупный рогатый скот, собаки, свиньи, лошади). Смертность среди последних достигает 65—90 %.

*Пути передачи:* контактно-бытовой (через повреждённые слизистые и кожу), алиментарный (вода из природных источников). Человек от человека не заражается.

*Патогенез.*

Фаза заражения. Лептоспиры проникают через поврежденную кожу и слизистые в кровь, затем внедряются в печень, почки, селезёнку, надпочечники, где они усиленно размножаются. Эта фаза соответствует инкубационному периоду болезни.

Фаза генерализованной инфекции — повторная лептоспиремия с последующим поступлением в почки, печень, надпочечники, оболочки мозга. Паразитируют на поверхности клеток. Это начальный период болезни.

токсинемия — поражается эндотелий капилляров, повышается их проницаемость — возникает геморрагический синдром + поражение печени, почек, надпочечников — это период разгара болезни.

Формирование нестерильной стадии иммунитета — в крови появляются антитела — клинически угасание

процесса.

Фаза формирования стерильной стадии иммунитета — сочетание гуморального с местным органическим и тканевым иммунитетом. Клинически выздоровление

*Лечение*

Противолептоспирозный гамма-глобулин, лучше донорский, а не лошадиный.

Антибактериальная терапия (пенициллин, тетрациклин, аминогликозиды).

Дезинтоксикационная терапия (под контролем диуреза).

Симптоматическая терапия — гемостатические средства, коррекция кислотно-щелочного равновесия.

*Диагностика.*

Распознавание лептоспироза основано на тщательном анализе данных эпидемиологического анамнеза, правильной оценке результатов клинико-лабораторного обследования (циклическое течение болезни с признаками генерализации инфекции, печеночно-почечные нарушения, нейтрофильный лейкоцитоз и повышение СОЭ и др.).

Специфическая диагностика включает различные методы и серологические тесты.

В начальный период болезни лептоспиры могут быть выявлены в крови или иногда в цереброспинальной жидкости при исследовании методом «раздавленной капли» в темнопольном микроскопе или при посеве 0,2–0,5 мл крови на 5–10 мл питательной среды (фосфатно-сывороточная и другие среды) при температуре 30 °С, а также путем заражения лабораторных животных, в органах которых обнаруживают возбудителей при окраске нитратом серебра.

В период разгара болезни лептоспиры могут быть выделены из крови, цереброспинальной жидкости и мочи, в более поздние сроки — из мочи. В органах больных, умерших от лептоспироза, возбудителей находят наиболее часто в почках.

Для серологической диагностики применяют преимущественно реакцию микроагглютинации и лизиса (РМА), диагностические титры которой (1:100 и более) выявляются в парных сыворотках крови, взятой в период разгара и в более поздние сроки болезни (диагностический признак — нарастание титра в 4 раза и более). Могут использоваться РСК и РИГА.

## ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5

**ТЕМА:** *БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита).*

**Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики туберкулеза, эпидемического цереброспинального менингита.

## САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Микроскопировать микропрепараты: микобактерий туберкулеза, менингококков.
2. Изучить схему лабораторной диагностики туберкулеза.
3. Изучить схему лабораторной диагностики менингита.
4. Изучить метод микрокультивирования для экспресс-диагностики туберкулеза;
5. Микроскопировать и зарисовать демонстрационный препарат «микрокультура *Myc. Tuberculosis*».

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования:
  - Штатив – 8 шт.
  - 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 Цилю-Нельсону.
5. Готовые мазки из вакцины БЦЖ.
6. Демонстрация: микрокультуры по Прайсу.
7. Демонстрация: микропрепаратов менингококка и микобактерий туберкулеза.
8. Бак. препараты.
9. Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Микобактерии относятся к семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*.

Различают: 1) Микобактерии человеческого типа (*Mycobacterium tuberculosis*), 2) микобактерии бычьего типа (*Mycobacterium bovis*), 3) микобактерии птичьего типа (*Mycobacterium avium*), 4) атипичные микобактерии, которые делят на четыре группы (по Раньону):

- а) фотохромогенные бактерии, которые растут в темноте в течении 21-46 дней в виде беспигментных колоний, но после освещения дневным или электрическим светом приобретают желтую или оранжевую окраску. Патогенны для людей;
- б) скотохромогенные бактерии, которые растут медленно (60-100 дней), образуют желто-оранжевый пигмент в темноте. Некоторые из них патогенны: вызывают поражение лимфатических узлов и легких у детей;
- в) нефотохромогенные микобактерии, не образуют пигмента ни на свету, ни в темноте. Патогенны для человека;
- г) быстрорастущие микобактерии, растут в течении нескольких дней в виде беспигментных колоний. К этой группе относятся как потенциально патогенные микобактерии, так и сапрофиты.

Возбудитель туберкулеза: *Mycobacterium tuberculosis* представляет собой тонкие, слегка изогнутые палочки длиной 2,5-3,5 мкм, отличаются большим полиморфизмом: длинные, ветвистые и зернистые формы. *Mycobacterium bovis* – короткие, толстые палочки, *Mycobacterium avium* – нитевидные, ветвистые формы.

Для постановки микробиологического диагноза используют микроскопический, бактериологический, биологический, серологический и аллергический методы исследования. Для исследования может поступить самый разнообразный материал в зависимости от того, где расположен патологический процесс: при туберкулезе легких – мокрота, при туберкулезе почек – моча, при туберкулезном менингите – спинномозговая жидкость

### I. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

Исследуемый материал: мокрота, моча, спинномозговая жидкость. Для «обогащения» мокроты широко используются методы гомогенизации и флотации. При окраске мазков по Цилю-Нильсену туберкулезные палочки окрашиваются в ярко-красный цвет. Применение люминесцентной микроскопии повышает число находок туберкулезных палочек.

Микроскопическое исследование является ориентировочным и позволяет судить лишь о наличии кислотоустойчивых бактерий в материале без определения их видовой и типовой принадлежности.

### II. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

#### Особенности метода

Для освобождения от сопутствующей микрофлоры исследуемый материал обрабатывают 10% серной кислотой или 4-6% раствором едкого натрия, а затем центрифугируют. Кислоту нейтрализуют и материал заливают в несколько пробирок со средой Левенштейна-Йенсена или другими специальными средами.

Посевы инкубируют при 37° С 4-6 недель и более, так как туберкулезная палочка размножается очень медленно, особенно в первых генерациях. Колонии имеют вид сероватого или светло-кремового морщинистого или крошкообразного сухого налета.

При идентификации чаще всего определяют способность выделенной культуры синтезировать никотиновую кислоту – ниациновая проба Конно – с помощью которой удастся отличить *M.tuberculosis*, хорошо синтезирующие никотиновую кислоту, от палочек *M.bovis*, образующих ее в минимальных количествах. Атипичные микобактерии обладают высокой каталазной активностью. Пероксидазная активность у них не выявляется. Определение термостабильности каталазы позволяет отифференцировать вирулентные для человека микобактерии (человеческого и бычьего типов), у которых она термолабильна, от кислотоупорных сапрофитов и атипичных микобактерий, которые образуют термостабильную каталазу.

Для ускоренной диагностики туберкулеза используют метод микрокультур Прайса. Для этого на нескольких предметных стеклах делают толстые мазки из исследуемого материала. Мазки обрабатывают 2-6 % серной кислотой и нейтрализуют щелочью. После этого их помещают во флаконы с гемолизированной цитратной кровью. Через 7-14 дней материал окрашивают по Цилю-Нильсену и микроскопируют – вирулентные штаммы образуют микрокультуры, имеющие вид жгутов или кос (наличие корд-фактора).

### III.БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Применяется с целью выделения чистой культуры возбудителя туберкулеза из органов животного, зараженного исследуемым материалом, а также для определения вирулентности микобактерий. Исследуемый материал обрабатывают серной кислотой для освобождения от посторонней микрофлоры, нейтрализуют и вводят подкожно морской свинке и кролику с отрицательными туберкулиновыми реакциями. Через 4 месяца, если животное не погибнет, его забивают, проводят макро- и микроскопические исследование органов и делают посевы. *M.tuberculosis* высокопатогенны для морских свинок и мало патогенны для кроликов. *M.bovis* высокопатогенны для кроликов.

### IV. СЕРОДИАГНОСТИКА

Используют в качестве дополнительного текста РСК и РПГА. Положительные результаты отмечаются при активном туберкулезе, а также при инфицировании микобактериями туберкулеза и вакцинации.

V. КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА. Ставится с туберкулином (РРО) – очищенной белковой фракцией, полученной из микобактерий туберкулеза, для характеристики, оценки течения туберкулезного процесса, определения эффективности вакцинации и отбора контингентов для ревакцинации против туберкулеза. Туберкулин вводят внутрикожно в строго определенной дозировке (реакция Манту). Результат учитывают через 24-48 часов по образованию гиперемии и папулы

### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Вакцина БЦЖ. Живая, лиофильно высушенная культура апатогенного штамма микобактерий туберкулеза, полученная французскими учеными А. Кальметтом и М. Гереном. Применяется внутрикожно для активной специфической профилактики туберкулеза.

**Менингококки** (*Neisseria meningitidis*)- грамотрицательные диплококки бобовидной формы, жгутиков и спор не имеют, в организме образуют капсулу.

*Культуральные свойства.*

Очень требовательны к условиям культивирования. Растут на плотных и жидких питательных средах, содержащих 20-25% сыворотки (сывороточный агар, сывороточный бульон). На плотной среде образуют мелкие гладкие прозрачные колонии. Строгий температурный оптимум - 37° С (при других температурах менингококки погибают) необходимо создать как при культивировании, так и при транспортировке материала от больного в лабораторию.

Среди представителей рода *Neisseria* есть условно-патогенные виды, обитатели слизистых оболочек носоглотки – *N. sicca*, *N.mucosa* и др. У людей с ослабленной резистентностью они могут вызывать заболевания клинически сходные с менингококковой инфекцией.

*Антигенная структура.*

*N meningitidis* имеет родовые антигены общие для всех видов. Внутри вида по капсульным полисахаридным антигенам различают серогруппы *N meningitidis*-A,B,C,D,Y,Z и др.

Эпидемиологические вспышки чаще вызывают возбудители серогрупп A,B,C.

*Факторы патогенности менингококков:*

1.Пили – обеспечивают адгезию на клетках цилиндрического эпителия носоглотки.

2.Ig A- протеазы- расщепляют молекулы SIg A, снижая тем самым местную защиту слизистых оболочек носоглотки;

3.Капсула- защищает от фагоцитоза;

4.Ферменты патогенности: гиалуронидаза, нейроминидаза и др.

5.Эндотоксин (ЛПС клеточной стенки)- вызывает поражение кровеносных сосудов, что проявляется кровоизлияниями во внутренние органы и геморрагической сыпью на коже.

*Источником инфекции* являются больной человек, либо бактерионоситель. Чаще (в 70-80% случаев) болеют дети первых трех лет жизни.

*Пути заражения* – воздушно-капельный. Входные ворота инфекции – слизистая оболочка носоглотки. Менингококковая инфекция может протекать в нескольких клинических формах, которые разделяют на

локализованные и генерализованные.

**Основные клинические формы менингококковой инфекции  
и материал для микробиологического исследования**

| ФОРМЫ                        | ЗАБОЛЕВАНИЯ                                                           | МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ             |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Первично-локализованные      | менингококковое носительство                                          | мазок из носоглотки                   |
|                              | Острый назофарингит                                                   |                                       |
| Гематогенно-генерализованные | Менингококциемия                                                      | Мазок из носоглотки, кровь            |
|                              | Эпидемиологический<br>цереброспинальный менингит,<br>менингоэнцефалит | Мазок из носоглотки, кровь.<br>ликвор |

**Микробиологическая диагностика менингококковых инфекций.**

1. Бактериологический метод (основной) – выделение чистой культуры возбудителя на сыровороточных средах и определение его антибиотикочувствительности.
2. Бактериологический метод – использует как обязательный ориентировочный. В мазках из нативного материала с окраской по Грамму выделяется внутриклеточное расположение бактерий и характерная картина незавершенного фагоцитоза менингококков.

*Специфическая профилактика* менингококковой инфекции проводятся только по эпидемиологическим показаниям менингококковой полисахаридной вакциной серогрупп А и С.

**ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

**ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6**

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители дифтерии, коклюша, скарлатины).**

**Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики дифтерии, коклюша, скарлатины.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей дифтерии, коклюша, скарлатины.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики дифтерии, коклюша, скарлатины.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики дифтерии, коклюша, скарлатины.

**САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Приготовление мазка и окраска по методу Нейссера.

2. Приготовление мазка и окраска по методу Грама.
3. Определение токсигенности дифтерийных культур по Оухтерлони.
4. Проведение проб на цистиназу и на уреазу дифтерийных и ложно-дифтерийных палочек.

## 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.  
Иммерсионное масло
3. Набор красок по Граму – 8шт.
4. Набор красок по Нейссеру – 8шт.
5. Пробирки с дифтиридом – 8шт.
6. Демонстрация: токсигенности дифтерийных культур по Оухтерлони.
7. Демонстрация: микропрепарата возбудителя дифтерии, коклюша, стрептококка.
8. Демонстрация: среды Ру, кровяной-теллуритовый агар, КУА.
9. Демонстрация: проба Пизу, проба Закса.
10. Бак. препараты.
11. Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Дифтерийная палочка** (*Corynebacterium diphtheriae*) — грамположительные палочковидные бактерии рода *Corynebacterium*. Впервые возбудитель был обнаружен на срезах пленок, полученных из ротоглотки больных в 1883 г. Эдвином Клебсом (нем. Edwin Klebs, 1834—1913). Через год Фридрихом Лёффлером (нем. Friedrich August Johannes Löffler, 1852—1915) была выделена чистая культура. Дифтерийный токсин получили Э. Ру и А. Иерсен (1884—1888 гг.). Анатоксин обнаружил Рамон Гастон в 1923 г. и предложил использовать его для активной иммунизации. *Corynebacterium diphtheriae* — крупные (1—8 × 0,3—0,8 мкм) прямые, слегка изогнутые полиморфные палочковидные бактерии. На полюсах клеток локализуются метакрохроматические зёрна волютина, придавая клеткам характерную форму «булавы». Зёрна волютина окрашиваются метиленовым синим по Нейссеру. На микропрепаратах располагаются одиночно или вследствие особенностей деления клеток располагаются в форме латинской буквы V или Y. Спор и капсул не образуют.

**Эпидемиология.** Источником инфекции при дифтерии являются люди - больные или здоровые носители токсигенных дифтерийных микробов. Наибольшую эпидемическую опасность представляют больные дифтерией зева, носа и гортани, активно выделяющие возбудителей заболевания во внешнюю среду с выдыхаемым воздухом. Незначительное в этом отношении значение играют больные дифтерией глаз, кожи, раны и других локализаций, способные распространять инфекцию контактным путем (через руки, предметы быта).

**Патогенез.** Входными воротами возбудителей дифтерии могут быть практически все области покровов (кожи и слизистых) макроорганизма. Однако наиболее часто ими является слизистая оболочка ротоглотки, намного реже - гортани, носа, конъюнктив, половых органов, раневая поверхность, кожа и др. Токсигенные коринебактерии фиксируются на клетках тканей, размножаются и в процессе жизнедеятельности продуцируют экзотоксин, оказывающий местное и общее воздействие, обуславливающее практически все проявления патологического процесса. Микробные клетки за пределы тканей, являющихся воротами инфекции, как правило, не распространяются и непосредственного участия в поражении макроорганизма не принимают.

Дифтерийный экзотоксин состоит из нескольких фракций, каждая из которых обладает самостоятельным биологическим действием. Одна из них - гиалуронидаза: разрушает гиалуроновую кислоту капилляр и повышает их проницаемость. Это ведет к выходу за пределы сосудов жидкой части крови, пропитыванию пораженных тканей плазмой, содержащей наряду с другими компонентами фибриноген. Вторая - некротоксин - вызывает некроз эпителия на месте ворот инфекции, сопровождающийся выделением из эпителиальных клеток тромбодиназы. Последняя способствует превращению фибриногена в фибрин и образованию на поверхности пораженных тканей фибриновой пленки. Небные миндалины, в отличие от других органов, покрыты многослойным эпителием. В результате образующаяся при дифтерии фибриновая пленка проникает глубоко внутрь эпителиального покрова и плотно спаяна с тканями. Третья фракция дифтерийного токсина - истинный дифтерийный токсин (основной его компонент) способен вытеснять из клеточных структур цитохром Б и таким образом блокировать в них процессы клеточного дыхания и синтеза белковых молекул. Наиболее чувствительными к этим изменениям являются миокард, капилляры и нервные клетки. В кардиомиоцитах развиваются явления миокардиодистрофии с последующим их некрозом, миолизом и

развитием инфекционно-токсического миокардита. Поражение капилляров при дифтерии сопровождается инфекционно-токсическим шоком. Повреждение нервных клеток сопровождается дистрофическими изменениями шванновских клеток и демиелинизацией нервных волокон. Наряду с отмеченным, общее действие дифтерийного токсина проявляется явлениями общей интоксикации.

*Основу лабораторной диагностики* составляют бактериологические исследования: выделение возбудителя из очага воспаления, определение его типа и токсигенности. Материал отбирают стерильными ватными тампонами, сухими или смоченными (до стерилизации!) 5% раствором глицерина. При хранении и транспортировке тампоны предохраняют от охлаждения и высыхания. Материал должен быть посеян не позднее 2-4 ч после взятия. У больных ангиной, бывших в контакте с больными дифтерией, а также у лиц с типичными клиническими проявлениями дифтерии диагноз ставят даже при отрицательном результате бактериологического исследования.

Вспомогательное значение имеет определение титров анитоксических антител в парных сыворотках при постановке РНГА. Токсинообразование выявляют, используя РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом. Для выявления дифтерийного токсина предложено использовать ПЦР.

*Основным в лечении* дифтерии считают введение анитоксической противодифтерийной сыворотки. Она нейтрализует токсин, циркулирующий в крови, следовательно, оказывает наибольший эффект при раннем применении

*Профилактические мероприятия.* Вакцинопрофилактика остаётся основным способом контроля дифтерии. Схема иммунизации детей предусматривает иммунизацию вакциной АКДС начиная с 3 мес жизни (вакцинируют 3-кратно с интервалом 30-40 дней). Ревакцинацию проводят через 9-12 мес после законченной вакцинации. Для ревакцинации в 6-7, 11-12 и 16-17 лет применяют АДС-М. В отдельных случаях, например при противопоказаниях к коклюшному компоненту АКДС, АДС-М применяют и для вакцинации.

**Коклюш** (whooping-cough - англ.; Keuchhusten - нем; Coqueluche - франц.) и паракоклюш - острые инфекционные болезни, клинически неотличимые друг от друга. Характеризуется острым катаром дыхательных путей и приступами спазматического кашля.

Возбудитель коклюша (*Bordetella pertussis*) представляет собой короткую палочку с закругленными концами (0,2-1,2 мкм), грамотрицательную, неподвижную, хорошо окрашивающуюся анилиновыми красками. В антигенном отношении неоднородна. Антиген, который обуславливает образование агглютининов (агглютиноген), состоит из нескольких компонентов. Они названы факторами и обозначаются цифрами от 1 до 14. Фактор 7 является родовым, фактор 1 содержит *B. pertussis*, 14 - *B. parapertussis*, остальные встречаются в разных комбинациях; для возбудителя коклюша это факторы 2, 3, 4, 5, 6, для паракоклюша - 8, 9, 10. Реакция агглютинации с адсорбированными факторными сыворотками позволяет дифференцировать виды бордетелл и определять их антигенные варианты. Возбудители коклюша и паракоклюша очень неустойчивы во внешней среде, поэтому посев нужно делать сразу же после взятия материала. Бактерии быстро погибают при высушивании, ультрафиолетовом облучении, под влиянием дезинфицирующих средств. Чувствительны к эритромицину, левомицетину, антибиотикам тетрациклиновой группы, стрептомицину.

*Патогенез.* Ворота инфекции является слизистая оболочка респираторного тракта. Коклюшные микробы прикрепляются к клеткам мерцательного эпителия, где они размножаются на поверхности слизистой оболочки, не проникая в кровоток. На месте внедрения возбудителя развивается воспалительный процесс, угнетается деятельность ресничного аппарата клеток эпителия и увеличивается секреция слизи. В дальнейшем происходит изъязвление эпителия дыхательных путей и очаговый некроз. Патологический процесс наиболее выражен в бронхах и бронхиолах, менее выраженные изменения развиваются в трахее, гортани и носоглотке. Слизистогнойные пробочки закупоривают просвет мелких бронхов, развивается очаговый ателектаз, эмфизема. Наблюдается перибронхиальная инфильтрация. В генезе судорожных приступов имеет значение сенсibilизация организма к токсинам коклюшной палочки. Постоянное раздражение рецепторов дыхательных путей обуславливает кашель и приводит к формированию в дыхательном центре очага возбуждения типа доминанты. Вследствие этого типичные приступы спазматического кашля могут быть вызваны и неспецифическими раздражителями. Из доминантного очага возбуждение может иррадиировать и на другие отделы нервной системы, например на сосудодвигательный (повышение АД, спазм сосудов). Иррадиацией возбуждения объясняется также появление судорожных сокращений мышц лица и туловища, рвоты и других симптомов коклюша. Перенесенный коклюш (как и противококлюшные прививки) не обеспечивает напряженного пожизненного иммунитета, поэтому возможны повторные заболевания коклюшем (около 5% случаев коклюша приходится на взрослых людей).

*Достоверный диагноз* в катаральном периоде может быть поставлен после получения результатов бактериологических исследований. Основанием для исследования в этих случаях обычно служат эпидемиологические данные (контакт с больными коклюшем, отсутствие данных о прививках и др.). В периоде спазматического кашля диагноз коклюша поставить значительно легче, так как появляются типичные приступы. Однако нужно учитывать, что иногда приступы кашля, сходные с коклюшными, могут быть обусловлены другими причинами (аденовирусная инфекция, вирусные пневмонии, сдавление дыхательных путей при злокачественных новообразованиях, инфекционном мононуклеозе и др.), с другой стороны, коклюш может протекать атипично без характерных приступов (у привитых детей, у взрослых). Основным методом лабораторного подтверждения диагноза является выделение возбудителя коклюша. Частота выделения зависит от сроков взятия материала; на 1-й неделе заболевания положительные результаты удается получить у 95%

больных, на 4-й - лишь у 50%, а начиная с 5-й недели, микроб выделить уже не удастся. Материал из носоглотки берут сухим тампоном с немедленным посевом на чашки с селективной питательной средой. Используют также метод "кашлевых пластинок", при котором чашка Петри с питательной средой устанавливается перед ртом кашляющего ребенка (на расстоянии около 10 см), удерживается в таком положении несколько секунд, чтобы уловить 5-6 кашлевых толчков. Чашку с посевом быстро закрывают крышкой и помещают в термостат. При транспортировке оберегают от охлаждения (заворачивают в бумагу, вату, в контейнер помещают грелку, заполненную горячей водой). Однако по частоте выделения возбудителей коклюша метод "кашлевых пластинок" значительно уступает взятию материала тампоном. Серологические методы можно использовать для ретроспективной диагностики, а также у больных с отрицательными результатами бактериологических исследований. Из старых методов можно использовать РСК, РПГА, реакцию агглютинации. Диагностическим считается нарастание титров антител в 4 раза и более, а также высокие титры антител (1:80 и выше).

В последнее время успешно используют иммуноферментный метод для обнаружения антител в сыворотке (иммуноглобулины класса М) и в носоглоточной слизи (иммуноглобулины класса А). Эти антитела появляются со 2-3-й недели болезни и сохраняются в течение 3 мес.

**Скарлатина** - острое инфекционное заболевание, проявляющееся мелкоточечной сыпью, лихорадкой, общей интоксикацией, ангиной. Возбудитель болезни – стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*). Заражение происходит от больных воздушно-капельным путем (при кашле, чихании, разговоре), а также через предметы обихода (посуда, игрушки, белье). Особенно опасны больные как источники инфекции в первые дни болезни.

Источниками возбудителя инфекции являются больной скарлатиной или любой другой клинической формой стрептококковой инфекции и бактерионоситель. Чаще болеют дети 3—10 лет, посещающие детские дошкольные учреждения и школу. Появлению случаев скарлатины в детских учреждениях, как правило, предшествует повышенный уровень заболеваемости ангинами и острыми респираторными вирусными инфекциями. Дети первого года жизни (особенно первого полугодия) и взрослые скарлатиной болеют редко. Основной путь передачи возбудителя инфекции — воздушно-капельный.

#### *Патогенез*

Возбудитель проникает в организм человека через слизистые оболочки зева и носоглотки, в редких случаях возможно заражение через слизистые оболочки половых органов или поврежденную кожу. В месте адгезии бактерий формируется местный воспалительно-некротический очаг. Развитие инфекционно-токсического синдрома обусловлено в первую очередь поступлением в кровоток эритрогенного токсина стрептококков (токсина Дика), а также действием пептидогликана клеточной стенки. Токсинемия приводит к генерализованному расширению мелких сосудов во всех органах, в том числе в кожных покровах и слизистых оболочках, и появлению характерной сыпи. Синтез и накопление антитоксических антител в динамике инфекционного процесса, связывание ими токсинов в последующем обуславливают уменьшение и ликвидацию проявлений токсикоза и постепенное исчезновение сыпи. Одновременно развиваются умеренные явления периваскулярной инфильтрации и отека дермы. Эпидермис пропитывается экссудатом, его клетки подвергаются ороговению, что в дальнейшем приводит к шелушению кожи после угасания скарлатинозной сыпи. Сохранение прочной связи между ороговевшими клетками в толстых слоях эпидермиса на ладонях и подошвах объясняет крупнопластинчатый характер шелушения в этих местах.

Компоненты клеточной стенки стрептококка (групповой А-полисахарид, пептидогликан, белок М) и внеклеточные продукты (стрептолизины, гиалуронидаза, ДНК-аза и др.) обуславливают развитие реакций гиперчувствительности замедленного типа, аутоиммунных реакций, формирование и фиксацию иммунных комплексов, нарушения системы гемостаза. Во многих случаях их можно считать причиной развития гломерулонефрита, артериитов, эндокардитов и других осложнений иммунопатологического характера.

Из лимфатических образований слизистой оболочки ротоглотки возбудители по лимфатическим сосудам попадают в регионарные лимфатические узлы, где происходит их накопление, сопровождающееся развитием воспалительных реакций с очагами некроза и лейкоцитарной инфильтрации. Последующая бактериемия в некоторых случаях может привести к проникновению микроорганизмов в различные органы и системы, формированию гнойно-некротических процессов в них (гнойного лимфаденита, отита, поражений костной ткани височной области, твердой мозговой оболочки, височных синусов и т.д.).

Скарлатину следует отличать от кори, краснухи, псевдотуберкулеза, лекарственных дерматитов. В редких случаях развития фибринозных налетов и особенно при их выходе за пределы миндалин заболевание необходимо дифференцировать от дифтерии.

Скарлатину отличают яркая разлитая гиперемия ротоглотки («пылающий зев»), резко ограниченная в месте перехода слизистой оболочки на твердое небо, ярко-красный язык с малиновым оттенком и гипертрофированными сосочками («малиновый язык»), мелкоточечные элементы сыпи на общем гиперемизованном фоне, сгущение сыпи в виде темно-красных полос на кожных складках в местах естественных сгибов, отчетливо выраженный белый дермографизм, бледный носогубный треугольник (симптом Филатова). При надавливании на кожу ладонью сыпь в этом месте временно исчезает («симптом ладони»), положительны эндотелиальные симптомы. После исчезновения экзантемы отмечают мелкочешуйчатое шелушение кожи (на ладонях и подошвах крупнопластинчатое).

#### *Лабораторная диагностика*

Диагноз скарлатины основывается на клинических (острое начало заболевания, лихорадка,

интоксикация, острый катаральный или катарально-гнойный (при септической форме болезни - некротический), тонзиллит, обильная точечная сыпь, сгущающаяся в естественных складках кожи и лабораторных (нейтрофильный лейкоцитоз, повышенная СОЭ, обильный рост бетагемолитических стрептококков при посеве материала из очага инфекции на кровяной агар, нарастание титров антител к стрептококковым антигенам - М-протеину, А-полисахариду, стрептолизину-О и другим) данных.

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7

**ТЕМА:** *БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ*  
(возбудитель сибирской язвы).  
*БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ*  
(столбняка, газовой гангрены).

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сибирской язвы.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителя сибирской язвы.
2. Таксономия и основные биологические свойства возбудителя столбняка, газовой гангрены.
3. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемого заболевания.
4. Принципы микробиологической диагностики сибирской язвы.
5. Принципы микробиологической диагностики столбняка, газовой гангрены.
6. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Постановка реакции термокольцепреципитации по Асколи.
2. Учет реакции РП по Асколи и сделать заключение.
3. Демонстрационный мазок из автоклавированного гноя карбункула от больного сибирской язвой. Окраска по Граму.
4. Демонстрация микропрепаратов возбудителей газовой гангрены, столбняка.

### 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 антракоидом – 8 шт.
6. Постановка реакции Асколи:
  - А) Пробирка с иммунной сывороткой – 4 шт.
  - Б) Пробирка с нормальной сывороткой – 4 шт.
  - В) Пастеровские пипетки – 4 шт.
  - Г) Преципитиноген – 4 шт.
7. Демонстрация: микропрепаратов возбудителей сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены.
8. Бак. препараты.
9. Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Сибиреязвенные бациллы** – очень крупные (6-10 мкм) грамположительные палочки с обрубленными концами, в мазке из чистой культуры располагаются короткими цепочками (стрептобациллы). Неподвижны, образуют расположенные центрально споры, а также капсулы.

**Культуральные свойства:** Сибиреязвенные бациллы – аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах, при температуре 12-45 °С. На жидких средах дают придонный рост в виде комочка ваты; на плотных средах образуют крупные, с неровными краями, шероховатые матовые колонии под лупой колонии напоминают гриву льва или голову медузы. На средах, содержащих 0,05- 0,5 ЕД/мл пенициллина, через 3-6 ч роста сибиреязвенные бациллы образуют сферопласты, расположенные цепочкой и напоминающие в мазке жемчужное ожерелье.

**Биохимические свойства:** Ферментирует до кислоты глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, инулин; обладают протеолитической и липолитической активностью. Выделяет желатиназу, проявляют низкую гемолитическую, лецитиназную и фосфатазную активность.

**Антигены и факторы патогенности:** Содержат родовой соматический полисахаридный и видовой белковый капсульный антигены. Образуют белковый экзотоксин, обладающий антигенными свойствами и состоящий из нескольких компонентов (летальный, протективный и вызывающий отеки). Патогенен для человека и многих животных.

**Резистентность:** Вегетативная форма неустойчива к факторам окружающей среды, однако споры чрезвычайно устойчивы и сохраняются в окружающей среде десятки лет, выдерживают кипячение и автоклавирование. Сибиреязвенные бациллы чувствительны к пенициллину и другим антибиотикам; споры устойчивы к антисептикам и дезинфектантам. Спороцидным эффектом обладают активированные растворы хлорамина, горячего формальдегида, перекиси водорода.

**Эпидемиология и патогенез:** Источник инфекции - больные животные. Чаще крупный рогатый скот: овцы, козы, лошади, олени, буйволы, верблюды, свиньи. Человек является биологическим тупиком. Для сибирской язвы характерно множественность механизмов, путей и факторов передачи. Человек заражается в основном контактным путем, реже алиментарно, аэрогенно и др. при уходе за больными животными, убойе, переработке животного сырья, употреблении мяса и других животноводческих продуктов. Восприимчивость к возбудителю относительно невысокая.

Входными воротами инфекции в большинстве случаев являются поврежденная кожа, значительно реже слизистые оболочки дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. В основе патогенеза лежит действие экзотоксина возбудителя, отдельные фракции которого вызывают коагуляцию белков, отек тканей, приводят к развитию инфекционно-токсического шока.

**Клиническая картина:** Различают кожную, легочную и кишечную формы сибирской язвы. При кожной форме на месте внедрения возбудителя появляется характерный сибиреязвенный карбункул (геморрагически-некротическое воспаление глубоких слоев кожи с некрозом кожи и образованием буро-черной корки), эта форма сопровождается отеком. Легочная и кишечная формы относятся к генерализованным формам и выражаются геморрагическим и некротическим поражением соответствующих органов.

Продолжительность инкубационного периода - от нескольких часов до 8 дней, в среднем 2-3 дня. Генерализованные формы в 100% случаев заканчиваются летально.

**Микробиологическая диагностика:** Материалом для исследования служат содержимое карбункула, мокрота, кал, кровь, моча. Микробиологическую диагностику проводят с соблюдением правил техники безопасности, как при особо опасных инфекциях. Для диагностики применяют все 5 методов микробиологической диагностики. Мазки окрашивают по Граму, а для обнаружения капсул - по Рамановскому-Гимзе, спор - по Ожешке. Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают на мясопептонный агар и мясопептонный бульон, а также заражают лабораторных животных (белых мышей, морских свинок). Выделенную чистую культуру идентифицируют по общепринятой схеме с учетом морфологии, характера роста на МПА и МПБ, биохимических и культуральных свойств. Сибиреязвенные антигены определяют в РИФ и реакции термореципитации по Асколи исследуют также трупы животных, кожу и изделия из нее, шкурки, меха, шерсть и прочие изделия из животного сырья.

**Лечение:** Применяют антибиотики и сибиреязвенные иммуноглобулины.

**Профилактика:** Для специфической профилактики используют живую сибиреязвенную вакцину СТИ (санитарно-технический институт). Для экстренной профилактики назначают сибиреязвенный иммуноглобулин.

**Гангрена газовая** (или **анаэробная гангрена, мионекроз**) — инфекция, которая обусловлена ростом и размножением клостридиальной микрофлоры в тканях организма. Рост этой микрофлоры возможен **только** при отсутствии кислорода (анаэробно), однако споры могут длительное время сохраняться на воздухе.

*Этиология и патогенез.*

Заболевание вызывается преимущественно бактериями рода клостридий, которые обитают в почве и уличной пыли. Раны, загрязненные землей, имеющие раневые карманы и участки омертвевшей ткани, а также плохо кровоснабжаемые ткани и не подвергшиеся первичной хирургической обработке, предрасположены к газовой гангрене. Возбудитель быстро приобретает способность к заражению, выделяя газообразующие и растворяющие ткани экзотоксины, которые способствуют быстрому распространению инфекции.

Основные возбудители:

- Clostridium perfringens (90 % случаев)
- Clostridium septicum
- Clostridium histolyticum
- Clostridium novii
- Clostridium fallax
- Clostridium bifermentans
- Clostridium sordellii
- Поскольку возбудители заболевания выделяют гемолизины, течение газовой гангрены может осложниться возникновением гемолитической анемии и почечной недостаточности.

**Диагностика и дифференциальная диагностика**

- Диагноз ставится на основании характерной раны, общей интоксикации. Диагноз подтверждается рентгенологически (определяется «пористость» мышечных тканей) и микроскопически (обнаружение клостридий в раневом отделяемом). Дифференциальный диагноз проводят с фасциальной газообразующей флегмоной (нет поражения мышц) и путридной (гнилостной) инфекцией.

**Лечение и профилактика**

- «Лампасные» разрезы кожи, мышц, оболочек с иссечением омертвевших тканей и подозрительных на некроз участков. Налаживание оттока гноя из раны с промыванием раствором перекиси водорода и антибиотиков; рану оставляют открытой. Абсолютный покой конечности. Пенициллин до 20—40 млн ЕД в сутки (2—3 раза в день внутривенно) в течение 10—14 дней, тетрацилин. Противогангренозная сыворотка и анатоксин неэффективны как при лечении, так и при проведении профилактики газовой гангрены. При быстром нарастании интоксикации — гильотинная ампутация конечности. Эффективно воздействие кислорода под давлением, однако не исключено хирургическое удаление очага инфекции из раны, показаниями к которому являются клинические и рентгенологические признаки газовой гангрены с микроскопически доказанным наличием клостридий в ране.
- Профилактика заключается в своевременной квалифицированной первичной хирургической обработке всех загрязненных ран.
- **Столбняк** (лат. *Tetanus*) — зооантропонозное бактериальное острое инфекционное заболевание с контактным механизмом передачи возбудителя, характеризующееся поражением нервной системы и проявляющееся тоническим напряжением скелетной мускулатуры и генерализованными судорогами.
- Болеть могут все теплокровные животные, включая человека.
- Больной не заразен для окружающих. Эпидемиологических мероприятий в очаге болезни не проводят. Иммунитет после болезни не развивается. Выздоровление после клинической формы столбнячной инфекции не обеспечивает защиты от нового заболевания. Небольшое количество столбнячного токсина, достаточное для развития заболевания, не обеспечивает продукцию необходимых титров антител. Поэтому все больные с клиническими формами столбняка должны быть обязательно иммунизированы столбнячным анатоксином — сразу же после постановки диагноза или после выздоровления.
- Возбудитель столбняка — грамположительная палочка, являющаяся спорообразующим облигатным анаэробом, то есть живущая в бескислородной среде. Это подвижная крупная тонкая палочка с закругленными концами длиной 4—8 мкм и шириной 0,3—0,8 мкм, имеющая до 20 длинных жгутиков.
- Возбудитель столбняка относится к категории убиквитарных (вездесущих), но вместе с тем условно-патогенных микроорганизмов. Является обычным обитателем кишечника человека и животных, где он живёт и размножается, не причиняя вреда носителю.
- Поэтому наибольшая обсеменённость столбнячной палочкой наблюдается в сельскохозяйственных районах с достаточной влажностью, где палочка обнаруживается в почвах садов, огородов, пастбищ и других местах, где присутствует загрязненность фекалиями человека и животных.
- В присутствии кислорода и температуре не ниже 4 °C образует споры. Споры устойчивы к внешнему воздействию: выдерживают нагревание до 90 °C в течение 2 часов, при кипячении погибают только

через 1—3 часа, в сухом состоянии переносят нагревание до 150 °С, в соленой морской воде живут до 6 месяцев. В испражнениях, почве, на различных предметах сохраняются больше 10 лет.

- При отсутствии кислорода, температуре 37 °С и достаточной влажности споры прорастают в малоустойчивую вегетативную форму.
- Возбудитель образует **столбнячный экзотоксин** — один из сильнейших бактериальных ядов, уступающий по силе лишь ботулиническому токсину. Токсин разрушается при нагревании, воздействии солнечного света, щелочной среды. Не всасывается через слизистую оболочку кишечника, в связи с чем безопасен при проглатывании.

*Профилактика заболевания осуществляется в трех направлениях:*

1. Профилактика травм и санитарно-просветительская работа среди населения.
2. Специфическая профилактика в плановом порядке путем введения противостолбнячной вакцины всем детям от 3 месяцев до 17 лет по календарю прививок. Взрослым каждые 10 лет проводится ревакцинация.
3. Экстренная профилактика применяется как привитым, так и непривитым людям при:
  1. ранениях и травмах при нарушении целостности кожных покровов и слизистых оболочек.
  2. ранениях и операциях желудочно-кишечного тракта.
  3. ожогах и обморожениях II—IV степени.
  4. родах и абортах вне медицинских учреждений.
  5. гангрене или некрозе тканей, длительно текущих абсцессах, карбункулах, язвах, пролежнях.
  6. укусах животных.

### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(возбудители инфекций, передающихся половым путем:  
сифилиса, гонореи, уrogenитального хламидиоза).

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сифилиса, гонореи, уrogenитального хламидиоза.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей сифилиса, гонореи, уrogenитального хламидиоза.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики сифилиса, гонореи, уrogenитального хламидиоза.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сифилиса, гонореи, уrogenитального хламидиоза.

#### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

1. Постановка реакции связывания комплемента Вассермана.
2. Окраска готовых мазков из исследуемого материала больного хламидиозом по Романовскому - Гимзе.
3. Окраска готовых мазков из исследуемого материала больного гонореей по Граму.

### 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 – 8шт.
- 5.Набор красок по Романовскому -Гимзе – 8шт.
- 6.Готовые мазки из исследуемого материала больного хламидиозом.
- 7.Готовые мазки из исследуемого материала больного гонореей.
- 8.Демонстрация: РСК при сифилисе.
- 9.Демонстрация: РИФ при хламидиозе.
- 10.Демонстрация: микропрепараты спирохет, хламидий, гонококков.
- 11.Бак. препараты.
- 12.Таблицы.

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Сифилис** — хроническое системное венерическое инфекционное заболевание с поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы с последовательной сменой стадий болезни, вызываемое бактериями вида *Treponema pallidum* (бледная трепонема) подвида *pallidum*, относящимся к роду трепонема (*Treponema*) семейства *Spirochaetaceae*.

**Этиология.** Сифилис передаётся в основном половым путём, в связи с чем относится к группе венерических заболеваний, или ИППП (инфекций, передаваемых половым путём). Однако возможна передача сифилиса и через кровь, например, при переливании крови заражённого сифилисом донора, или у инъекционных наркоманов при пользовании общими шприцами и/или общими ёмкостями для растворов наркотиков, или в быту при пользовании общим «кровавым» инструментом типа зубных щёток или бритв.

Бытовой «бескровный» путь заражения сифилисом также не исключён, но весьма редок и требует тесного контакта с больным третичным сифилисом, имеющим открытые сифилитические язвы или распадающиеся сифилитические гуммы, из которых возбудитель может попасть, например, на посуду, из которой пил больной. Также можно перечислить полотенца, ложки, зубные щетки, белье и пр. соприкасающиеся со слизистыми оболочками предметы. Способность мочи и пота больного передавать инфекцию не доказана, в слюне бледные трепонемы обнаруживаются только при наличии высыпаний в полости рта. Возможно, заражение ребёнка молоком матери даже при отсутствии видимых изменений в области молочной железы, также заразной является сперма, даже при отсутствии видимых патологических очагов на половом члене больного. Медицинский персонал может заразиться заболеванием при осуществлении лечебно-диагностических мероприятий, а также при вскрытии трупов больных сифилисом, особенно опасны трупы детей с первично врождённой формой заболевания.

**Патогенез.** Инкубационный период первичной стадии сифилиса составляет в среднем 3 недели (интервал от нескольких суток до 6 недель) с момента заражения. По окончании инкубационного периода в случае полового или бытового заражения в месте проникновения микроба обычно развивается первичный аффик.

Патогенез сифилиса обусловлен реакцией организма на внедрение в организм больного бледной трепонемы. Особенности возбудителя обуславливаются полиморфностью протекающих в заражённом организме процессов, в зависимости от стадии заболевания патологические изменения отличаются довольно значительно.

В классическом течении сифилитической инфекции принято выделять 4 периода:

- Инкубационный;
- Первичный;
- Вторичный;
- Третичный.

Последние три периода обнаруживаются характерной симптоматикой, инкубационный период никак себя не проявляет, и его сроки определяются лишь косвенно после появления клиники.

**Диагностика.** Диагноз сифилиса в ряде случаев можно заподозрить клинически, но основным методом диагностики и подтверждения предварительного диагноза является серодиагностика. В настоящее время для определения антител к возбудителю используется ИФА, ранее в России для этого применялась реакция Вассермана. Все методы диагностики сифилиса разделяются на следующие группы:

- Прямые и непрямые (косвенные)
- Трепонемные (специфические) и нетрепонемные (неспецифические)
- Отборочные (скрининговые) и подтверждающие (диагностические)

- Приборные, бесприборные.

Прямые трепонемные методы диагностики позволяют обнаружить возбудитель непосредственно в биоматериале. Такими методами являются темнопольная микроскопия, заражение сифилисом кроликов, культуральные методы, ПЦР диагностика.

Каждый из этих методов имеет свои специфические недостатки, которые ограничивают его массовое применение. Метод темнопольной микроскопии может обнаружить возбудитель только при свежем сифилисе, и с его помощью невозможно оценить динамику и эффективность лечения. Методика заражения сифилисом кроликов является дорогостоящей и медленной, и также не позволяет в динамике оценивать состояние больного. Выращивание бледной трепонемы на искусственных средах крайне затруднительно, в связи с чувствительностью возбудителя к условиям среды. Метод ПЦР диагностики позволяет эффективно обнаруживать возбудитель только при первичном и вторичном сифилисе, тест-системы относительно дороги, и исследования эффективности данного метода в диагностике сифилиса ещё продолжаются. Таким образом, мы видим, что методы прямой диагностики мало применимы в клинической практике, в связи с чем, основой диагностики являются различные серологические методики (непрямые).

В соответствии с действующим приказом МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» при серо- и ликвородиагностике сифилиса допускается использование следующих реакций.

- Микрореакции преципитации (непрямой скрининговый метод)
- Реакции пассивной непрямой агглютинации (РПГА)
- Реакции иммунофлуоресценции (РИФ)
- Реакции иммобилизации бледных трепонем (РИБТ)
- Иммуноферментный анализ не требует отдельной регламентации в связи с чем, в приказе № 87 не указаны.

Следует отметить, что ни один из методов диагностики не гарантирует 100 % обнаружения возбудителя. Чувствительность методов составляет 90-98 %, поэтому одновременное использование 2 различных методов исследования может с очень высокой степенью достоверности установить верный диагноз.

**Гонококки-** (*N. Gonorrhoeae*) – грамотрицательные диплококки бобовидной формы, образуют капсулу в организме, жгутиков и спор не имеют.

*Культуральные свойства.* Требуемы к питательным средам и температурный оптимум – 37 °С. Требуют свежеприготовленные влажные питательные среды с добавлением нативных белков крови, сыворотки или асцитной жидкости. Не вызывают гемолиза на средах, содержащих кровь, на средах содержащих с добавлением молока, желатина и картофеля не растут.

Для гонококков характерна выраженная антигенная изменчивость даже в пределах одного штамма.

*Биохимические свойства:* разлагают только глюкозу с образованием кислоты. Протеолитическая активность отсутствует, аммиака, сероводорода и индола не образуют.

*Факторы патогенности гонококков:*

1. Пили - обеспечивают адгезию к клеткам цилиндрического эпителия мочеполювых путей;
2. Капсула - в свежевыделенных культурах обладает антифагоцитарным действием;
3. Клеточная стенка содержит эндотоксин.
4. Поверхностный белок 1 класса обуславливает к бактерицидным факторам;
5. Поверхностный белок 2 класса образует отдельную белковую фракцию называемые протеинами мутности или Ора – протеинами (мутность). Их считают первыми факторами вирулентности гонококков, и они обуславливают прикрепление к эпителию.
6. R- плазмиды факторы множественной лекарственной устойчивости.

Для диагностики применяют:

*Различают такие разновидности диагностики гонореи:*

1. Бактериоскопический.  
Данный метод диагностики проводят у больных (женщин и мужчин), имеющих выраженную симптоматику подострой или острой форм гонореи. Перед проведением анализа для увеличения степени его достоверности необходимо, чтобы пациент не занимался самолечением антибиотиками и не оказывал местного воздействия дезинфицирующими растворами на влагалище и уретру.
2. Бактериологический.  
Данный диагностический метод применяется у пациентов, имеющих выраженную симптоматику в комбинации с наличием подозрения на гонококк при бактериоскопии. Бактериологический анализ на гонорею можно применять как диагностический критерий излеченности от заболевания, его можно проводить через неделю после окончания курса антибиотикотерапии и местного лечения (дезинфицирующими растворами). Бактериологический метод предусматривает посев генитальных выделений на питательную среду с целью выявления их микрофлоры, при этом используются специально подготовленные питательные среды. Лабораторным материалом могут являться: выделения из шейки матки, мочеиспускательного канала, влагалища, а также прямой кишки и глотки. Проведение точной диагностики гонореи возможно при минимальном количестве имеющихся

выделений. Точность метода достигает 95 - 100% (достаточно высокий уровень точности метода), однако, он имеет недостаток – процесс исследования длительный и занимает около недели.

3. Серологический метод диагностики.

Данный анализ носит название реакции Борде-Жангу, его проводят в случае хронической гонореи, когда бактериологический анализ является отрицательным. Серологический метод выявления гонореи является вспомогательным.

4. Иммунофлюоресцентный анализ (ПИФ).

С помощью данного диагностического метода можно выявить гонококк в ранние сроки заболевания, это имеет важное значение в случаях, когда присутствует комбинация гонококка и других микроорганизмов, например бледной трепонемы (гонорея сочетается с сифилисом).

5. Иммуноферментный анализ.

Позволяет определить наличие в выделениях устойчивых L-форм гонококка либо наоборот, нежизнеспособных штаммов.

6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР является анализом ДНК на гонорею – это метод генетической идентификации гонококка. Данный метод обладает самой высокой чувствительностью и специфичностью, диагностика гонореи данным методом достигает 98 % у мужчин и 89 % у женщин. Результаты диагностики при помощи ПЦР готовы уже через 1 – 2 дня. Однако данный метод является достаточно дорогостоящим и не все пациенты могут себе его позволить.

Причиной **урогенитальных хламидиозов** являются хламидии - граммотрицательные бактерии, которые утратили некоторые важные механизмы выработки метаболической энергии. Этот дефект обуславливает их внутриклеточный рост, благодаря которому они имеют доступ к богатым энергией промежуточным продуктам метаболизма. Их делят на два вида - *Chlamydia trachomatis*, объединяющий возбудителей болезней человека, и *Chlamydia psittaci*, включающий родственные микроорганизмы, первично поражающие млекопитающих и птиц. Вместе они образуют род *Chlamydia*, представители которого обладают бактериоподобными морфологическими характеристиками и уникальным циклом развития.

Хламидии в процессе репродукции претерпевают ряд последовательных изменений. Инфекционная частица представляет собой маленькую клетку (элементарное тельце) диаметром около 0,3 мкм с электронно-плотным нуклеоидом. Эта частица проникает в клетку хозяина при фагоцитозе. Из поверхностных мембран клетки хозяина вокруг этой маленькой частицы образуется вакуоль. Маленькая частица превращается в крупную (ретикулярное тельце), диаметром 0,5-1,0 мкм, которая лишена электронно-плотного нуклеоида. Внутри образованной мембранной вакуоли крупная частица увеличивается и многократно делится путем образования поперечной перегородки. В конечном счете вся вакуоль заполняется мелкими частицами, образовавшимися из крупных телец при их поперечном делении, и превращается во "включение" в цитоплазме клетки хозяина. Новообразованные мелкие частицы могут выходить из клетки хозяина и инфицировать новые клетки. Цикл размножения хламидии реализуется при их взаимодействии с чувствительной клеткой и занимает 24-48 ч.

Хламидийная инфекция у мужчин и женщин наиболее часто имеет инкубационный период от 5-7 до 30 дней. Она может вызывать различную патологию.

У мужчин первично поражаются мочеиспускательный канал, а затем и другие органы (предстательная железа, семенные пузырьки, придатки). У женщин чаще поражается канал шейки матки, после чего может возникнуть и восходящая инфекция, захватывающая матку, маточные трубы, яичники, а также брюшину.

Хламидий не являются представителями нормальной микрофлоры человека. Их обнаружение указывает на инфекционный процесс, а отсутствие клинических симптомов заболевания определяет лишь временное равновесие между паразитом и хозяином в условиях, ограничивающих размножение патогенного внутриклеточного микроорганизма, но не препятствующих ему.

Клинически бессимптомная хламидийная инфекция не менее опасна, чем ее манифестные формы, и требует лечебных и профилактических мероприятий.

**Для выявления хламидийной инфекции** используют различные методы как прямого определения возбудителя, так и косвенного серологического обследования.

*Материалом для исследования при урогенитальном хламидиозе* являются мазки, соскобы со слизистой уретры, цервикального канала, шейки матки, прямой кишки, конъюнктивы, которые забирают специальной ложечкой, специальными тампонами, щеточками или платиновой петлей. Забор материала является самым ответственным этапом диагностики. При исследовании на хламидии культуральным методом пациенты не должны применять антибиотики и другие препараты, активные в отношении хламидии в течение месяца. Если используются цитологические методы, препараты нельзя применять за 2 недели до исследования.

Культуральный метод выявления хламидий - "золотой стандарт" - является наиболее информативным (100% чувствительность), но в силу высокой стоимости и трудоемкости не имеет широкого распространения. Этот метод очень важен при подозрении на длительную инфекцию.

Цитологический метод заключается в микроскопическом исследовании поверхностных соскобов эпителиальных клеток, взятых из уретры, цервикального канала и других слизистых оболочек с целью обнаружить хламидии. В приготовленных мазках, которые преимущественно окрашивают, определяют наличие

в клеточных элементах специфических хламидийных включений. Эти внутриклеточные включения чаще выявляются при свежей и нелеченной инфекции. Метод простой, доступный, однако недостаточно чувствительный; позволяет диагностировать хламидийную инфекцию не более чем у 15-20% больных.

Иммунофлюоресцентный метод - окрашивание хламидийных антигенов иммунофлюоресцентными красителями на основе моноклональных антител. Его недостатком является субъективность оценки результатов.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике хламидийной инфекции является методом определения специфического участка ДНК с помощью ДНК-анализатора. Он обладает очень высокой чувствительностью и специфичностью.

Серологический метод выявления хламидий - обнаружение антихламидийных антител в крови. При острой инфекции диагностическое значение имеет обнаружение хламидийных иммуноглобулинов М (IgM) -антител либо 4-кратное нарастание титров иммуноглобулина G (IgG) в динамике через 2 недели. Средние и низкие титры антител к хламидиям, как правило, характерны для хламидийной клетки, поглощенной *Trichomonas vaginalis* (во время лечения происходят разрушение трихомонадной клетки и выход во внеклеточное пространство новой порции хламидии, которые, в свою очередь, стимулируют выработку антител в организме). Нельзя с уверенностью заявлять об инфицированной хламидиозом лишь на основании наличия антихламидийных антител. Только сочетание различных методов (не менее 2 одновременно и один из них ПЦР) дает необходимую точность диагностики урогенитального хламидиоза как для постановки первичного диагноза, так и для контроля излеченности.

#### ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

##### **ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

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

##### **СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ-ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ И КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ».**

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов 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-кровяной агар Цейслера с культивированием в анаэроостате. Учет результатов (демонстрация).
10. Проведение микроскопического исследования готовых мазков из культур неспорообразующих анаэробных микроорганизмов.
11. Оформление протоколов исследования.

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования
  - Штатив – 8 шт.
  - 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 – 8шт.
5. Пробирки с гноем – 8шт..
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 анаэроостате.
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-лактаминового 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 основным признаком 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  $\alpha$ -гемолитические стрептококки, окруженные небольшой зоной гемолиза с зеленовато-сероватым оттенком,  $\beta$ -гемолитические, окруженные прозрачной зоной гемолиза, и негемолитические, не изменяющие кровяной агар. Однако гемолитический признак оказался весьма вариабельным, 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. 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 преципитином, 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 карбеса. 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 антибиотиков, 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 бета-лактамов, 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 организм 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, спорообразующих, 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 ( $\gamma$  proteobacteria), тип протеобактерии (proteobacteria), царство бактерии.

Род протей включает следующие виды: proteus hauseri, proteus mirabilis, proteus myxofaciens, 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: 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 цiproфлоксацину. 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 Фридендера,

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 грамотрицательные палочки (0,3-1,0  $\times$  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.

**Эшерихия (лат. escherichia)** — род грамотрицательных, 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 (rod 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 H<sub>2</sub>S, 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, нейраминидазу.

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

##### ***Порфиромонады (rod 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 (rod 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 (rod Leptotrichia)***

Прямые неподвижные грамотрицательные палочки. Анаэробы. Для роста необходимо 5 % CO<sub>2</sub>. 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 (rod Fusobacterium)***

Веретенообразные, неподвижные палочки. Облигатные анаэробы. На анаэробном кровяном агаре образуют мелкие выпуклые желтоватые колонии, окруженные зоной α-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 — левомицетин, метронидазол.

**Иммунитет:** нестойкий, непродолжительный.

**Лечение:** Химиопрепараты нитроимидазольного ряда: метронидазол, тинидазол, орнидазол, и антибиотик клиндамицин. Препараты резерва — производные нитрониазолов. Дренаж гноевых очагов, 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 бактероидов, 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                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10

**ТЕМА: БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(возбудители сыпного тифа, чумы).

#### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики сыпного тифа, чумы.

#### ПЛАН:

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей сыпного тифа, чумы.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики сыпного тифа, чумы.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики сыпного тифа, чумы.

#### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.

1. Постановка реакции связывания комплемента при сыпном тифе с двумя антигенами (из риккетсии Провачека и Музера). Учет результатов РСК(демонстрация).
2. Постановка реакцию агглютинации при сыпном тифе (реакция Вейля-Феликса -к протею OX19). Учет результатов РА (демонстрация).
3. Постановка РНГА при сыпном тифе (с эритроцитарным антигеном).
4. Постановка РПГА с эритроцитарным диагностикумом при чуме. Учет результатов РПГА (демонстрация).
5. Постановка реакцию иммунофлюоресценции (демонстрация).
6. Микроскопия готовых препаратов с возбудителем чумы и риккетсиями.

#### ОСНАЩЕНИЕ

1. Демонстрация: реакция связывания комплемента при сыпном тифе с двумя антигенами (из риккетсии Провачека и Музера).
2. Демонстрация: реакция агглютинации при сыпном тифе (реакция Вейля-Феликса -к протею OX19).
3. Демонстрация: РНГА при сыпном тифе (с эритроцитарным антигеном).
4. Демонстрация: РПГА с эритроцитарным диагностикумом при чуме
5. Демонстрация: реакция иммунофлюоресценции.
6. Демонстрация: микропрепараты с возбудителем чумы и риккетсиями.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Сыпной тиф** — группа инфекционных заболеваний, вызываемых риккетсиями, общее острое инфекционное заболевание, передающееся от больного человека к здоровому через вшей.

*Эпидемиология.* В настоящее время высокая заболеваемость сыпным тифом сохранилась лишь в некоторых развивающихся странах. Однако многолетнее сохранение риккетсий у ранее переболевших сыпным тифом и периодическое появление рецидивов в виде болезни Брилля—Цинссера не возможно при ухудшении социальных условий (повышенная миграция населения, педикулез, ухудшение питания и др.).

Источником инфекции является больной человек, начиная с последних 2—3 дней инкубационного периода и до 7—8-го дня с момента нормализации температуры тела. После этого, хотя риккетсий могут длительно сохраняться в организме, реконвалесцент уже опасен для окружающих не представляет. Сыпной тиф передается через вшей, преимущественно через платяных, реже через головных. После питания кровью больного вошь становится заразной через 5—6 дней и до конца жизни (то есть 30—40 дней). Заражение человека происходит путем втирания фекалий вшей в повреждения кожи (в расчесы). Известны случаи инфицирования при переливании крови, взятой у доноров в последние дни инкубационного периода. Риккетсия, циркулирующая в Северной Америке (*R. canada*), передается клещами.

### *Эндемический сыпной тиф*

Эндемический сыпной тиф (крысиный, блошиный или американский сыпной тиф) вызывается риккетсиями *R. mooseri*. В США ежегодно регистрируется около 40 случаев заболевания. Оно встречается в регионах с относительно теплым климатом в обоих полушариях, преимущественно летом и в основном среди сельских жителей; протекает легче, чем эпидемический тиф. Это болезнь главным образом крыс, которая передается человеку при укусе крысиными блохами. Поэтому борьба с крысами чрезвычайно важна как мера профилактики.

### *Эпидемический сыпной тиф*

Эпидемический сыпной тиф, известный также как классический, европейский или вшивый сыпной тиф, корабельная или тюремная лихорадка, вызывается риккетсиями *Proxazeki*.

Возбудитель - граммотрицательная мелкая неподвижная бактерия *Rickettsia prowazeki*. Спор и капсул не образует, морфологически полиморфна: может иметь вид кокков, палочек; все формы сохраняют патогенность. Обычно их окрашивают по методу Романовского-Гимзы или серебрением по Морозову. Культивируют на сложных питательных средах, в куриных эмбрионах, в лёгких белых мышей. Размножаются только в цитоплазме и никогда в ядрах инфицированных клеток. Обладают соматическим термостабильным и типоспецифическим термолабильным антигеном, содержат гемолизины и эндотоксины. В испражнениях вшей, попадающих на одежду, сохраняет жизнеспособность и патогенность в течение 3 мес и более. При температуре 56 °C погибает за 10 мин, при 100 °C - за 30 с. Быстро инактивируется под действием хлорамина, формалина, лизола, кислот, щелочей в обычных концентрациях. Отнесена ко второй группе патогенности.

### *Патогенез.*

Воротами инфекции являются мелкие повреждения кожи (чаще расчесы), уже через 5—15 мин риккетсий проникают в кровь. Размножение риккетсий происходит внутриклеточно в эндотелии сосудов. Это приводит к набуханию и десквамации эндотелиальных клеток. Попавшие в ток крови клетки разрушаются, высвобождающиеся при этом риккетсий поражают новые эндотелиальные клетки. Наиболее бурно процесс размножения риккетсий происходит в последние дни инкубационного периода и в первые дни лихорадки.

**Диагноз** sporadических случаев в начальный период болезни (до появления типичной экзантемы) очень труден. Серологические реакции становятся положительными также лишь с 4—7-го дня от начала болезни. Во время эпидемических вспышек диагноз облегчается эпидемиологическими данными (сведения о заболеваемости, наличии завшивленности, контакт с больными сыпным тифом и др.). При появлении экзантемы (то есть с 4—6-го дня болезни) клинический диагноз уже возможен. Сроки появления и характер сыпи, гиперемия лица, экзантема Розенберга, пятна Киари—Авцына, изменения со стороны нервной системы — все это позволяет дифференцировать в первую очередь от брюшного тифа (постепенное начало, заторможенность больных, изменения со стороны органов пищеварения, более позднее появление экзантемы в виде розеола-папулезной мономорфной сыпи, отсутствие петехий и др.).

Необходимо дифференцировать и от других инфекционных болезней, протекающих с экзантемой, в частности, с другими риккетсиозами (эндемический сыпной тиф, клещевой риккетсиоз Северной Азии и др.). Некоторое дифференциально-диагностическое значение имеет картина крови. При сыпном тифе характерным является умеренный нейтрофильный лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом, эозинопения и лимфопения, умеренное повышение СОЭ.

Для подтверждения диагноза используют различные серологические реакции. Сохранила некоторое значение реакция Вейля—Феликса — реакция агглютинации с протеом OXig, особенно при нарастании титра антител в ходе болезни. Чаще используют РСК с риккетсиозным антигеном (приготовленным из риккетсий *Proxazeki*), диагностическим титром считается 1:160 и выше, а также нарастание титра антител. Используют и другие серологические реакции (реакция микроагглютинации, гемагглютинации и др.).

В меморандуме совещания ВОЗ по риккетсиозам (1993) в качестве рекомендуемой диагностической процедуры рекомендована непрямая реакция иммунофлюоресценции. В острую фазу болезни (и периода

реконвалесценции) антитела связаны с IgM, что используется для отличия от антител в результате ранее перенесенной болезни. Антитела начинают выявляться в сыворотке крови с 4—7-го дня от начала болезни, максимального титра достигают через 4-6 нед от начала заболевания, затем титры медленно снижаются. После перенесенного сыпного тифа риккетсий Провачека в течение многих лет сохраняются в организме реконвалесцента, это обуславливает длительное сохранение антител (связаны с IgG также в течение многих лет, хотя и в невысоких титрах). В последнее время с диагностическими целями используют пробную терапию антибиотиками тетрациклиновой группы. Если при назначении тетрациклина (в обычных терапевтических дозах) через 24—48 ч не наступает нормализация температуры тела, то это позволяет исключить сыпной тиф (если лихорадка не связана с каким-либо осложнением).

Основным *этиотропным препаратом* в настоящее время являются антибиотики тетрациклиновой группы, при непереносимости их эффективным оказывается и левомицетин (хлорамфеникол).

Для *профилактики* сыпного тифа большое значение имеет борьба со вшивостью, ранняя диагностика, изоляция и госпитализация больных сыпным тифом, необходима тщательная санитарная обработка больных в приемном покое стационара и дезинсекция одежды больного. Для *специфической профилактики* использовалась инактивированная формалином вакцина, содержащая убитые риккетсии Провачека. Вакцины использовались во время повышенной заболеваемости и были эффективными. В настоящее время при наличии активных инсектицидов, эффективных методов этиотропной терапии и низкой заболеваемости значение противосыпнотифозной вакцинации значительно снизилось.

**Чума** (лат. *pestis* — зараза) — острое природно-очаговое инфекционное заболевание группы карантинных инфекций, протекающее с исключительно тяжёлым общим состоянием, лихорадкой, поражением лимфоузлов, лёгких и других внутренних органов, часто с развитием сепсиса. Заболевание характеризуется высокой летальностью и крайне высокой заразностью.

Чумная палочка (лат. *Yersinia pestis*) — бактерия, открытая в 1894 году одновременно двумя учёными: французом Александром Йерсеном и японцем Китасато Сибасабуро.

Инкубационный период длится от нескольких часов до 3—6 дней. Наиболее распространённые формы чумы — бубонная и лёгочная. Смертность при бубонной форме чумы достигала 95 %, при лёгочной — 98-99 %. В настоящее время при правильном лечении смертность составляет 5-10 %.

Известные эпидемии чумы, унёсшие миллионы жизней, оставили глубокий след в истории человечества.

Возбудитель чумы устойчив к низким температурам, хорошо сохраняется в мокроте, но при температуре 55 °С погибает в течение 10—15 мин, а при кипячении — практически немедленно. Попадает в организм через кожу (при укусе блохи, как правило, *Xenopsylla cheopis*), слизистые оболочки дыхательных путей, пищеварительного тракта, конъюнктивы.

По основному носителю природные очаги чумы подразделяют на сусликовые, сурочьи, песчаночьи, полевочьи и пищуховые. Помимо диких грызунов, в эпизоотический процесс иногда включаются так называемые синантропные грызуны (в частности, крысы и мышевидные), а также некоторые дикие животные (зайцы, лисы), являющиеся объектом охоты. Из домашних животных чумой болеют верблюды.

В природном очаге заражение обычно происходит через укус блохи, ранее питавшейся на больном грызуне. При укусе заражённых чумными бактериями блох у человека на месте укуса может возникнуть папула или пустула, наполненная геморрагическим содержимым (кожная форма). Затем процесс распространяется по лимфатическим сосудам без проявления лимфангита. Размножение бактерий в макрофагах лимфатических узлов приводит к их резкому увеличению, слиянию и образованию конгломерата (бубонная форма). Дальнейшая генерализация инфекции, которая не является строго обязательной, тем более в условиях современной антибактериальной терапии, может приводить к развитию септической формы, сопровождающейся поражением практически всех внутренних органов. Однако с эпидемиологических позиций важнейшую роль играют «отсевы» инфекции в лёгочную ткань с развитием лёгочной формы болезни. С момента развития чумной пневмонии больной человек сам становится источником заражения, но при этом от человека к человеку уже передаётся лёгочная форма болезни — крайне опасная, с очень быстрым течением.

**Установление точного диагноза** необходимо осуществить с помощью бактериологических исследований. Материалом для них является пунктат нагноившегося лимфатического узла, мокрота, кровь больного, отделяемое свищей и язв.

Лабораторная диагностика осуществляется с помощью флюоресцентной специфической антисыворотки, которой окрашивают мазки отделяемого язв, пунктата лимфатических узлов, культуры, полученной на кровяном агаре.

Впервые вакцину против чумы создал в начале XX века Владимир Хавкин.

Лечение больных чумой в настоящее время сводится к применению антибиотиков, сульфаниламидов и лечебной противочумной сыворотки. Профилактика возможных очагов заболевания заключается в проведении специальных карантинных мероприятий в портовых городах, дератизации всех судов, которые ходят международными рейсами, создании специальных противочумных учреждений в степных местностях, где водятся грызуны, выявлении эпизоотий чумы среди грызунов и борьбе с ними. Вспышки заболевания до сих пор встречаются в некоторых странах Азии, Африки и Южной Америки.

## ХРОНОМЕТРАЖ

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин  |

#### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11**

**ТЕМА: ГРИБЫ И ПРОСТЕЙШИЕ - ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА.**

**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «БАКТЕРИЙ- ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ. ГРИБЫ И ПРОСТЕЙШИЕ - ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА».**

#### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологической диагностики и специфической профилактики заболеваний, вызываемые грибами и простейшими.

раствором Люголя при амебиазе.

#### **ПЛАН:**

1. Таксономия возбудителей глубоких и поверхностных микозов, микотоксикозов, кандидоза; их основные биологические свойства. Характер вызываемых заболеваний с элементами эпидемиологии и патогенеза, иммунитет.
2. Факторы, способствующие возникновению кандидоза (дисбактериоз, иммунодефициты).
3. Принципы микробиологической диагностики микозов, микотоксикозов, кандидоза;
4. Препараты для этиотропной терапии микозов, микотоксикозов, кандидоза;
5. Таксономия возбудителей **протозойных инфекций** (токсоплазмоза, малярии, амебиаза); их основные биологические свойства, циклы развития. Характер вызываемых заболеваний с элементами эпидемиологии и патогенеза, иммунитет.
6. Принципы микробиологической диагностики токсоплазмоза, малярии, амебиаза.
7. Препараты для этиотропной терапии, иммунотерапии и иммунопрофилактики токсоплазмоза, малярии, амебиаза.
8. Сдача модуля.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.**

1. Проведение микроскопического исследования готовых препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе при токсоплазмозе, малярии.
2. Приготовление и окраска мазков из исследуемого материала больного кандидозом по Граму и Романовскому -Гимзе.
3. Проведение микологического исследования для диагностики кандидоза и поверхностных микозов (посев на среду Сабуро и учет результатов со среды Сабуро . Микроскопическое и макроскопическое изучение колоний кандиды (демонстрация)).
4. Проведение исследования нативных препаратов и мазков, окрашенных раствором Люголя при амебиазе.

#### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Набор для бактериологического исследования
  - Штатив – 8 шт.
  - Пинцет -8 шт.
  - Бактериологическая петля -8 шт.
  - Флакон с физ. р-ром – 8 шт.
  - Спиртовка -8 шт.
  - Лоток с подставкой – 8 шт.
2. Микроскопы – 8 шт.

- 3.Иммерсионное масло
- 4.Набор красок по Граму – 8шт.
- 5.Набор красок по Романовскому-Гимзе -8шт.
- 6.Препараты с мазками из исследуемого материала больного кандидозом.
- 7.Чашки Петри со средой Сабуро и ростом колоний
- 8.Демонстрация: микропрепараты, окрашенные раствором Люголя при амебиазе.
- 9.Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Грибы** (Fungi, Mycetes) — разнородная группа эукариотических микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цито-плазматическую мембрану (которая содержит фосфолипиды и стеролы) и мощную клеточную стенку, состоящую из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др. Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов — фикомицетов — не имеют перегородок. У высших грибов — эумицетов — гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный. Грибы размножаются спорами, половым и бесполом способами, а также вегетативным путем (почкование или фрагментация гиф). Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным. Несоввершенными называют грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения. Бесполое размножение осуществляется у грибов с помощью эндогенных спор, созревающих внутри круглой структуры — спорангия, и экзогенных спор — конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

Грибы можно разделить на 7 классов: хитридиомицеты, гифохитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, базидиомицеты, дейтеромицеты. Подавляющее большинство грибов, вызывающие заболевания у человека (микозы), относятся к несовершенным грибам. Для диагностики микозов могут быть использованы микроскопические (культуральные), аллергические, серологические, биологические и гистологические методы исследования. Материалом для исследования могут быть гной, мокрота, пораженные волосы, ногти, чешуйки кожи, пунктаты костного мозга, лимфатических узлов, внутренних органов, кровь, желчь, испражнения, биоптаты тканей и т. п. Для окраски мазков чаще всего используют методы Грама, Циля-Нильсена, Романовского-Гимзы.

### Плазмодии малярии.

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Haemosporina.

К роду Plasmodium относятся более 100 видов простейших, паразитирующих на различных позвоночных: рептилиях, птицах и млекопитающих. Паразитами человека являются 4 вида малярийных плазмодиев. Plasmodium vivax-возбудитель трехдневной малярии, Plasmodium malariae - возбудитель четырехдневной малярии, Plasmodium falciparum – возбудитель тропической малярии и Plasmodium ovale – возбудитель – возбудитель малярии-овале.

Малярийные плазмодии – паразиты со сложным гетероксическим развитием, включающим фазу полового размножения, в течение которого они облигатно связаны с двумя хозяевами (окончательным и промежуточным). Человек является промежуточным хозяином малярийных плазмодиев, так как в его организме происходит бесполовая фаза жизненного цикла паразитов. Окончательный хозяин малярийных паразитов – кровососущий комар рода Anopheles, в организме которого проходит половая фаза их жизненного цикла, которая завершается образованием в теле комара большого количества длинных тонких одноядерных клеток – спорозоитов. Они концентрируются в огромных количествах в слюнных железах комара. При укусе комара спорозоиты из слюнных желез попадают в кровь позвоночного хозяина.

Лабораторная диагностика проводится путем микроскопического исследования мазков крови больного, окрашенных краской Романовского – Гимзе. При этом дифференциация видов плазмодиев основана на морфологических особенностях паразитов, а также пораженных эритроцитов. В ряде случаев используется серодиагностика (реакция иммунофлюоресценции, пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ).

### Токсоплазма.

Тип Apicomplexa, класс Sporozoa, отряд Eucoccidiida, подотряд Eimeriina, семейства Eimeriidae.

Возбудитель токсоплазмоза представлен единственным видом Toxoplasma gondii.

Возбудитель токсоплазмоза -Toxoplasma gondii-внутриклеточный паразит, поражающий практически все органы и ткани теплокровных животных, птиц и человека. В соответствии с отечественной классификацией его относят к микроорганизмам 4-й группы патогенности (условно-патогенные микроорганизмы).

Паразиты обладают гетероксическим развитием, включающим половое и бесполое размножение со сменой хозяев. Основным хозяином токсоплазмы является кошка, в эпителиальных клетках кишечника которой образуются ооцисты. Промежуточные хозяева паразита – многочисленные виды птиц и млекопитающих, в том числе и человек. Жизненный цикл токсоплазм включает несколько морфологических стадий: 1) эндозоиты (трофозоиты) и цистозоиты – вне и внутриклеточные стадии, во время которых паразит находится в разных

органах и тканях промежуточных хозяев (включая человека) и размножается бесполом путем (эндодиогения и эндополигения), 2) мерозоиты – внутри- и внеклеточные формы, паразитирующие в эпителиальных клетках кишечника основного хозяина – кошки. Размножаются посредством шизогонии; 3) микро- и макрогаметы-половые стадии развития, образующиеся в основном хозяине – кошке. При слиянии мужских и женских клеток (соответственно, микрогамет и макрогамет) возникает зигота, которая затем превращается в покоящуюся стадию –ооцисту. Ооцисты выводятся во внешнюю среду вместе с фекалиями кошки; 4) спорозоиты – инвазионная стадия, образующаяся в результате спорогонии внутри ооцисты вне организма основного хозяина.

В качестве материала для исследования используют пунктат лимфатических узлов, спинномозговую жидкость, кровь, гистологические срезы, лимфатических узлов, миндалин, кусочки органов трупа, головной мозг, печень, селезенку, легкие, а в случае патологической беременности – плаценту и околоплодную жидкость.

**Микроскопия.** Исследование мазков и гистологических препаратов требует внимания и опыта, так как количество токсоплазм в материале невелико и их можно спутать с другими образованиями. Токсоплазмы имеют полулунную или аркообразную форму длиной 4-7 мкм, шириной 2-4 мкм. Один конец возбудителя заострен, а другой – несколько закруглен. При окраске по Романовскому-Гимзе цитоплазма токсоплазм приобретает голубой цвет, а ядро, расположенное в центре паразита и занимающее около 1/3-1/4 его тела, – рубинного красный.

#### **Амебиаз.**

Тип *Sarcomastigophora*, подтип *Sarcodina*, класс *Lobosea*, отряд *Amoebida*.

Дизентерийная амеба *Entamoeba histolytica* (микроорганизмы 4 группы патогенности) открыта Ф.А. Лешем в 1875 г. Она является обитателем толстой кишки человека и в своем развитии (жизненный цикл) проходит 2 стадии – вегетативную и стадию покоя. На вегетативной стадии развития амеба существует в четырех формах: 1) тканевой; 2) большой вегетативной (форма *magna*), просветной-мелкой вегетативной (форма *minuta*) и 4) предцистной.

При остром амебиазе обнаруживают тканевую и большую вегетативную, а у реконвалесцентов и цистовыделителей – просветную и предцистную форму.

Материалом для исследования служат испражнения, гной из пораженных органов, мокрота и др.

**Микроскопия.** Исследуют нативные препараты и мазки, окрашенные раствором Люголя, смесью Сафарлиева, а также препараты, обработанные железным гематоксилином по Гейдегайну или другими красителями.

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12**

**ТЕМА: ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**  
(возбудители гепатитов А и Е, полиомиелита).

**Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гепатитов А и Е, полиомиелита.

### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей гепатитов А и Е, полиомиелита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гепатитов А и Е, полиомиелита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гепатитов А и Е, полиомиелита.

### ***САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА***

1. Разбор постановки и учет результатов цветной пробы при полиомиелите (демонстрация).
2. Разбор постановки и учет результатов РНГА для сероидентификации при гепатитах А, Е (демонстрация).
3. Разбор постановки и учет результатов ИФА для серодиагностики при гепатитах А, Е (демонстрация).

### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Демонстрация: учет результатов цветной пробы при полиомиелите.
2. Демонстрация: учет результатов РНГА для сероидентификации при гепатитах А, Е.
3. Демонстрация: учет результатов ИФА для серодиагностики при гепатитах А, Е.
4. Бак. препараты.
5. Таблицы.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Гепатит А** - доброкачественное остроциклическое энтеровирусное заболевание, характеризующееся цитопатическим действием вируса на гепатоциты. Клинически проявляется синдромом интоксикации, гепатоспленомегалией и часто — желтухой.

*Этиология и патогенез Гепатита А* - возбудитель — энтеровирус типа 72 (род Enterovirus, семейство Picornaviridae). Попадает в кишечник, из которого быстро проникает в кровь, вызывая вирусемию. В дальнейшем реплицируется в гепатоцитах, оказывая на них прямое цитопатическое действие, в результате чего происходит дезинтеграция мембран гепатоцитов и внутриклеточных органелл. Выход из клеток гидролаз ведет к развитию цитолиза и некробиоза печеночных клеток. Одновременно развиваются воспалительный процесс в соединительной ткани печени и холестаза.

*Эпидемиология Гепатита А* - источником инфекции является человек с манифестными и иннаппарантными проявлениями болезни. Выделение вируса происходит с фекальными массами, механизм передачи — фекально-оральный. Отмечается летне-осенняя сезонность заболевания.

*Симптомы Гепатита А* - инкубационный период продолжается 3—4 нед. Начальный период заболевания (продромальный, дожелтушный) характеризуется достаточно большим разнообразием симптомов. Наиболее часто встречается лихорадочное (гриппоподобное) течение, при котором заболевание начинается остро, с повышения температуры от субфебрильных до высоких цифр, легких катаральных симптомов, мышечных болей. Одновременно больные отмечают явления дискомфорта в эпигастрии, снижение аппетита, тошноту, иногда — рвоту после приема пищи. Возможны и другие проявления заболевания, в том числе — по астеновегетативному варианту. В ряде случаев уже в этом периоде можно обнаружить увеличенную печень и повышение уровня аминотрансфераз. Продолжительность начального периода — в среднем около недели. Переход от дожелтушного к желтушному периоду плавный. К этому моменту нормализуется температура, исчезают катаральные явления, однако диспепсические симптомы сохраняются или даже их интенсивность возрастает. Первым признаком наступления желтушного периода является потемнение мочи. Вскоре развивается желтуха, которую прежде всего можно заметить на слизистых ротовой полости (под уздечкой языка) и на склерах, а затем — на кожных покровах. Язык обложен, стул может обесцвечиваться. Печень увеличена, достаточно плотной консистенции, слегка болезненная при пальпации. В половине случаев обнаруживается спленомегалия. На фоне желтухи, помимо диспепсических явлений, больные отмечают адинамию, головокружение, иногда — расстройства сна. Появляется брадикардия, АД склонно к снижению. Течение заболевания обычно легкое или среднетяжелое, но не исключены и тяжелые варианты, и обострения.

*Дифференциальная диагностика Гепатита А* в продромальном периоде необходима с острыми респираторными и кишечными инфекциями, гриппом. В желтушном периоде заболевание дифференцируют с обтурационными и гемолитическими желтухами, мононуклеозом, иерсиниозом, лептоспирозом.

*Лабораторная диагностика Гепатита А* приобретает особую роль в определении этиологии гепатита и оценке его тяжести. Возможно выделение вируса гепатита А из фекалий, но в широкой медицинской практике вирусологические исследования не применяются. Для верификации диагноза используют серологические реакции — ИФА, радиоиммунного анализа (РИА), в которых обнаруживается нарастание титров IgM-anti-HAV в желтушном периоде и титров IgG-anti-HAV к периоду реконвалесценции. При анализе крови необходимо учитывать наличие лейкопении, относительного лимфоцитоза и замедление СОЭ. Интенсивность желтухи устанавливают по уровню билирубина в крови (особенно — его связанной фракции). Активность aminотрансфераз (АлАТ, АсАТ) увеличивается в несколько раз, и степень их повышения говорит об интенсивности цитолиза гепатоцитов. На нарушение белково-синтетической функции печени указывают изменения показателей коллоидных проб (снижение — сулемовой и повышение — тимоловой), снижение уровня альбуминов в крови и протромбинового индекса.

*Лечение Гепатита А* при установлении этиологического фактора лечение можно проводить в амбулаторных условиях. На период выраженности интоксикационного синдрома назначают постельный режим, рекомендуют полноценное питание с дополнительным включением в рацион витаминов групп С и В. Для снятия интоксикации в зависимости от ее степени применяются обильное питье или инфузионные растворы. Реконвалесценты подлежат диспансерному наблюдению в течение 3 мес.

*Профилактика Гепатита А* в настоящее время в качестве специфической профилактики предложена вакцина против гепатита А, эффективность ее обсуждается. Неспецифическая профилактика проводится по общим принципам профилактики кишечных инфекций.

**Вирусный гепатит Е** - вирусная инфекция из условной группы фекально-оральных гепатитов, характеризующаяся поражением печени, острым циклическим течением и тяжёлыми проявлениями у беременных.

*Краткие исторические сведения.* Вирусный гепатит Е выделен из группы гепатитов «ни А, ни В» на основе маркерной диагностики, доказательств фекально-орального механизма и преимущественно водного пути передачи, полученных при ретроспективном анализе (1980) крупной водной вспышки в Индии, наблюдавшейся в 1955 г. Позднее М.С. Балаян с соавт. (1982) выявил вирусоподобные частицы в фекалиях больного вирусным гепатитом Е и подтвердил самостоятельность данной нозологической формы в опыте самозаражением.

*Этиология.* Возбудитель - РНК-геномный вирус, условно включённый в род *Calicivirus*, хотя в генетическом отношении он имеет существенные различия. Вирионы округлой формы, лишены суперкапсида. В целом вирусный гепатит Е менее устойчив, чем вирусный гепатит А. Он хорошо сохраняется при температуре - 20 °С и ниже. Быстро разрушается при замораживании-оттаивании, под действием хлорсодержащих или иодсодержащих дезинфекционных средств.

*Эпидемиология.* Резервуар и источник инфекции - человек, больной или носитель. Период контагиозности источника точно не установлен, вероятно, он аналогичен таковому при вирусном гепатите А. Вирус обнаруживают в фекалиях в ранние сроки болезни в 15% случаев при лёгких и среднетяжёлых формах; при тяжёлом течении его обнаруживают почти у 50% больных. Доказана патогенность вирусного гепатита Е для шимпанзе, свиней и других животных.

Механизм передачи - фекально-оральный, путь передачи - преимущественно водный. Имеются данные о распространении возбудителя и контактно-бытовым путём. Предполагают возможность заражения вирусным гепатитом Е при употреблении в пищу сырых моллюсков. В пользу воды как главного фактора передачи инфекции свидетельствуют низкая очаговость, возникновение массовых заболеваний, связанных с сезонами дождей и с высоким стоянием уровня грунтовых вод.

*Лабораторная диагностика.* Основу составляет обнаружение антигенов вирусного гепатита Е с помощью ПЦР и выявление IgM и IgG к антигенам вирусного гепатита Е.

*Профилактика и меры борьбы.* Особое значение уделяют обеззараживанию воды. Меры специфической профилактики не разработаны. Имеются рекомендации о введении беременным специфического иммуноглобулина.

**Полиомиелит** (от др.-греч. *πολιός* — серый и *μυελός* — спинной мозг) — детский спинномозговой паралич, острое, высококонтагиозное инфекционное заболевание, обусловленное поражением серого вещества спинного мозга полиовирусом и характеризующееся преимущественно патологией нервной системы. В основном, протекает в бессимптомной или стертой форме. Иногда случается так, что полиовирус проникает в ЦНС, размножается в мотонейронах, что приводит к их гибели, необратимым парезам или параличам иннервируемых ими мышц.

*Этиология.* Возбудитель (*poliovirus hominis*) относится к семейству пикорнавирусов, к группе энтеровирусов (кишечным вирусам), куда входят также Коксаки- и ЕСНО-вирусы и существует в виде 3 независимых типов (I, II и III). Наиболее часто встречается 1 тип. Размеры вируса — 8—12 нм, содержит РНК. Устойчив во внешней среде (в воде сохраняется до 100 суток, в испражнениях — до 6 мес), хорошо переносит замораживание, высушивание. Не разрушается пищеварительными соками и антибиотиками. Культивируется на клеточных культурах, обладает цитопатогенным действием. Погибает при кипячении, под воздействием ультрафиолетового облучения и дезинфицирующих средств. Источник инфекции — человек (больной или

переносимый заражение бессимптомно); возбудитель выделяется через рот (несколько суток), а затем с испражнениями (несколько недель, а иногда и месяцев). Заражение может произойти воздушно-капельным путём, но чаще — при попадании в рот активного вируса (через загрязнённые руки, пищу). Механическим переносчиком вируса могут быть мухи.

Заболеваемость полиомиелитом преобладает в летне-осенние месяцы. Чаще болеют дети от 6 месяцев до 5 лет. Большинство заболеваний связано с вирусом типа I.

Проникнув в организм, вирус размножается в лимфатическом глоточном кольце (миндалины), кишечнике, регионарных лимфатических узлах, проникает в кровь, а в некоторых случаях и в центральную нервную систему, вызывая её поражение (особенно двигательных клеток передних рогов спинного мозга и ядер черепно-мозговых нервов). В большинстве случаев полиомиелит протекает бессимптомно и инфекцию можно обнаружить лишь с помощью лабораторных исследований. В других случаях после инкубационного периода (3-35, чаще 9-11 сут) появляются признаки заболевания.

#### *Классификация*

##### *1. По типу :*

Типичные (с поражением ЦНС)

Непаралитические (менингеальная, abortивная)

Паралитические (спинальная, бульбарная)

Атипичные

Стертая

Бессимптомная

##### *2. По тяжести:*

Легкая форма

Среднетяжелая форма

Тяжелая форма

#### *Критерии тяжести:*

Выраженность синдрома интоксикации

Выраженность двигательных нарушений

##### *3. По течению (характеру)*

Гладкое

Негладкое

С осложнениями

С наложением вторичной инфекции

С обострением хронических заболеваний

*Abortивная форма протекает* с общими неспецифическими симптомами (катаральные явления, желудочно-кишечные расстройства, общая слабость, повышение температуры тела и т. п.); эти случаи наиболее опасны в эпидемиологическом отношении.

*Менингеальная форма* проявляется в виде серозного менингита.

*При наиболее частой из паралитических форм полиомиелита — спинальной —* после общеинфекционных симптомов появляются параличи мышечных групп, иннервируемых двигательными клетками спинного мозга; на ногах чаще всего поражаются: четырёхглавая мышца, приводящие мышцы, сгибатели и разгибатели стопы; на руках: дельтовидная, трёхглавая и супинаторы предплечья. Особенно опасен паралич диафрагмы, приводящий к тяжёлому нарушению дыхания.

*Бульбарная форма* обусловлена поражением различных отделов продолговатого мозга, а понтинная — поражением ядра лицевого нерва.

*При непаралитических формах* заболевание обычно заканчивается полным выздоровлением, при паралитических формах в некоторых случаях функции пораженных мышц восстанавливаются не полностью, дефект сохраняется длительно, иногда пожизненно. Наиболее тяжёлые случаи, особенно с поражением дыхательных центров продолговатого мозга, могут привести к летальному исходу. Диагноз полиомиелит ставят на основании клинических, эпидемиологических и лабораторных данных.

*Эпидемиология.* Источником инфекции является больной или вирусоноситель, при этом наиболее опасны пациенты со стёртыми и abortивными формами заболевания. Инфекция передаётся фекально-оральным (грязные руки, игрушки, инфицированные продукты питания) и воздушно-капельным путём. Восприимчивость к вирусу полиомиелита всеобщая, однако наиболее восприимчивы дети в возрасте до 7 лет. При этом паралитическая форма встречается не более, чем в 1% случаев, а стёртые, инapparантные и abortивные формы диагностируются только в очаге инфекции при лабораторном обследовании контактных с заболевшими полиомиелитом лиц. Дети первых 2—3 месяцев жизни, благодаря полученному трансплацентарно от матери иммунитету, полиомиелитом практически не болеют. Повторные случаи заболевания практически не регистрируются, так как после перенесенного заболевания вырабатывается стойкий иммунитет и наблюдается невосприимчивость клеток слизистой оболочки кишечника к гомологичным типам вируса.

*Диагностика.* Идентификация возбудителя полиомиелита имеет особое значение, так как многие энтеровирусы и герпесвирусы способны вызывать похожие поражения. Материалы для исследований — кровь, СМЖ, кал.

Выделение возбудителя полиомиелита проводят в первичных культурах ткани (эмбрионы) или культурах клеток HeLa, Нер-2, СОЦ и др. Идентификацию полиовирусов осуществляют по цитопатическому эффекту и в

РН с типовой агглютинацией.

Вирусспецифические АТ к полиомиелиту определяют в сыворотке и СМЖ; выявление высоких титров IgM указывает на наличие инфекции.

**Вакцинация.** Первые полиомиелитные вакцины появились в 1950—1960-х годах. Они сразу понизили заболеваемость по всему миру. Существует два типа вакцин: инактивированная Солка (повышенная иммуногенность для подкожного введения) и живые вакцины Чумакова и Сэбина (для приема внутрь). В состав вакцин вместе с иммуногенными компонентами входят неомидин, стрептомицин и полимицин. Эти препараты не позволяют расти бактериям. Обе вакцины могут быть как 3х валентны, так и моновалентны. Для плановой вакцинопрофилактики используют трехвалентные вакцины. Моновалентные рекомендовано применять в условиях эпидемической вспышки, вызванной одним из трех типов вируса.

Инактивированная вакцина содержит вирус полиомиелита, убитый формалином. Она вводится трехкратно внутримышечно и вызывает выработку специфического гуморального иммунитета. Живая полиомиелитная вакцина содержит живой ослабленный (аттенуированный) вирус, вводится перорально, стимулирует помимо гуморального еще и тканевой иммунитет.

Живой вакциной детей иммунизируют, начиная с 1,5-годовалого возраста, несколько раз по определенной схеме, с интервалами в 45 дней и более. Вакцину дают через рот, в виде капель или конфет, либо вводят внутримышечно. До этого возраста, с 3-х месяцев применяют инактивированную (не живую) вакцину.

### ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13

**ТЕМА:** ***ВИРУСЫ - ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ (возбудители гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита).***

**Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.

**ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей

- гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики гриппа, ОРВИ, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Разбор поставки и учет результатов РИФ при ОРВИ (демонстрация).
2. Разбор поставки и учет результатов РТГА для сероидентификации при гриппе (демонстрация).
3. Разбор поставки и учет результатов ИФА для серодиагностики при ОРВИ (демонстрация).

### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Демонстрация: учет результатов РИФ при ОРВИ.
2. Демонстрация: учет результатов РТГА для сероидентификации при Гриппе.
3. Демонстрация: учет результатов ИФА для серодиагностики при ОРВИ.
4. Бакпрепараты.
5. Таблицы.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Грипп (от фр. *grippe*)** — острое инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусом гриппа. Входит в группу острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Периодически распространяется в виде эпидемий и пандемий. В настоящее время выявлено более 2000 вариантов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром.

Впервые вирус был выделен в 30-е года XX века. Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, которое включает роды *Influenza A*, *B*, *C*. Антигенные свойства внутренних белков вириона (M1 и NP) определяют принадлежность вируса гриппа к роду *A*, *B* или *C*.

Эпидемическое значение для людей имеют вирусы, содержащие три подтипа НА (H1, H2, H3) и два подтипа NA (N1, N2). Вирусы гриппа *A* и *B* содержат NA и HA в качестве основных структурных и антигенных компонентов вирусной частицы, обладающих гемагглютинирующей и нейраминидазной активностями. У вируса гриппа *C* нет нейраминидазы, он обладает вместо этого гемагглютинин-эстеразным (проникающим) белком (HEF). Нить РНК окружена белком и упакована в липопротеидную мембрану. Вирионы способны агглютинировать эритроциты и элюироваться в них с помощью вирусспецифических ферментов.

Вирус гриппа имеет сферическую форму диаметром 80—120 нм, в центре находятся РНК-фрагменты, заключённые в липопротеидную оболочку, на поверхности которой имеются «шипы» состоящие из гемагглютинина (H) и из нейраминидазы (N). Антитела, вырабатываемые в ответ на гемагглютинин (H), составляют основу иммунитета против определённого подтипа возбудителя гриппа.

Источником инфекции является больной человек с явной или стёртой формой болезни, выделяющий вирус с кашлем, чиханьем и т. д. Больной заразен с первых часов заболевания и до 5–7-го дня болезни.[5] Характеризуется аэрозольным (вдыхание мельчайших капель слюны, слизи, которые содержат вирус гриппа) механизмом передачи и чрезвычайно быстрым распространением в виде эпидемий и пандемий. Эпидемии гриппа, вызванные серотипом *A*, возникают примерно каждые 2—3 года, а вызванные серотипом *B* — каждые 4—6 лет. Серотип *C* не вызывает эпидемий, только единичные вспышки у детей и ослабленных людей. В виде эпидемий встречается чаще в осенне-зимний период. Периодичность эпидемий связана с частым изменением антигенной структуры вируса при пребывании его в естественных условиях.

Входными воротами для вируса гриппа являются клетки мерцательного эпителия верхних дыхательных путей — носа, трахеи, бронхов. В этих клетках вирус размножается и приводит к их разрушению и гибели. Этим объясняется раздражение верхних дыхательных путей кашель, чихание, заложенность носа. Проникая в кровь и вызывая вирусемию, вирус оказывает непосредственное, токсическое действие, проявляющееся в виде повышения температуры, озноба, миалгий, головной боли. Кроме того, вирус повышает сосудистую проницаемость, вызывает развитие стазов и плазмо-геморрагий.

Традиционным способом предупреждения заболевания гриппом является вакцинация. Предложена вакцина для профилактики гриппа в форме живой, убитой (инактивированной), субъединичной вакцины. Вакцинация особенно показана в группах риска — дети, пожилые люди, больные с хроническими заболеваниями сердца и лёгких, а также врачи. Обычно осуществляется, когда эпидемиологический прогноз

свидетельствует о целесообразности массовых мероприятий (обычно в середине осени). Возможна и вторая прививка в середине зимы.

Для быстрой диагностики гриппа используют "экспресс-метод" обнаружения вируса гриппа с помощью флуоресцирующих антител. Исследуемый материал берут из носа в первые дни болезни. Приготовленные из него мазки обрабатывают специфическими гриппозными флуоресцирующими сыворотками. Образовавшийся комплекс антиген-антитело ярко светится в ядре и цитоплазме клеток цилиндрического эпителия и отчетливо виден в люминесцентном микроскопе. Ответ можно получить через 2-3 ч.

Серологические исследования помогают ретроспективной диагностике гриппа. Исследуют парные сыворотки крови, взятые у больных в острый период болезни (до 5-го дня от начала заболевания) и в период реконвалесценции с интервалом 12-14 дней. Наиболее показательными в серологической диагностике являются реакция связывания комплемента (РСК) с гриппозными антигенами и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Диагностическим считается нарастание титра антител в 4 раза и более.

**Корь (лат. Morbilli)** — острое инфекционное вирусное заболевание с высоким уровнем восприимчивости (индекс контагиозности приближается к 100 %), которое характеризуется высокой температурой (до 40,5 °С), воспалением слизистых оболочек полости рта и верхних дыхательных путей, конъюнктивитом и характерной пятнисто-папулезной сыпью кожных покровов, общей интоксикацией.

Возбудителем кори является РНК-вирус рода морбилливирусов, семейства парамиксовирусов, имеет сферическую форму и диаметр 120—230 нм. Состоит из нуклеокапсида — спирали РНК плюс три белка и внешней оболочки, образованной матричными белками (поверхностными гликопротеинами) двух типов — один из них гемагглютинин, другой «гантелеобразный» белок.

Вирус малоустойчив во внешней среде, быстро погибает вне человеческого организма от воздействия различных химических и физических факторов (облучение, кипячение, обработка дезинфицирующими средствами).

Несмотря на нестойкость к воздействию внешней среды, известны случаи распространения вируса на значительные расстояния с потоком воздуха по вентиляционной системе — в холодное время года в одном отдельно взятом здании. Ослабленные штаммы коревого вируса используются для производства живой противокоревой вакцины.

Путь передачи инфекции — воздушно-капельный, вирус выделяется во внешнюю среду в большом количестве больным человеком со слюной во время кашля, чихания и т. д.

Источник инфекции — больной корью в любой форме, который заразен для окружающих с последних дней инкубационного периода (последние 2 дня) до 4-го дня высыпаний. С 5-го дня высыпаний больной считается незаразным.

Корью болеют преимущественно дети в возрасте 2—5 лет и значительно реже взрослые, не переболевшие этим заболеванием в детском возрасте. Новорожденные дети имеют колостральный иммунитет, переданный им от матерей, если те переболели корью ранее. Этот иммунитет сохраняется первые 3 месяца жизни. Встречаются случаи врожденной кори при трансплацентарном заражении вирусом плода от больной матери.

После перенесенного заболевания развивается стойкий иммунитет, повторное заболевание корью человека, без сопутствующей патологии иммунной системы, сомнительно, хотя и такие случаи описаны. Большинство случаев кори наблюдаются в зимне-весенний (декабрь-май) период с подъемом заболеваемости каждые 2—4 года.

Инкубационный период 8—14 дней (редко до 17 дней). Острое начало — подъем температуры до 38—40 °С, сухой кашель, насморк, светобоязнь, чихание, осиплость голоса, головная боль, отек век и покраснение конъюнктивы, гиперемия зева и коревая энантема — красные пятна на твердом и мягком нёбе. На 2-й день болезни на слизистой щек у коренных зубов появляются мелкие белесые пятнышки, окруженные узкой красной каймой — пятна Бельского — Филатова — Коплика — патогномоничные для кори. Коревая сыпь (экзантема) появляется на 4—5-й день болезни, сначала на лице, шее, за ушами, на следующий день на туловище и на 3-й день высыпания покрывают разгибательные поверхности рук и ног, включая пальцы. Сыпь состоит из мелких папул, окруженных пятном и склонных к слиянию (в этом ее характерное отличие от краснухи — сыпь при которой не сливается).

Обратное развитие элементов сыпи начинается с 4-го дня высыпаний — температура нормализуется, сыпь темнеет, буреет, пигментируется, шелушится (в той же последовательности, что и высыпания). Пигментация сохраняется 1—1,5 недели.

**Микробиологическая диагностика.** Исследуют смыв с носоглотки, соскобы с элементов сыпи, кровь, мочу. Вирус кори можно обнаружить в патологическом материале и в зараженных культурах клеток с помощью РИФ, РТГА и реакции нейтрализации. Характерно наличие многоядерных клеток и антигенов возбудителя в них. Для серологической диагностики применяют РСК, РТГА и реакцию нейтрализации.

**Специфическая профилактика.** Активную специфическую профилактику кори проводят подкожным введением детям первого года жизни или живой коревой вакцины из аттенуированных штаммов, или ассоциированной вакцины (против кори, паротита, краснухи). В очагах кори ослабленным детям вводят нормальный иммуноглобулин человека. Препарат эффективен при введении не позднее 7-го дня инкубационного периода.

**Эпидемический паротит** (лат. parotitis epidemica: свинка, заушница) — острое доброкачественное инфекционное заболевание, с негнойным поражением железистых органов (слюнные железы, поджелудочная железа, семенники) и ЦНС, вызванное парамиксовирусом. Название «эпидемический паротит» считается устаревшим. Сейчас это заболевание чаще называют «паротит». На латыни околоушная слюнная железа называется glandula parotidea, а её воспаление — паротит; => отсюда произошло название болезни. Наиболее часто болеют дети в возрасте от 3 до 15 лет.

Заражение происходит воздушно-капельным путём (при кашле, чихании, разговоре) от больного человека, который заражен до 9-х суток.

*Возбудитель* РНК-содержащий вирус из семейства парамиксовирусов (Paramyxoviridae). Возбудитель паротита был впервые выделен и изучен в 1934 Э.Гудпасчером и К.Джонсоном.

Вирионы полиморфны, округлые вирионы имеют диаметр 120—300 нм. Однонитевая и нефрагментированная «минус» РНК кодирует 8 белков, в том числе Н-, N- и F-белки суперкапсидной оболочки. Вирус обладает гемагглютинирующей, нейраминидазной и гемолитической активностью.

После перенесённого эпидемического паротита остаётся стойкий иммунитет.

*Инкубационный период.* Больной заразен за два дня до начала болезни. Инкубационный период (от момента заражения до развития симптомов): 11 — 23 дней; чаще 13 — 19 дней

*Профилактика.* Вакцинация: ассоциированная вакцина КПК(корь, паротит, краснуха). Проводится в 12 месяцев и в 6 лет.

*Лабораторная диагностика.* Используют вирусологический и серологический методы. Выделение вируса из крови, слюны и цереброспинальной жидкости является бесспорным подтверждением диагноза. В реакции торможения гемагглютинации выявляют антитела (антигемагглютинины) к вирусу ЭП. Комплементсвязывающие антитела появляются на 2—5-й день болезни и сохраняются в сыворотке крови длительно, что позволяет использовать РСК как для ранней, так и ретроспективной диагностики. Диагностическим является нарастание титра специфических антител в 4 раза и более. При однократном серологическом обследовании в периоде реконвалесценции диагностическим считается титр 1:80 и более.

**Ветряная оспа (ветрянка)** — это инфекционное заболевание, причиной которого является вирус герпеса (Varicella-Zoster). Ветряная оспа является одной из наиболее распространенных и чрезвычайно заразных инфекций детского возраста. Возбудителем ветрянки является вирус герпеса.

Основным симптомом ветрянки у детей является появление мелких пузырчатых высыпаний на коже всего тела. Лечение ветрянки у детей заключается в обработке высыпаний зеленкой. При высокой температуре ребенку дают жаропонижающее. Чаще всего ветряной оспой болеют дети в возрасте до 10 лет. Как правило, ветрянка передается воздушно-капельным путем. Источником инфекций являются больные ветрянкой дети. Инкубационный период при ветряной оспе составляет от 10 до 23 дней. Характерным проявлением ветряной оспы у детей является сыпь. Высыпания при ветрянке у детей чаще локализуются на лице, волосистой части головы. С течением ветряной оспы высыпания появляются на всем теле. Высыпания при ветрянке представляют собой небольшие пятна красного цвета (1-5 мм). Через 2-5 дней после начала ветрянки на месте пятен появляются пузырьки (волдыри). На 7 день после начала ветряной оспы ребенок перестает быть заразным. В течение нескольких дней пузырьки лопаются и на их месте образуются корочки светлого-коричневого цвета. Как правило, высыпания при ветрянке у детей сопровождаются зудом и повышением температуры тела (до 39°C).

*Диагностика* ветрянки производится очень просто — по внешнему виду и характеру высыпаний. Диагностика ветрянки возможна после физического осмотра, который сопровождается изучением истории болезни пациента.

Для ранней лабораторной диагностики используют метод непрямой иммунофлюоресценции, а также РСК в более позднем периоде.

**Краснуха** (лат. rubella) или 3-я болезнь — эпидемическое вирусное заболевание с инкубационным периодом около 15-24 дней. Это обычно неопасное заболевание, затрагивающее в основном детей, но оно может спровоцировать серьёзные врожденные пороки, если женщина заражается в начале беременности. Название третьей болезни происходит из времен, когда был составлен список болезней, провоцирующих детскую сыпь, в котором она перечислена третьей.

После инкубационного периода 2—3 недели появляется умеренная температура с головной болью, фарингитом, шейной аденопатией, конъюнктивитом. Высыпание появляется через 48 часов, сыпь макулезная (пятнистая) не зудящая, вначале на лице, потом спускается на все тело в течение нескольких часов, вначале сыпь морбилиформная (напоминает коревую), затем скарлатиноформная. Она преобладает на лице, в области поясницы и ягодиц, разгибательных поверхностях рук, ног. Сыпь держится 2—4, изредка 5—7 дней, затем исчезает без пигментации и шелушения. Нужно отметить, что довольно часты смягченные и асимптоматичные формы.

*Патогенез.* Вирус краснухи при естественной инфекции проникает в организм через слизистые оболочки дыхательных путей, хотя в эксперименте на добровольцах удавалось вызвать заболевание и при интрадермальном введении вируса. В дальнейшем наступает вирусемия. Гематогенно вирус разносится по всему организму, обладает дерматотропными свойствами, вызывает изменения лимфатических узлов, которые увеличиваются уже в конце инкубационного периода. В это время вирус можно выделить из носоглотки. С появлением сыпи вирус в крови и в носоглотке не обнаруживается, но в некоторых случаях выделение его

продолжается 1-2 нед после высыпания. Антитела в сыворотке появляются через 1-2 дня после высыпания. В дальнейшем титр их нарастает. После перенесенного заболевания антитела сохраняются в течение всей жизни. Титр комплементсвязывающих антител постепенно снижается. Иммунитет стойкий пожизненный.

*Диагноз краснухи можно подтвердить или посредством выделения и идентификации вируса, или по нарастанию титров специфических антител. Для этой цели используют различные реакции: РСК, иммуноферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции, а также выявление специфических антител класса. Серологические реакции ставят с парными сыворотками с интервалом 10-14 дней. Диагностическим является нарастание титра антител в 4 раза и более. Выделение и идентификация вируса довольно сложны и в практической работе почти не используются.*

*Специфическая профилактика.* Используют живую ослабленную вакцину «Рудивакс», а также комбинированную вакцину против кори, эпидемического паротита, краснухи - «ММР». С целью профилактики врожденной краснухи следует вакцинировать девочек в возрасте 12-16 лет с последующей ревакцинацией серонегативных перед планируемой беременностью.

Вакцинировать беременных нельзя: беременность нежелательна в течение 3 мес. после иммунизации против краснухи (не исключается возможность поствакцинального поражения плода). Введение краснушной вакцины сопровождается выработкой у 95% иммунизированных специфических антител.

В случае контакта беременной с больным краснухой вопрос о сохранении беременности следует решать с учетом результатов 2-кратного серологического обследования (с обязательным определением количественного содержания специфических иммуноглобулинов классов М и G). При наличии у беременной стабильного титра специфических антител контакт следует считать не опасным.

#### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

#### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14**

##### **ТЕМА: ВИРУСЫ ВОЗБУДИТЕЛИ КОНТАКТНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

*(возбудители бешенства, вирусы герпеса).*

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики бешенства, герпеса.

##### **ПЛАН:**

1. Таксономия и основные биологические свойства возбудителей бешенства, вирусов герпеса.
2. Эпидемиология, патогенез, иммунитет вызываемых заболеваний.
3. Принципы микробиологической диагностики бешенства, герпеса.
4. Препараты для этиотропной терапии и специфической профилактики бешенства, герпеса.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Проведение микроскопии готовых препаратов, окрашенных по Романовскому–Гимзе, для обнаружения включений Бабеша-Негри при бешенстве (демонстрация).
2. Разбор постановки и учет результатов ИФА для серодиагностики герпеса (демонстрация).

#### **ОСНАЩЕНИЕ**

1. Демонстрация: проведение микроскопии готовых препаратов, окрашенных по Романовскому–Гимзе, для обнаружения включений Бабеша-Негри при бешенстве.

2. Демонстрация: учет результатов ИФА для серодиагностики герпеса.
3. Бакпрепараты.
4. Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Бешенство** (другие названия: рабиес (лат. rabies), устаревшее — гидрофобия, водобоязнь) — инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства Rabies virus, включённого в род Lyssavirus семейства Rhabdoviridae.

Вирус бешенства вызывает специфический энцефалит (воспаление головного мозга) у животных и человека. Передаётся со слюной при укусе больным животным. Затем, распространяясь по нервным путям, вирус достигает слюнных желёз и нервных клеток коры головного мозга, гиппокампа, бульбарных центров, и, поражая их, вызывает тяжёлые необратимые нарушения.

Выделяют 3 стадии болезни: I - начальную, II - возбуждения, III - паралитическую. Первая стадия начинается с общего недомогания, головной боли, небольшого повышения температуры тела, мышечных болей, сухости во рту, снижения аппетита, болей в горле, сухого кашля, может быть тошнота и рвота. В месте укуса появляются неприятные ощущения - жжение, покраснение, тянущие боли, зуд, повышенная чувствительность. Больной подавлен, замкнут, отказывается от еды, у него возникает необъяснимый страх, тоска, тревога, депрессия, реже - повышенная раздражительность. Характерны также бессонница, кошмары, обонятельные и зрительные галлюцинации.

*Лабораторная диагностика.* С помощью метода флуоресцирующих антител возбудитель можно обнаружить в мазках эпителия роговицы и срезах кожи из области шеи на уровне роста волос.

Положительные результаты обусловлены миграцией вируса из мозга по нервным волокнам, которыми богаты роговица и волосные фолликулы.

Серологическая диагностика возможна у больных, вышедших из острой фазы заболевания.

В крови и цереброспинальной жидкости появляются нейтрализующие антитела, концентрация которых может достигать очень высокого уровня. Используют РН, РСК, РПГА.

**Герпес** (греч. ἑρπης — ползучая, распространяющаяся кожная болезнь) — вирусное заболевание с характерным высыпанием сгруппированных пузырьков на коже и слизистых оболочках.

Простой герпес (Herpes simplex) — группа скученных пузырьков с прозрачным содержимым на воспалённом основании. Герпесу предшествует зуд, жжение кожи, иногда озноб, недомогание.

Опоясывающий лишай (Herpes zoster) — характеризуется болью по ходу нерва, головной болью. Через несколько дней на участке кожи по ходу нерва появляются высыпания в виде сгруппированных пузырьков сначала с прозрачным, а позже гнойным кровянистым содержимым. Увеличиваются лимфатические узлы, повышается температура тела, нарушается общее состояние. Невралгические боли могут держаться до нескольких месяцев.

*Патогенез.* Вирус герпеса передается непосредственным контактным путем, а также посредством предметов обихода. Возможна также передача инфекции воздушно-капельным путем. Герпес проникает через слизистые оболочки полости рта, верхних дыхательных путей и половых органов. Преодолев тканевые барьеры, вирус попадает в кровь и лимфу. Затем попадает в различные внутренние органы.

Вирус проникает в чувствительные нервные окончания и встраивается в генетический аппарат нервных клеток. После этого удалить вирус из организма невозможно, он останется с человеком на всю жизнь. Иммунная система реагирует на проникновение герпеса выработкой специфических антител, блокирующих циркулирующие в крови вирусные частицы. Характерно пробуждение инфекции в холодное время года, при простудных заболеваниях, при гиповитаминозе. Размножение герпеса в клетках эпителия кожи и слизистых оболочек приводит к развитию дистрофии и гибели клеток.

Согласно исследованиям учёных Колумбийского университета, герпес является стимулирующим фактором для развития болезни Альцгеймера. Позднее эти данные были независимо подтверждены исследователями из Манчестерского университета. Ранее та же группа исследователей под руководством Рут Ицхаки доказала, что вирус простого герпеса обнаруживается в мозге почти 70 % пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, они подтвердили, что при инфицировании вирусом культуры клеток мозга происходит значительное увеличение уровня бета-амилоида, из которого и формируются бляшки. В ходе последнего исследования ученые смогли выяснить, что 90 % бляшек в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера содержат ДНК простого герпеса — ВПГ-1.

Для диагностики герпетической инфекции используются все лабораторные реакции — от цитологических исследований до молекулярно-биологических методов.

Материалом для выделения вируса с целью диагностики герпетической инфекции может служить содержимое герпетических пузырьков, соскобы с роговой оболочки и жидкости из передней камеры глаза, кровь, слюна, моча, спинномозговая жидкость фекалии кусочки ткани мозга, печени, почек, селезенки, легких лимфатические узлы, взятые на био- или аутопсии.

Инфекционный материал можно длительно хранить при -70°C, тогда как при температуре -20°C он быстро инактивируется. Вирусосодержащие ткани могут быть сохранены более 6 месяцев при 4°C, если они находятся в 50% растворе глицерина.

Существует целый ряд специальных методов для выявления вирусных антигенов, специфических антител и вирусиндуцированных морфологически измененных клеток.

Наиболее доступным и технически несложным является цитологический метод, позволяющий изучить морфологические изменения в клетках, инфицированных вирусом простого герпеса. Эффективность метода зависит от получения достаточного количества клеток для исследования. Наличие внутриядерных включений, характерных для репродукции вируса герпеса, служит подтверждением диагноза. Следует помнить, что внутриядерные включения обнаруживаются только после немедленной фиксации мазков соскоба в абсолютном спирте с последующей окраской по Романовскому-Гимзе. Морфологические изменения, индуцируемые вирусом простого герпеса, можно также обнаружить в срезах тканей инфицированных органов. Характерным для герпетической инфекции является: наличие многоядерных клеток, внутриядерных включений и в некоторых случаях геморрагии. При генерализованной форме заболевания многоядерные клетки с эозинофильными включениями находят в зонах некротизированных тканей различных органов (мозг, печень, почки, надпочечники, эпителий бронхов и трахеи).

Метод иммунофлуоресценции — является методом экспресс-диагностики герпетической инфекции и позволяет в течение 1-2 часов определять наличие герпесвирусных антигенов в клиническом материале (соскоб с кожи и слизистых оболочек, срезы биопсированных органов). Идентификация антигенов вируса простого герпеса может быть выполнена в различных модификациях метода иммунофлуоресценции — прямой, непрямой, с применением меченого комплемента.

Из серологических методов идентификации наиболее часто используют реакцию связывания комплемента (РСК), особенно в микромодификации ее постановки. Микрометоды используют и для выявления вируса простого герпеса в реакциях нейтрализации, пассивной гемагглютинации и в других серологических тестах. Чувствительность перечисленных методик различна.

В настоящее время одним из наиболее чувствительных методов диагностики герпетической инфекции является метод иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий обнаруживать, в зависимости от вида биологического материала, как вирусспецифические антигены, так и вирусспецифические антитела класса IgM, IgG.

#### ХРОНОМЕТРАЖ

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

#### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №15

##### **ТЕМА: ВИРУСЫ–ВОЗБУДИТЕЛИ КРОВЯНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

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

##### **СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: «ВИРУСЫ -ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА».**

##### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам вирусологической диагностики и специфической профилактики гепатитов В,С,Д,Е, 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).

## ***ОСНАЩЕНИЕ***

- 1.Демонстрация: учет результатов реакции ИФА для серодиагностики и сероидентификации при гепатитов 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 непременным 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 - HBs антигеном (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- антигемии: 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 – C22-3; C33с, C100-3, C200, 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.

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 ней.

**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 неустоек 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, «разделение» РНК. Затем в клетке начинается репликация РНК и белков капсида, формируется зрелый вирион. Путём 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 нм. 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  $t^{\circ}$  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                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45 мин. |
| 3. Проверка протоколов                                | 10 мин. |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10 мин. |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16

**ТЕМА:** **МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДЫ, ВОЗДУХА, АПТЕЧНОЙ ПОСУДЫ.**

### Учебная цель:

1. Обучить студентов методам микробиологического контроля воды, воздуха, аптечной посуды.

### ПЛАН:

9. Методы микробиологического контроля воды.

10. Исследование общей микробной обсемененности дистиллированной воды, используемой для приготовления инъекционных растворов в соответствии с требованиями Фармакопеи.
11. Методы микробиологического контроля воздуха.
12. Методы микробиологического контроля аптечной посуды.

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

#### 2. 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.

#### 3. 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<br>(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<br>Число микробов в 1м <sup>3</sup> |
|----------------------------------------------------|--------------|------------|-----------------------------------------------|
| 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<sup>3</sup>. Наличие бактерий группы БГКП в дистиллированной воде не допускается.

*Вода дистиллированная* для приготовления инъекционных растворов и глазных капель. Отбор проб проводят в стерильные флаконы в объёме 15—20мл непосредственно из тех емкостей, в которых осуществляют стерилизацию.

*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" сырье 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.

- Инъекционные растворы до стерилизации отбирают во время их приготовления, но не позднее 1,5 ч и доставляют в тех флаконах, в которых их будут стерилизовать.
- Инъекционные растворы, глазные капли после стерилизации и приготовленные асептическим способом доставляют в аптечной упаковке.

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17**

**ТЕМА: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.  
ВОЗДУХА, АПТЕЧНОЙ ПОСУДЫ.**

#### **Учебная цель:**

1. Обучить студентов методам микробиологического контроля различных форм стерильных готовых лекарственных средств: испытанию стерильности готовых лекарственных форм, испытанию стерильности стерильных готовых лекарственных форм.

#### **ПЛАН:**

1. Источники и пути микробного загрязнения готовых лекарственных средств.
2. Основные методы микробиологического контроля различных форм стерильных готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм, испытание стерильности стерильных готовых лекарственных форм.

#### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

1. Проведение микробиологического исследования стерильных готовых лекарственных средств.

## ОСНАЩЕНИЕ

1. Набор для бактериологического исследования:
  - Штатив – 8 шт.
  - Пинцет -8 шт.
  - Бактериологическая петля -8 шт.
  - Флакон с физ.р-ром – 8шт.
  - Спиртовка -8 шт.
  - Лоток с подставкой- 8шт.
2. Глазные капли – 4шт.
3. Стерильные пипетки – 8шт.
4. Среда Сабуро – 4шт.
5. Тиогликолевая среда – 4 пробирок.
6. Пробирки со скошенным МПА- 4шт.
7. Пробирки с мясопептонным сахарным бульоном- 4шт.
8. Среда Китта- Тароцци – 4шт.
9. Демонстрация питательных сред: Сабуро, Китта-Тароцци, МПА, МПБ, тиогликолевая, глюкозный бульон.
10. Таблицы.
- 11.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### ***Бактериологическое исследование стерильных лекарственных средств:***

Инъекционные растворы, глазные капли, лекарственные средства для новорожденных, другие лекарственные препараты, стерилизуемые в процессе их изготовления, засевают неразведенными в тиогликолевую среду для определения микробной обсемененности и среду Сабуро для выявления дрожжевых и плесневых грибов. Посевы на тиогликолевой среде выдерживают 14 суток при 37<sup>0</sup>С, на среде Сабуро 14 суток при 24<sup>0</sup>С. Учет результатов посевов проводят по отсутствию видимых изменений в посевах.

*Например:* Перед посевом ампулы (флаконы) протирают спиртом и обжигают в пламени горелки. Из вскрытых в стерильных условиях ампул (флаконов) стерильной пипеткой набирают 0,5—1 мл материала и высевают в пробирки или колбочки с мясопептонным сахарным или глюкозным бульоном, вводя пипетку до дна. На скошенный МПА делают высеv штрихом бактериологической петлей.

Для выявления анаэробов посев проводят в полужидкий МПА или среду Китта-Тароцци; для обнаружения плесневых грибов и дрожжей — на среду Сабуро и бульон.

Посевы для выявления аэробов и анаэробов культивируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 8 сут, а для выявления плесневых грибов и дрожжей — при 22—25<sup>0</sup>С.

Посевы ежедневно проверяют. При обнаружении роста на средах, засеянных из неразлитой продукции, повторно исследуют удвоенное количество образцов. Из пробирок с проросшими микробами, готовят мазки и окрашивают их по Граму для изучения морфологии микробов, вызвавших загрязнение препаратов. При наличии роста микробов хотя бы в одной пробирке проводят дополнительные повторные исследования. В случае повторного прорастания в средах тех же микробов, что и в первый раз, препарат считают нестерильным. При обнаружении роста из разлитой и фасованной продукции посевы проводят также из удвоенного количества образцов. При обнаружении роста при повторном контроле в отдельных пробирках допускается исследование препарата в третий раз. В случае роста при третьем испытании, хотя бы в отдельных пробирках, препарат считается нестерильным.

Масляные растворы препаратов в количестве 1 мл перед посевом эмульгируют встряхиванием с бусами в 5 мл стерильного физиологического раствора. По 1 мл полученной взвеси высевают в пробирки с 10 мл МПБ с 0,5% глюкозы, со скошенным МПА и со средой Сабуро. Все посевы, кроме посева на среду Сабуро, выдерживают при 37<sup>0</sup>С в течение 8 сут. Посевы на среде Сабуро выдерживают при 22<sup>0</sup>С. При посеве суспензий из препарата питательная среда мутнеет или выпадает осадок. Такие посевы выдерживают в термостате в течение 3 сут, а затем высевают по 1 мл в пробирки с аналогичными незасеянными средами и ставят в термостат на 5 сут, инкубируют при 37<sup>0</sup>С.

Стерильными считаются препараты, посевы которых не дали роста ни в одной пробирке (флаконе) через 8 сут с начала посева или через 5 сут с момента посева.

### ***4.6. Определение пирогенности:***

Пирогенность (повышение температуры тела) обусловлена наличием в стерильных лекарственных препаратах продуктов распада бактерий (липополисахаридов). Стерильные инъекционные растворы должны быть апиогенны.

Определение пирогенности проводят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, весом 2,5-3,0 кг, содержащихся на полноценном рационе. Испытуемую дистиллированную воду или лекарственные средства вводят трем кроликам в ушную вену в количествах и растворителях, предусмотренных соответствующими инструкциями.

Воду для инъекций и раствор лекарственного средства считают непирогенными если сумма повышений температуры у 3 кроликов меньше или равна  $1,4^{\circ}\text{C}$ . Если сумма превышает  $2,2^{\circ}\text{C}$ , то испытуемые растворы считают пирогенными. В случаях, когда сумма повышений температуры у 3 кроликов находится в пределах от  $1,5$  до  $2,2^{\circ}\text{C}$ , испытание проводят на 5 кроликах. В этом случае раствор считают непирогенным, если сумма повышений температуры у всех 8 кроликов не превышает  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18**

**ТЕМА: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.**

**СДАЧА МОДУЛЯ ПО ТЕМЕ: « ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ».**

#### **Учебная цель:**

- 1.Обучить студентов методам микробиологического контроля различных форм нестерильных готовых лекарственных средств: испытанию стерильности готовых лекарственных форм, испытанию чистоты нестерильных готовых лекарственных форм.

#### **ПЛАН:**

1. Основные методы микробиологического контроля различных форм нестерильных готовых лекарственных средств: испытание стерильности готовых лекарственных форм.
2. Испытание микробной чистоты нестерильных готовых лекарственных форм.
3. Допустимые нормы микробной обсемененности различных форм нестерильных готовых лекарственных средств в соответствии с нормативными документами.
4. Сдача модуля.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА**

- 1.Разбор схемы микробиологическое исследование нестерильных готовых лекарственных средств (демонстрация).
- 2.Оформление протокола исследования нестерильных готовых лекарственных средств.

### **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. Мазь или паста -4шт.
3. Пробирки с 10 мл стерильного 1,4% раствора натрия гидрокарбоната для диспергирования.
4. Чашки Петри с МПА – 4шт (демонстрация).
5. Чашки Петри со средой Сабуро – 4шт (демонстрация).
6. Чашки Петри со средой Эндо – 4шт (демонстрация).

7. Чашки Петри со средой висмут -сульфитный агар - 4шт(демонстрация).
8. Чашки Петри со средой ЖСА – 4шт(демонстрация).
9. Чашки Петри со средой кровяной агар – 4шт(демонстрация).
10. Таблицы.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### **Определение микробной обсемененности готовых лекарств:**

Жидкие лекарственные формы разводят стерильным физиологическим раствором 1:10 (или 1:100) и засевают в объеме 0,5 мл на МПА в чашке Петри. 1г порошка или таблеток помещают в пробирку с 10 мл физиологического раствора и после растворения производят посев на МПА.

Мягкие лекарственные формы (мази, пасты) в количестве 1 г взвешивают в асептических условиях, переносят в пробирки с 10 мл стерильного 1,4% раствора натрия гидрокарбоната для диспергирования, которое производят вращательным движением пробирки между ладонями в течение 2-4 мин., 0,5 мл полученного раствора засевают на МПА в чашках Петри. Чашки с посевами помещают в термостат на 48 ч, затем подсчитывают число колоний и определяют количество бактерий в 1 мл или 1 г образца.

#### **4.4. Определение общего количества грибов:**

Определение общего количества грибов проводят на твердой среде Сабуро, на которую засевают 0,5 мл цельного или разведенного 1:10 препарата. Посевы инкубируют при 24<sup>0</sup>С в течение 5 суток, затем подсчитывают число выросших колоний и определяют количество грибов в 1 мл (1 г) препарата.

#### **4.5. Качественное определение условно - патогенных и патогенных микроорганизмов:**

1. Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella).

Посев лекарственных средств производят на среду Эндо и висмут -сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамтрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae.

2. Определение патогенных стафилококков.

Определение патогенных стафилококков производят посевом на кровяной (КА) и желточно - солевой агары (ЖСА). Посевы инкубируют в течение суток при 37С. На следующий день исследуют выросшие колонии на средах. На КА отмечают наличие или отсутствие гемолиза. На ЖСА – вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с радужным венчиком по периферии и перламутровым оттенком. Выделенную чистую культуру исследуют на наличие плазмокоагулазы. Для постановки реакции на плазмокоагулазу плазму крови, разведенную в 2 раза, разливают по 0,4мл в пробирки, вносят туда по одной петле каждой исследуемой культуры стафилококка и помещают в термостат при 37 С. Через 2, 4 и 24 ч отмечают результаты опыта. При наличии плазмокоагулазы образуется сгусток. В некоторых случаях наряду с плазмокоагулазой и лецитиназой определяют фибринолизин, гиалуронидазу и ДНК-азу.

3. Выявление *Pseudomonas aeruginosa*.

При исследовании воды очищенной инъекционных растворов до стерилизации, глазных капель, смывов с аптечного стекла, инвентаря, оборудования и рук персонала иногда отмечается рост синегнойной палочки, для выделения которой специальные посевы можно не производить, так как рост их колоний удается обнаружить на среде Эндо или питательном агаре. На среде Эндо колонии плоские желтовато-красные, без металлического блеска, со специфическим запахом. На питательном агаре колонии расплывчатые, с просвечивающим краем; среда приобретает зеленоватый цвет. При окраске по Граму палочки грамотрицательные. С целью обнаружения способности продуцировать пигмент, культуры изучают на питательном агаре с добавлением 2% глицерина или маннита. Синегнойная палочка на этой среде образует зеленоватые флуоресцирующие колонии, выделяющие в среду сине - зеленый пигмент.

Идентификация синегнойной палочки проводится по следующим тестам:

- положительная реакция на оксидазу;
- рост на среде Симмонса;
- разжижение желатина;
- рост на бульоне при температуре 42<sup>0</sup>С;
- отсутствие роста на среде с содержанием хлорида натрия 6,5%.

4. Выявление протей. Производят посевом на МПА по Шукевичу.

Специального посева для выявления этих бактерий можно не проводить, т.к. их удастся обнаружить на среде Эндо в виде ползучего вуалеобразного роста. В случае выделения бактерий рода Протея необходимо проводить их видовую идентификацию с применением среды Гисса с мальтозой и изучением способности образовывать индол. Эти тесты дают возможность идентифицировать протейс вульгарис и протейс мирабилис.

Наличие условно - патогенных и патогенных микроорганизмов в лекарственных препаратах недопустимо.

### **Методика определения микробной загрязненности не инъекционных лекарственных средств**

Для определения микробной загрязненности препарат вносят в питательные среды в разведении 1:5, 1:10, 1:100. Чтобы избежать изменение pH среды, разведение препарата делают в 0,1М фосфатном буферном растворе с pH 7,0. Для определения сапрофитных бактерий препарат вносят в среду в разведении 1:10 и 1:100, для определения грибов – в разведении 1:5 и 1:10. Все другие группы микроорганизмов определяют при разведении препарата 1:10. Для определения всех групп микроорганизмов в жидкие и агаризованные питательные среды, кроме накопительных вносят по 0,5 мл разведенного препарата. В накопительные среды добавляют по 10 мл разведенного препарата на 100 мл среды.

Количество сапрофитных бактерий определяют путем посева препарата на мясопептонный агар, количество грибов – на агаризованную среду Сабуро. Посевы инкубируют в течение 48 часов при 37<sup>0</sup> и в течение 5 сут. При 22<sup>0</sup> соответственно.

Определение бактерий рода Escherichia производят на лактозном бульоне следующего состава: пептон – 5г, лактоза – 5г, гидролизат Хоттингера (150 мг/% аминокислотного азота) или мясная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации 6,7. Посевы инкубируют в течение 24 ч. при 37<sup>0</sup>. При образовании газа в лактозном бульоне и наличии в мазках грамотрицательных палочек делают высеv лактозного бульона на дифференциальную среду Эндо.

Для определения бактерий родов Salmonella и Shigella препарат вносят в среду Киллиана с последующим высеvом после инкубирования в течение 24 ч при 37<sup>0</sup>С на дифференциальные среды Левина и Плоскирева. Дальнейшую идентификацию бактерий родов Escherichia, Salmonella и Shigella производят после изучения их биохимических свойств.

Для определения бактерий рода Proteus препарат высеvают на свежеприготовленный скошенный агар по методу Шукевича. Через 24 ч инкубирования выросшие микроорганизмы для окончательной дифференциации переносят в пробирки, содержащие жидкую среду с мочевиной. Среда для определения бактерий рода Proteus содержит : дигидрофосфат калия – 9,1, гидрофосфат натрия – 9,5, мочевины- 20г, феноловый красный – 0,01г, дистиллированную воду – до 1000 мл; pH после стерилизации – 6,8. Бактерии рода Proteus разлагают мочевину через 24ч, с образованием при этом аммиака, который изменяет желтый цвет среды в красный.

Для определения патогенных стафилококков и синегнойной палочки препарат вносят в накопительную среду следующего состава: дрожжевой экстракт – 5г, кислотный гидролизат казеина – 20 г, хлорид натрия – 5 г, пептон – 10 г, глюкоза – 2 г, гидрофосфат калия – 2,5 г, дистиллированная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,2-7,4.

Через 24ч инкубирования при температуре 37<sup>0</sup>С накопительную среду высеvают на маннитно-солевой агар и среду для определения Ps. Aeruginosa. Маннитно-солевой агар применяют для дифференциации патогенных стафилококков и готовят согласно прописи: пептон – 10 г, хлорид натрия – 75 г, D-маннит – 10 г, феноловый красный – 0,025 г, мясопептонный бульон – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,4.

Рост посторонней микрофлоры угнетается в результате присутствия в среде 7,5% хлорида натрия. Патогенные стафилококки растут на ней, образуя колонии, окруженные желтыми зонами. Поскольку наиболее достоверным признаком патогенности для стафилококков в настоящее время считается способность коагулировать плазму крови, изучаются плазмокоагулирующие свойства стафилококков, образовавших желтые зоны при росте на маннитно-солевом агаре. Для этого петлю 24-часовой агаровой культуры вносят в пробирку с 0,5 мл плазмы крови кролика, разведенного в 5 раз 0,9% раствором хлорида натрия, и инкубируют при 37<sup>0</sup> в течение 1-24 ч. Дифференциальная среда для Ps. Aeruginosa проста по составу и основана на способности этого микроорганизма образовывать сине-зеленый пигмент: пептон – 20 г, глицерин – 10 г, гидрофосфат калия – 1,5 г, сульфат магния – 1,5 г, агар-агар – 15-20 г, дистиллированная вода – до 1000 мл; pH после стерилизации – 7,3

Разработанная НИИ по стандартизации и контролю лекарственных средств Министерства здравоохранения РФ схема может быть использована для определения микробной загрязненности всех форм лекарственных препаратов, не оказывающих антимикробное действие.

Схема может быть использована для определения микробной загрязненности препаратов, оказывающих антимикробное действие, после инактивации этих препаратов тем или иным методом.

### **ХРОНОМЕТРАЖ**

- |                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| 1. Определение исходного уровня знаний                | 25 мин. |
| 2. Самостоятельная работа                             | 45мин.  |
| 3. Проверка протоколов                                | 10мин.  |
| 4. Уборка рабочего стола                              | 10мин.  |
| 5. Контроль конечного уровня знаний и задание на дом. | 15 мин. |

**Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

---

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

**ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ  
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО  
ФАКУЛЬТЕТА  
ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

**(ЧАСТЬ I)**

## МОДУЛЬ №1

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. С именем какого ученого связано открытие сущности брожения (1857), микробной обусловленности и заразности инфекционных болезней (1881), методов изготовления вакцин и способов профилактики куриной холеры, сибирской язвы и бешенства (1882-1885)?
  - а) Левенгук
  - б) Мечников
  - в) Кох
  - г) Пастер
2. Какие микроорганизмы относятся к грамположительным?
  - а) гонококки
  - б) кишечная палочка
  - в) менингококки
  - г) стрептококки
3. Для обнаружения капсулы у бактерий в чистой культуре используют окраску:
  - а) простая
  - б) по Бурри
  - в) по Граму
  - г) по Бурри-Гинсу
4. Какие структуры относят к внутриклеточным включениям бактерий?
  - а) ядро
  - б) митохондрии
  - в) зерна волютина
  - г) комплекс Гольджи
5. Для обнаружения спор у бактерий используют окраску:
  - а) по Нейссеру
  - б) по Романовскому-Гимзе
  - в) по Бурри-Гинсу
  - г) по Ожешки
6. Какие микроорганизмы относятся к извитым формам?
  - а) стрептококки
  - б) стафилококки
  - в) бациллы
  - г) спирохеты
7. Кислотоустойчивость бактерий обусловлена наличием:
  - а) нуклеиновых кислот
  - б) капсулы
  - в) высоким содержанием липидов
  - г) рибосом
8. Какая структура у бактерий выполняет функцию синтеза белка?
  - а) мезосома
  - б) рибосома
  - в) нуклеотид
  - г) плазида
9. Спорообразующие микроорганизмы:
  - а) вибрионы
  - б) клостридии
  - в) стафилококки
  - г) менингококки
10. К прокариотам относятся:

- а) грибы
- б) бактерии
- в) вирусы
- г) простейшие

11. Простейшие

- а) относятся к прокариотам
- б) имеют нуклеоид
- в) относятся к эукариотам
- г) не имеют ядерную мембрану

12. Какие особенности характерны для капсулы у бактерий?

- а) обязательная оболочка
- б) выполняет защитную функцию
- в) содержит тейхоевые кислоты
- г) выявляется по методу Бурри

13. К неклеточной форме микробов относят:

- а) бактерии
- б) прионы
- в) простейшие
- г) грибы

14. К дрожжеподобным грибам относятся:

- а) мукор
- б) дрожжи
- в) кандида
- г) аспергилл

15. Нитчатый гриб, образующий эндоспоры:

- а) аспергилл
- б) дрожжи
- в) пеницилл
- г) мукор

16. Размножение вирусов происходит путем:

- а) бинарного деления
- б) дисъюнктивной репродукции
- в) почкования
- г) спорообразования

17. Обязательный структурный компонент бактериальной клетки:

- а) капсула
- б) спора
- в) нуклеоид
- г) жгутики

### **СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

- |                |                                            |
|----------------|--------------------------------------------|
| 18. Вироиды    | а) прокариоты                              |
| 19. Простейшие | б) неклеточные формы микробов              |
| 20. Грибы      | в) эукариоты                               |
| 21. Прионы     | г) не относятся ни к какой группе микробов |

## МОДУЛЬ №1

### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Кто является одним из основоположников иммунологического этапа развития микробиологии и создателем фагоцитарной теории иммунитета?
  - а) Безредка
  - б) Пастер
  - в) Кох
  - г) Мечников
2. Какие методы окраски относятся к сложным, дифференциально-диагностическим?
  - а) по Цилю-Нильсену
  - б) метиленовым синим
  - в) по Бурри
  - г) разведенным карболовым фуксином
3. Какие микроорганизмы относятся к грамотрицательным?
  - а) стафилококки
  - б) пневмококки
  - в) клостридии
  - г) гонококки
4. Для обнаружения капсулы у бактерий применяют:
  - а) окраску по Бурри-Гинсу
  - б) окраску по Романовскому-Гимзе
  - в) окраску по Цилю-Нильсену
  - г) окраску по Граму
5. Какие бактерии относятся к спорообразующим?
  - а) сарцины
  - б) микобактерии
  - в) бациллы
  - г) спирохеты
6. Дифференциальная окраска бактерий по Граму обусловлена структурой:
  - а) цитоплазматической мембраны
  - б) клеточной стенки
  - в) нуклеоида
  - г) капсулы
7. Какой метод исследования используют для изучения подвижности бактерий?
  - а) окраска фуксином
  - б) метод Нейссера
  - в) метод Циля-Нильсена
  - г) фазово-контрастная микроскопия
8. Каким образом устроена клетка простейших?
  - а) как прокариотическая клетка
  - б) содержит оформленное ядро с ядерной мембраной
  - в) не сложнее, чем клетка бактерий
  - г) как у вирусов
9. Какие микробы не имеют клеточного строения?
  - а) вирусы
  - б) простейшие
  - в) бактерии
  - г) грибы
10. К прокариотам относятся:
  - а) простейшие
  - б) грибы

- в) бактерии
- г) прионы

11. Прокариоты характеризуются:

- а) отсутствием клеточной стенки
- б) отсутствием цитоплазматической мембраны
- в) отсутствием ядерной мембраны
- г) отсутствием рибосом

12. Какие особенности характерны для мезосом у бактерий?

- а) образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму
- б) выполняют функции пищеварительной вакуоли
- в) синтезируют белок
- г) выявляют по методу Циля-Нильсена

13. Нитчатые грибы, образующие экзоспores:

- а) мукор
- б) пеницилл
- в) дрожжеподобные грибы
- г) дрожжи

14. Сложноорганизованный вирус:

- а) содержит два типа нуклеиновой кислоты
- б) содержит один тип нуклеиновой кислоты (либо ДНК, либо РНК)
- в) не содержит суперкапсид
- г) не содержит капсид

15. К гифальным (плесневым) грибам относятся:

- а) кандида
- б) мукор
- в) дрожжи
- г) дрожжеподобные грибы

16. Как называются бактерии, имеющие много жгутиков вокруг клетки?

- а) лофотрихи
- б) перитрихи
- в) монотрихи
- г) амфитрихи

17. Подвижность бактерий определяют методом:

- а) Циля-Нильсена
- б) Нейссера
- в) Ожешко
- г) «висячей капли»

### **СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

18. Функцию движения у бактерий осуществляют:

19. Адгезию бактерий к клеткам осуществляют:

- а. Порины
- б. Включения
- с. Жгутики
- д. Пили

20. Внеклеточная форма существования вирусов: а. Капсид

21. Вирус бактерий

- б. Капсомер
- с. Вирион
- д. Бактериофаг

## МОДУЛЬ №2

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Для осуществления активного транспорта веществ в бактериальную клетку, необходимо присутствие:  
а) транскриптазы  
б) пермеазы  
в) гиалуронидазы  
г) нейроминидазы
2. Для получения плотной консистенции питательных сред используют:  
а) углеводы  
б) агар-агар  
в) белки  
г) ферменты
3. Среда тиогликолевая служит для выделения:  
а) облигатных аэробов  
б) облигатных анаэробов  
в) факультативных аэробов  
г) факультативных анаэробов
4. Оптимальной температурой для выращивания большинства патогенных микробов является:  
а) 20°C  
б) 30°C  
в) 37°C  
г) 39°C
5. Культуральные свойства бактерий:  
а) форма, строение бактериальной клетки  
б) характер роста бактерий на питательных средах  
в) способность вызывать инфекцию  
г) способность окрашиваться
6. Для биохимической идентификации бактерий изучают:  
а) чувствительность бактерий к антибиотикам  
б) антигенную структуру бактерий  
в) морфологические свойства  
г) сахаролитические и протеолитические свойства
7. Вирусы культивируются:  
а) в среде 199  
б) на МПА  
в) в МПБ  
г) в культуре клеток «Hella»
8. Видимые под микроскопом морфологические изменения клеток вплоть до их гибели, возникающие в результате повреждающего действия вирусов, являются признаком:  
а) феномена гемадсорбции  
б) цитопатического эффекта  
в) феномена гемагглютинации  
г) «цветной реакции»
9. Элективными называются питательные среды:  
а) применяемые для выращивания многих бактерий  
б) применяемые для избирательного выделения и накопления микробов определенного вида  
в) применяемые для разграничения отдельных видов (или групп) микробов  
г) жидкие среды
10. Для культивирования аэробов используют:  
а) анаэрогат

- б) печь Пастера
- в) автоклав
- г) термостат

11. Для какой цели используют бактериофаги при постановке бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний?
  - а) для биохимической идентификации бактерий
  - б) для фаготипирования бактерий
  - в) для определения антибиотикочувствительности бактерий
  - г) для серотипирования бактерий
12. Целью бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний является:
  - а) изучение морфологии микробов
  - б) выделение чистой культуры микробов с последующей идентификацией
  - в) обнаружение антител в сыворотке обследуемого
  - г) определение антибиотикочувствительности микробов
13. Метод выделения чистой культуры подвижных микроорганизмов:
  - а) метод Дригальского
  - б) метод Шюкевича
  - в) метод Коха
  - г) метод пластинчатых разведений
14. Метод создания анаэробных условий:
  - а) метод Коха
  - б) метод перчаточного бокса
  - в) метод Грация
  - г) метод бумажных дисков
15. Сахаролитические свойства чистой культуры микроорганизмов изучают:
  - а) на кровяном агаре
  - б) на среде Гисса
  - в) на МПБ
  - г) на МПА
16. Микроорганизмы, питающиеся за счет готовых органических соединений:
  - а) литотрофы
  - б) ауксотрофы
  - в) прототрофы
  - г) гетеротрофы
17. К простой питательной среде относится:
  - а) кровяной агар
  - б) МПА
  - в) сывороточный агар
  - г) среда 199

#### **СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС- ОТВЕТ**

- |                                                      |                            |
|------------------------------------------------------|----------------------------|
| 18. Используют неорганический источник углерода      | А) фототрофы               |
| 19. Используют органический источник водорода        | б) хемотрофы               |
| 20. Энергию получают в результате химических реакций | в) аутотрофы               |
|                                                      | г) органотрофы             |
|                                                      |                            |
| 21. Энергию получают брожением                       | а) строгие анаэробы        |
|                                                      | б) факультативные анаэробы |
|                                                      | в) оба                     |

## МОДУЛЬ №2

### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Все микробы по способности усваивать источники углерода делятся на:
  - а) фототрофы и хемотротрофы
  - б) аутоотрофы и гетеротрофы
  - в) аэробы и анаэробы
  - г) прототрофы и ауксотрофы
2. Микробы, использующие неорганические источники водорода и нуждающиеся в химических источниках энергии, называются:
  - а) фотолитотрофами
  - б) фотоорганотрофами
  - в) хемолитотрофами
  - г) хемоорганотрофами
3. Плотность питательных сред зависит от содержания:
  - а) сыворотки крови
  - б) сахарозы
  - в) агар-агара
  - г) пептона
4. Селективные/элективные питательные среды можно использовать для:
  - а) выделения определенного вида микробов
  - б) изучения протеолитических свойств микробов
  - в) разграничения отдельных видов микробов
  - г) изучения сахаролитических ферментов микробов
5. Какая задача решается на третьем этапе бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний?
  - а) выделение чистой культуры микроорганизмов
  - б) заключение о выделенной культуре микроорганизмов
  - в) идентификация выделенной чистой культуры микроорганизмов
  - г) изучение характера роста микроорганизмов на питательной среде
6. Для культивирования вирусов используют:
  - а) куриный эмбрион
  - б) среду Игла
  - в) МПА
  - г) кровяной агар
7. Характер цитопатического действия вирусов:
  - а) «цветная проба»
  - б) образование монослоя клеток
  - в) образование симпластов
  - г) все неверно
8. Микроорганизмы, не нуждающиеся в факторах роста:
  - а) органотрофы
  - б) гетеротрофы
  - в) литотрофы
  - г) прототрофы
9. Расположите в нужной последовательности действия при бактериологическом методе исследования:
  - а) посев чистой культуры в среды Гисса
  - б) получение изолированных колоний
  - в) оценка результатов идентификации чистой культуры микробов
  - г) получение чистой культуры микробов
10. Анаэробы культивируют в среде:
  - а) МПА, МПБ
  - б) Кита-Тароцци
  - в) Плоскирева
  - г) Гисса
11. Тинкториальные свойства бактерий-это:
  - а) характер роста бактерий на питательных средах
  - б) способность разлагать белки и углеводы
  - в) способность окрашиваться
  - г) строение бактерий
12. Какой метод используют для механического разобщения микроорганизмов при посеве на питательные среды?
  - а) метод Шукевича

- б) метод Дригальского
  - в) метод Грация
  - г) метод Форнера
13. Фаговары-это варианты внутри данного вида бактерий, различающиеся по:
- а) биохимическим свойствам
  - б) антигенным свойствам
  - в) чувствительности к антибиотикам
  - г) чувствительности к фагам
14. Метод Цейслера используют для:
- а) определения чувствительности бактерий к бактериофагу
  - б) выделения чистой культуры аэробов
  - в) выделения чистой культуры анаэробов
  - г) создания аэробных условий
15. Большинство патогенных микроорганизмов относятся к:
- а) психрофилам
  - б) мезофилам
  - в) микроаэрофилам
  - г) термофилам
16. Для бактериофагов характерно:
- а) размножение бинарным делением
  - б) рост и размножение на питательных средах
  - в) размножение в клетках бактерий
  - г) анаэробный тип дыхания
17. Токсическое действие молекулярного кислорода на облигатные анаэробы обусловлено накоплением:
- а) углекислоты
  - б) кислородных радикалов
  - в) конечных продуктов брожения
  - г) пирувата

**СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС- ОТВЕТ**

- |                                                                                             |                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 18. При каком типе дыхания конечным акцептором электронов является органическое соединение? | а) аэробном<br>б) брожении              |
| 19. Гибнут в присутствии кислорода:                                                         | а) строгие аэробы                       |
| 20. Энергию получают только брожением:                                                      | б) факультативные анаэробы              |
| 21. Могут менять тип дыхания:                                                               | в) строгие анаэробы<br>г) микроаэрофилы |

## МОДУЛЬ №3

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Процесс генетических рекомбинаций, в котором участвует бактериофаг:
  1. Конъюгация
  2. Трансформация
  3. Трансдукция
  4. Модификация
2. Чувствительность бактерий к антибиотикам определяют методом:
  1. Мембранных фильтров
  2. Серийных разведений
  3. Титрования по Грациа
  4. Седиментационным
3. Фенотипическая изменчивость бактерий обусловлена:
  1. Мутацией
  2. Трансформацией
  3. Трансдукцией
  4. Модификацией
4. Один из механизмов возникновения антибиотикочувствительности бактерий обусловлен:
  1. F-плазмидами
  2. R-плазмидами
  3. Плазмидами бактериоциногенности
  4. Тох-плазмидами
5. К противогрибковому антибиотику относится:
  1. Пенициллин
  2. Нистатин
  3. Тетрациклин
  4. Эритромицин
6. К антибиотикам – макролидам относят:
  1. Стрептомицин
  2. Тетрациклин
  3. Эритромицин
  4. Цефалоспорин
7. Побочное действие  $\beta$ -лактамовых антибиотиков:
  1. Нефротоксическое действие
  2. Аллергические реакции
  3. Необратимое поражение слухового нерва
  4. Эмбриотоксическое действие
8. К генетическим рекомбинациям относится:
  1. Плазмиды
  2. Транспозоны
  3. Трансформация
  4. Модификация
9. К внехромосомным факторам наследственности относятся:
  1. Мезосомы
  2. Рибосомы
  3. Споры
  4. Плазмиды
10. Процесс восстановления клеточного генома называется:
  1. Модификацией

2. Трансдукцией
3. Диссоциацией
4. Репарацией

11. В организме человека в норме стерильны:

1. Желудок
2. Верхние дыхательные пути
3. Кровь
4. Тонкий кишечник

12. Наиболее высокой бактериальной обсемененностью характеризуется:

1. Мочевой пузырь
2. Желудок
3. Толстый кишечник
4. Альвеолы легких

13. К  $\beta$ -лактамным антибиотикам относится:

1. Тетрациклин
2. Пенициллин
3. Гентамицин
4. Канамицин

14. Антагонистическое действие кишечной палочки на родственные бактерии связано с синтезом:

1. Интерферона
2. Пестицинов
3. Колицинов
4. Полимиксина

15. Укажите способ полной стерилизации материала:

1. Фильтрованием
2. Паром под давлением
3. Прокаливанием
4. Тиндализацией

16. К химическим методам стерилизации относят:

1. Действие ультразвука
2. Обработка формальдегидом
3. Стерилизация паром под давлением
4. УФ-лучи

17. Перечислите способ стерилизации, освобождающий объект от споровых форм микробов:

1. Фильтрация
2. Автоклавирование
3. Пастеризация
4. Кипячение

### **СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

18. Число кишечных палочек в 1 л. воды
19. Наименьшее количество воды, в котором определяется одна кишечная палочка
20. Общее количество микроорганизмов в определенном объеме исследуемого материала
21. Наименьшее количество почвы, в котором определяется одна клетка клостридии перфрингенс

- А. Микробное число
- Б. Перфрингенс-титр
- В. Коли-титр
- Г. Коли-индекс

## МОДУЛЬ №3

### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Под термином «дезинфекция» понимают:
  1. Освобождение объекта от вегетативных форм
  2. Освобождение только от аэробных форм бактерий
  3. Освобождение от спор и вегетативных форм
  4. Уничтожение патогенных микробов
2. К осложнению антибиотикотерапии со стороны микроорганизмов относится:
  1. Нарушение подвижности микробов
  2. Изменение типа дыхания микробов
  3. Приобретение патогенных свойств
  4. Формирование устойчивости к антибиотикам
3. Транспозон – это:
  1. Вещество, вызывающее образование индуцированных мутаций
  2. Репарационный агент
  3. Внехромосомный фактор наследственности
  4. Умеренный бактериофаг
4. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам проводят:
  1. Методом Фортнера
  2. Методом бумажных дисков
  3. Методом Дригальского
  4. Методом Коха
5. Наследственное скачкообразное изменение признака:
  1. Репарация
  2. Мутация
  3. Модификация
  4. Фаговая конверсия
6. Восстановление поврежденной ДНК
  1. Мутация
  2. Трансформация
  3. Трансдукция
  4. Репарация
7. Умеренный бактериофаг участвует в процессе:
  1. Конъюгации
  2. Трансдукции
  3. Трансформации
  4. Модификации
8. Наиболее частым осложнением после приема антибиотиков широкого спектра действия является:
  1. Необратимое поражение слухового нерва
  2. Аллергические реакции
  3. Дисбиоз
  4. Формирование популяции бактерий, устойчивых к антибиотикам
9. Механизм действия  $\beta$ -лактамных антибиотиков:
  1. Нарушают синтез нуклеиновых кислот
  2. Нарушают целостность цитоплазматической мембраны
  3. Нарушают синтез пептидогликана клеточной стенки
  4. Нарушают синтез белка

10. Нарушает синтез белка:
  1. Тетрациклин
  2. Пенициллин
  3. Полимиксин
  4. Рифампицин
11. Где осуществляется стерилизация паром под давлением?
  1. В печи Пастера
  2. В автоклаве
  3. В термостате
  4. В аппарате Коха
12. К физическим методам стерилизации относят:
  1. Обработка спиртом
  2. Действие ультрафиолетовых лучей
  3. Фильтрование
  4. Использование антибиотиков
13. Стерилизация - это:
  1. Комплекс мероприятий, направленных на уничтожение на объектах конкретных видов микробов
  2. Комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания микроорганизмов в рану
  3. Комплекс мероприятий, направленных на полное обеспложивание объектов
  4. Все ответы верные
14. Коли-титр воды:
  1. Количество кишечной палочки в 1 л воды
  2. Количество микробов в 1 мл воды
  3. Минимальное количество воды, в котором содержится 1 кишечная палочка
  4. Количество кишечных палочек в 10 л воды
15. Патогенные микробы, способные длительно (годами) сохраняться в почве:
  1. Возбудитель брюшного тифа
  2. Клостридии газовой гангрены
  3. Кишечная палочка
  4. Стафилококки
16. Санитарно-показательными бактериями воздуха являются:
  1. Кишечная палочка
  2. Синегнойная палочка
  3. Золотистый стафилококк
  4. Микрококки
17. Для восстановления нормальной микрофлоры организма человека назначают:
  1. Антибиотики
  2. Эубиотики
  3. Бактериофаги
  4. Вакцины

**СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

- |                                                             |                   |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|
| 18. Болезни растений, вызываемые бактериями                 | 1. Микотоксикозы  |
| 19. Симбиоз мицелия грибов с корнями высших растений:       | 2. Бактериозы     |
|                                                             | 3. Микориза       |
| 20. Возбудители бактериозов:                                | 1. Эпифиты        |
| 21. Микробы, развивающиеся в норме на поверхности растений: | 2. Псевдомонады   |
|                                                             | 3. Микобактерии   |
|                                                             | 4. Коринебактерии |

## МОДУЛЬ №4

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Кто является автором фагоцитарной теории иммунитета?
  1. Бернет Ф.
  2. Ерне Н.
  3. Эрлих П.
  4. Мечников И.И.
2. Какой вид иммунитета является естественным активным?
  1. После введения иммунных сывороток
  2. Поствакцинальный
  3. Трансплацентарный
  4. Постинфекционный
3. Скрыто протекающие инфекции без клинических проявлений называются:
  1. Острые инфекции
  2. Хронические инфекции
  3. Латентные инфекции
  4. Смешанные инфекции
4. Охарактеризуйте секреторный иммуноглобулин класса А
  1. Обеспечивает местный иммунитет
  2. Является пентамером
  3. Не содержит секреторный компонент
  4. Проходит через плаценту
5. Иммуноглобулинов какого класса больше всего содержится в сыворотке крови здорового человека?
  1. А
  2. Е
  3. М
  4. G
6. Какие клетки обладают фагоцитарной активностью?
  1. Лимфоциты
  2. Нейтрофилы
  3. Плазмоциты
  4. Эритроциты
7. В каких феноменах иммунного ответа принимают участие В-лимфоциты?
  1. Выработка антител
  2. Иммунный фагоцитоз
  3. Клеточный иммунный ответ
  4. Киллерная функция
8. Перенос гиперчувствительности замедленного типа осуществляется при введении:
  1. Иммуноглобулинов Е
  2. Иммуноглобулинов G
  3. Сенсибилизированных В-лимфоцитов
  4. Сенсибилизированных Т-лимфоцитов
9. Назовите причины первичного иммунодефицита:

1. Хронические вирусные инфекции
  2. Злокачественные новообразования
  3. Бактериальные инфекции
  4. Врожденные дефекты развития
10. Антитоксический иммунитет страдает при недостаточности:
1. Фагоцитарной системы
  2. Комплемента
  3. Т-системы лимфоцитов
  4. В-системы лимфоцитов
11. Каким действием на иммунную систему характеризуются вакцины?
1. Неспецифическая активация
  2. Специфическая супрессия
  3. Неспецифическая супрессия
  4. Специфическая активация
12. Повторное заражение еще не выздоровевшего от инфекции организма тем же микробом, называется:
1. Реинфекцией
  2. Суперинфекцией
  3. Рецидивом
  4. Вторичной инфекцией
13. Инфекционные болезни, передающиеся только от человека к человеку, называются:
1. Зоонозы
  2. Сапронозы
  3. Антропонозы
  4. Зооантропонозы
14. Гипоглобулинемия возникает при дефекте
1. Эозинофилов
  2. В-лимфоцитов
  3. Комплемента
  4. Т-лимфоцитов
15. Какой фактор вызывает анафилактическую реакцию?
1. Пропердин
  2. Лизоцим
  3. С-реактивный белок
  4. Иммуноглобулин Е
16. В формировании антибактериального клеточного иммунитета участвуют:
1. Лактоферин
  2. В-лимфоциты
  3. Комплемент
  4. Фагоциты
17. В период реконвалесценции происходит:
1. Интенсивное размножение микроорганизмов
  2. Прекращение размножения и гибель микроорганизмов
  3. Колонизация чувствительных клеток
  4. Адгезия микроорганизмов на чувствительных клетках

**СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

- 18.
1. IgM
  2. Ig G
  3. Ig E
- a. Существует в форме пентамера  
b. Участвует в аллергических реакциях  
c. Проходит через плаценту  
d. Существует в форме димера

- 19.
1. Макрофаги:
  2. В-лимфоциты:
- a. Выработка антител  
b. Фагоцитоз  
c. Оба  
d. Ни то, ни другое
- 20.
1. Первичный иммунодефицит:
  2. Вторичный иммунодефицит:
- a. Врожденный дефект развития  
b. Радиационное облучение  
c. Оба  
d. Ни то, ни другое
- 21.
1. Определение неполных антител:
  2. Определение корпускулярных антигенов:
- a. Реакция преципитации  
b. Реакция агглютинации  
c. Реакция Кумбса.

## МОДУЛЬ №4

### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Кто является автором гуморальной теории иммунитета?
1. Бернет Ф.
  2. Эрне И.
  3. Мечников ИМ.
  4. Эрлих П.
2. Какой вид иммунитета является искусственным пассивным?
1. После введения иммунных сывороток
  2. Поствакцинальный
  3. Трансплацентарный
  4. Постинфекционный
3. Какой компонент комплемента входит в состав мембраноатакующего комплекса?
1. C2
  2. C3
  3. C4
  4. C5
4. Иммуноглобулин класса E обладает тропизмом к:
1. Нейтрофилам
  2. Макрофагам
  3. Тучным клеткам
  4. Фибробластам
1. Отметьте период инфекционного заболевания:
1. Смешанный
  2. Токсический
  3. Продромальный
  4. Вирусный

6. Какие клетки относятся к фагоцитам?

1. Т-лимфоциты
2. Альвеолярные макрофаги
3. В-лимфоциты
4. Т-киллеры

7. В каких формах иммунного ответа принимают участие Т - лимфоциты?

1. Выработка антител
2. Киллерная функция
3. Иммунный фагоцитоз
4. Гиперчувствительность немедленного типа

8. Иммуноглобулины синтезируются и секретируются:

1. Т - лимфоцитами
2. Нейтрофилами
3. Плазматическими клетками
4. Макрофагами

9. Экзотоксин микробов по химической структуре – это:

1. ЛПС
2. Вещество белковой природы
3. Пигмент
4. Дисахарид.

10. Агаммаглобулинемия возникает при недостаточности:

1. Фагоцитарной функции
2. Комплемента
3. Т-системы лимфоцитов
4. В-системы лимфоцитов

11. Для специфической активации иммунной системы используют:

1. Иммуноглобулины
2. Адьюванты
3. Анатоксины
4. Толерогены

12. Какой ингредиент используется в РПГА с целью определения антигена?

1. Эритроциты барана
2. Исследуемая сыворотка
3. Антигенный эритроцитарный диагностикум
4. Антительный эритроцитарный диагностикум

13. Период инфекционного заболевания от момента заражения до появления первых признаков называется:

1. Прдромальным
2. Периодом разгара
3. Инкубационным
4. Манифестным

14. Дефицит киллерной функции возникает при недостаточности:

1. Комплемента
2. В-системы лимфоцитов
3. Лизоцима
4. Т-системы лимфоцитов

15. К какому типу аллергических реакций относится сывороточная болезнь?

1. IV типу
2. II типу
3. I типу
4. III типу

16. Для гиперчувствительности I типа характерно участие:

1. Комплемента
2. Т-лимфоцитов
3. Цитотоксических антител
4. Тучных клеток

17. Массовые заболевания, распространившиеся на несколько стран и континентов, называются:

1. Эпидемией
2. Эндемией
3. Пандемией
4. Спорадические заболевания

**СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ**

18. 1. Первичный иммунный ответ характеризуется:

2. Вторичный иммунный ответ характеризуется:

- a. Усиленной выработкой антител при повторном введении антигена
- b. Наиболее высоким уровнем антител на 3 неделе после введения антигена
- c. Оба
- d. Ни то, ни другое

19. 1. Неспецифическая резистентность:

2. Иммунный ответ:

- a. Т-хелперы
- b. Лизоцим
- c. Оба
- d. Ни то, ни другое

20. 1. Иммуноглобулин класса E:

2. Сенсибилизированные Т-лимфоциты:

- a. Вызывает ГЗТ
- b. Вызывает ГНТ
- c. Оба
- d. Ни то, ни другое

21. 1. Антиген в реакции агглютинации:

2. Антиген в реакции преципитации:

- a. Молекулярный
- b. Корпускулярный
- c. Оба
- d. Ни то, ни другое

**Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

---

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

*ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ  
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО  
ФАКУЛЬТЕТА  
ПО ЧАСТНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ*

**(ЧАСТЬ II)**

**Владикавказ**

МОДУЛЬ №1

I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. К какому семейству относится возбудитель брюшного тифа:
  1. Leptospiraceae
  2. Vibrionaceae
  3. Enterobacteriaceae
  4. Picornavirus
2. Свойства бактерий рода Salmonella:
  1. Образуют споры
  2. Лактозоотрицательны
  3. Неподвижны
  4. Грамположительны
3. Материал для бактериологического исследования при холере:
  1. Кровь
  2. Рвотные массы
  3. Моча
  4. Спинномозговая жидкость
4. Для серодиагностики брюшного тифа применяют реакции:
  1. РПГА
  2. РТГА
  3. ПЦР
  4. РА на стекле
5. Диареегенные кишечные палочки:
  1. Продуцируют энтеротоксины
  2. Лактозонегативные
  3. Не имеют плазмид патогенности
  4. Грамположительные
6. Элективная питательная среда для культивирования возбудителей шигеллеза:
  1. Плоскирева
  2. Желточно-солевой агар
  3. Кровяной агар
  4. Щелочная пептонная вода
7. Свойства бактерий рода Shigella:
  1. Образуют споры
  2. Грамположительные
  3. Имеют H- антиген
  4. Факультативные анаэробы
8. Факторы патогенности возбудителей холеры:
  1. Спорообразование
  2. Холероген
  3. Перитрих
  4. Капсулообразование
9. Условия культивирования возбудителя кишечного иерсиниоза:
  1. Не растет на простых питательных средах
  2. Строго анаэробные условия
  3. Время инкубации 5-7 суток
  4. Оптимальная температура 22-25° С
10. Основной метод микробиологической диагностики кишечного иерсиниоза:
  1. Бактериологический

2. Бактериоскопический
3. Серологический
4. Биологический

11. Какую питательную среду используют для исследования гемокультуры с целью выделения возбудителя брюшного тифа:

1. Желчный бульон
2. Бучина
3. Щелочная пептонная вода
4. Левина

12. Серологический метод диагностики брюшного тифа позволяет:

1. Выделить чистую культуру микроорганизмов
2. Выявить бактерионосительство
3. Фаготипировать возбудитель
4. Серотипировать возбудитель

13. Материал для бактериологического исследования на 1-й неделе заболевания брюшным тифом:

1. Моча
2. Испражнения
3. Сыворотка
4. Кровь

14. Значение условно-патогенной кишечной палочки для макроорганизма:

1. Антагонист патогенной кишечной микрофлоры
2. Не выделяет бактериоцины
3. Не может вызвать воспалительный процесс в мочевом и желчном пузырях
4. Не может вызвать сепсис

15. Основной метод микробиологической диагностики брюшного тифа на 3-й неделе заболевания:

1. Бактериоскопический
2. Бактериологический
3. Биологический
4. Серологический

16. Сальмонеллез – это:

1. Антропоноз
2. Полимикробная инфекция
3. Мономикробная инфекция
4. Хроническая кишечная инфекция

17. Основной метод лабораторной диагностики сальмонеллеза:

1. Биологический
2. Микроскопический
3. Бактериологический
4. Серологический

СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

18.

1. Холера
  2. Шигеллез
  3. Сальмонеллез
  4. Кишечный эшерихиоз
- А. ЭПКП  
Б. *S. enteritidis*  
В. *S. typhi*  
Г. *V. cholerae*  
Д. *S. sonnei*

19.

1. Агглютинируются эшерихиозной O55-сывороткой
2. Вызывают гнойно-воспалительные заболевания различной локализации

3. Продуцируют энтеротоксины
  4. Обладает психрофильностью
    - А. Условно-патогенные кишечные палочки
    - Б. Диареегенные кишечные палочки
    - В. Оба
    - Г. Ни то, ни другое
- 20.
1. Монотрихи
  2. Перитрихи
  3. Не подвижны
    - А. Шигеллы
    - Б. Холерные вибрионы
    - В. Сальмонеллы
    - Г. ЭПКП
- 21
1. Возбудители лептоспироза
  2. Возбудители бруцеллеза
  3. Возбудители ботулизма
    - А. Мелкие грамотрицательные палочки овоидной формы
    - Б. Бактерии извитой формы
    - В. Споробразующие палочки.

#### МОДУЛЬ №1

#### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Ботулизм – это:
  1. Пищевая токсикоинфекция
  2. Вызывается факультативными анаэробами
  3. Возбудитель не образует спор
  4. Спора располагается центрально
2. Свойства бактерий рода *Escherichia*:
  1. Грамположительны
  2. Лактозопозитивны
  3. Образуют споры
  4. Не подвижны
3. Каким свойством обладают бактерии семейства *Enterobacteriaceae*?
  1. Грамотрицательные палочки
  2. Образуют споры
  3. Облигатные анаэробы
  4. Облигатные аэробы
4. Бруцеллез – это:
  1. Мономикробная инфекция
  2. Полимикробная инфекция
  3. Антропоноз
  4. Возбудителем являются извитые бактерии
5. Холера – это:
  1. Зоонозная инфекция
  2. Особо опасная инфекция
  3. Путь передачи инфекции – гематогенный
  4. Возбудитель перитрих
6. Для серодиагностики брюшного тифа используют:
  1. Реакция Вассермана
  2. Реакцию Видаля

3. Реакцию Райта
  4. Реакцию Хеддельсона
7. Какую среду используют при выделении возбудителя холеры?
1. Щелочная пептонная вода
  2. Кровяной агар
  3. Сывороточный агар
  4. Желчный бульон
8. По каким свойствам различаются диареегенные кишечные палочки?
1. По окраске по Граму
  2. По лактозонегативности
  3. По антигенной структуре
  4. По подвижности
9. Лептоспироз – это:
1. Антропоноз
  2. Зооноз
  3. Возбудитель – мелкая изогнутая палочка
  4. Возбудитель – грамположительный микроб
10. Возбудитель кишечного иерсиниоза характеризуется следующими свойствами:
1. Грамположительный
  2. Обладает психрофильностью
  3. Образует споры
  4. Монотрих
11. Сколько групп включает международная классификация шигелл?
1. 5
  2. 4
  3. 2
  4. 3
12. Основным методом лабораторной диагностики дизентерии:
1. Микроскопический
  2. Бактериологический
  3. Серологический
  4. Биологический.
13. Холерный вибрион – это:
1. Кислотоустойчивый микроорганизм
  2. Развивается в щелочных условиях
  3. Не подвижный
  4. Грамположительный микроорганизм
14. Диареегенные кишечные палочки являются:
1. Лактозонегативными
  2. Лактозопозитивными
  3. Грамположительными
  4. Не патогенными для человека
15. Питательная среда для культивирования возбудителя колиэнтерита:
1. Эндо
  2. Клиглера
  3. Кровяной агар
  4. Желчный бульон

16. Материал для бактериологического исследования при шигеллезе:

1. Кровь
2. Сыворотка крови
3. Моча
4. Испражнения

17. Диареегенные и условно-патогенные кишечные палочки различаются по:

1. Тинкториальным свойствам
2. Способности утилизировать лактозу
3. Морфологическим свойствам
4. Антигенной структуре

СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

18.

1. Холера
2. Паратиф А
3. Кишечный эшерихиоз
4. Шигеллез
  - А. *S.dysenteriae*
  - Б. *V.cholerae*
  - В. *S.typhimurium*
  - Г. ЭПКП
  - Д. *S.paratyphi*

19.

1. Относится к серогруппе O1
2. Устойчив к полимиксину
3. Чувствителен к бактериофагу C
4. Продуцирует энтеротоксин
  - А. Биовар *cholerae*
  - Б. Биовар *eltor*
  - В. Оба
  - Г. Ни то, ни другое

20.

1. Не имеют жгутиков:
  - А. Иерсинии
  - Б. Холерный вибрион
  - В. Сальмонеллы
  - Г. Шигеллы

21.

1. Укажите правильную последовательность действий при микробиологической диагностике шигеллеза:
  - А. Идентификация выделенной чистой культуры
  - Б. Пересев лактозонегативных колоний на среду Ресселя
  - В. Посев материала на среды Левина и Плоскирева
  - Г. Определение чувствительности к антибиотикам

## МОДУЛЬ №2

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Окраску возбудителя дифтерии проводят методом:  
А. Циля – Нельсена  
Б. Ожешко  
В. Нейссера  
Г. Гинса-Бурри
2. Для окраски микобактерий используют метод:  
А. Ожешко  
Б. Циля – Нельсена  
В. Леффлера  
Г. Бурри
3. Возникновение заболевания столбняком обусловлено попаданием в рану:  
А. *Brucella melitensis*  
Б. *Clostridium difficile*  
В. *Clostridium tetani*  
Г. *Clostridium novyi*
4. По типу дыхания клостридии:  
А. Облигатные анаэробы  
Б. Факультативные анаэробы  
В. Облигатные аэробы  
Г. Микроаэрофиллы
5. Последовательность этапов бактериологического метода исследования при дифтерии:  
А. Определение токсичности  
Б. Посев исследуемого материала на специальные питательные среды  
В. Определение антибиотикочувствительности  
Г. Пересев колонии для получения чистой культуры
6. К неспорообразующим анаэробам относятся:  
А. Клостридии  
Б. Бактероиды  
В. Хламидии  
Г. Микобактерии
7. Для специфической профилактики коклюша применяется вакцина:  
А. БЦЖ  
Б. Солка  
В. АКДС  
Г. СТИ
8. Стрептококки группы А культивируются на питательной среде:  
А. Плоскирева  
Б. Кровяной агар  
В. Сабуро  
Г. МПА
9. Возбудителем скарлатины является:  
А. *S.aureus*  
Б. *S.pyogenes*  
В. *S.trachomatis*  
Г. *F.tularensis*
10. Назовите клиническую форму менингококковой инфекции:  
А. Пневмония

- Б. Диарея
- В. Назофарингит
- Г. Конъюнктивит

11. Менингококки относятся к роду:

- А. Micrococcus
- Б. Streptococcus
- В. Staphylococcus
- Г. Neisseria

12. Вакцину СТИ применяют для специфической профилактики:

- А. Бруцеллеза
- Б. Холеры
- В. Сибирской язвы
- Г. Столбняка

13. Путь заражения гонореей:

- А. Воздушно-капельный
- Б. Воздушно-пылевой
- В. Алиментарный
- Г. Половой

14. Гонококки в мазке располагаются:

- А. Парно
- Б. По четыре
- В. В виде цепочки
- Г. Скоплениями по 12-16

15. На МПА вырастают шероховатые колонии, края которых под малым увеличением микроскопа сравнивают с головой медузы или гривой льва:

- А. B.melitensis
- Б. B.anthraxis
- В. B.suis
- Г. B.pertussis

16. При лабораторной диагностике какого заболевания используют реакцию Вассермана?

- А. Дифтерии
- Б. Туберкулеза
- В. Сифилиса
- Г. Гонореи

17. Возбудитель трахомы – это:

- А. C.trachomatis
- Б. S.aureus
- В. N. gonorrhoeae
- Г. T.pallidum

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| 18. Протей              | А. K.pneumoniae |
| 19. Клебсиеллы          | Б. E.coli       |
| 20. Эшерихии            | В. P.mirabilis  |
| 21. Синегнойная палочка | Г. P.aeruginosa |

## МОДУЛЬ №2

### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Какую вакцину используют для специфической профилактики туберкулеза?  
А. СТИ  
Б. Солка  
В. АКДС  
Г. БЦЖ
2. Материал для исследования при первичном сифилисе:  
А. Кровь  
Б. Ликвор  
В. Содержимое твердого шанкра  
Г. Содержимое мягкого шанкра
3. Для обнаружения сибирезязвенного антигена применяется реакция:  
А. Видаля  
Б. Райта  
В. Хеддельсона  
Г. Асколи
4. Клиническая форма сибирской язвы, которая дает более благоприятный исход:  
А. Кишечная  
Б. Легочная  
В. Кожная  
Г. Септическая
5. Специфическая профилактика сифилиса:  
А. Вакцина живая  
Б. Вакцина аттенуированная  
В. Не разработана  
Г. БЦЖ
6. Какое свойство характерно для возбудителей туберкулеза?  
А. Спорообразование  
Б. Кислотоустойчивость  
В. Облигатные анаэробы  
Г. Образуют жгутики
7. Кожно-аллергическую пробу Манту применяют при диагностике:  
А. Бруцеллеза  
Б. Туберкулеза  
В. Сифилиса  
Г. Дифтерии
8. Какие морфологические особенности характерны для возбудителя дифтерии?  
А. Наличие на концах палочки зерен волютина  
Б. Спорообразование  
В. Подвижные  
Г. Располагаются в виде цепочки
9. По типу дыхания менингококки являются:  
А. Облигатными аэробами  
Б. Облигатными анаэробами  
В. Факультативными анаэробами  
Г. Микроаэрофилами
10. К какому роду относится возбудитель коклюша?

- A. Neisseria
- Б. Bordetella
- В. Corynebacterium
- Г. Mycobacterium

11. Какова морфология возбудителя скарлатины?

- A. Палочковидные микроорганизмы
- Б. Стрептококки
- В. Диплококки
- Г. Извитые микроорганизмы

12. Реакция Вассермана – это реакция:

- A. Агглютинации
- Б. Преципитации
- В. Связывания комплемента
- Г. Флюоресценции

13. Столбняк относится к:

- A. Воздушно-капельной инфекции
- Б. Раневой инфекции
- В. Половой инфекции
- Г. Алиментарной инфекции

14. Возбудители газовой гангрены:

- A. Выделяют эндотоксины, обладающие энтеротропностью
- Б. Продуцируют экзотоксины, действующие на ЦНС
- В. Не выделяют токсины
- Г. Не выделяют ферменты, разрушающие соединительную ткань

15. К неспорообразующим анаэробам относятся:

- A. Бациллы
- Б. Вейлонеллы
- В. Клостридии
- Г. Стафилококки

16. Основным методом лабораторной диагностики острой гонореи является:

- A. Бактериологический
- Б. Микроскопический
- В. Серологический
- Г. Биологический

17. К какому роду относится синегнойная палочка?

- A. Yersinia
- Б. Pseudomonas
- В. Bordetella
- Г. Brucella

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                                            |                               |
|--------------------------------------------|-------------------------------|
| 18. Морфологические особенности клебсиелл: | A. Перитрихи                  |
| 19. Морфологические особенности эшерихий:  | Б. Внутриклеточные паразиты   |
| 20. Морфологические особенности протеев:   | В. Наличие выраженной капсулы |
| 21. Свойство хламидий:                     |                               |

## МОДУЛЬ №3

### I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Морфологические и тинкториальные свойства возбудителя чумы:  
А. Грамположительные палочки  
Б. Грамположительные стрептобактерии  
В. Грамотрицательные диплобациллы  
Г. Мелкие овоидные палочки с биполярной окрашиваемостью
2. Какая клиническая форма чумы является наиболее высоко контагиозной?  
А. Бубонная  
Б. Кишечная  
Г. Кожно-бубонная  
Д. Легочная
3. Возбудителем эндемического сыпного тифа является:  
А. *R. prowazekii*  
Б. *R. typhi*  
В. *R. conorii*  
Г. *R. sibirica*
4. Образование цист характерно для:  
А. Бактерий  
Б. Вирусов  
В. Простейших  
Г. Грибов
5. Спорами размножаются:  
А. Грибы  
Б. Вирусы  
В. Бактерии  
Г. Хламидии
6. Для обнаружения малярийных плазмодиев в крови применяют метод:  
А. Биологический  
Б. Бактериологический  
В. Микроскопический  
Г. Серологический
7. Плазмодии малярии передаются:  
А. Алиментарным путем  
Б. Воздушно-капельным путем  
В. Трансмиссивным путем  
Г. Контактным путем
8. Для окраски простейших используют способ:  
А. Циля-Нильсена  
Б. Ожешко  
В. Романовского-Гимзы  
Г. Нейссера
9. Половой цикл развития токсоплазм с образованием ооцист происходит в кишечнике:  
А. Птиц  
Б. Человека  
В. Кошек  
Г. Собак
10. Амебиаз сопровождается:  
А. Поражением верхних дыхательных путей  
Б. Язвенным поражением толстой кишки

- В. Поражением тонкой кишки
- Г. Поражением урогенитального тракта

11. К какому классу простейших относится малярийный плазмодий?

- А. Жгутиконосцы
- Б. Реснитчатые
- В. Споровики
- Г. Саркодовые

12. Механизм передачи возбудителя амебиаза:

- А. Воздушно-капельный
- Б. Половой
- В. Трансмиссивный
- Г. Фекально-оральный

13. Микозы – это заболевания, вызванные:

- А. Бактериями
- Б. Грибами
- В. Простейшими
- Г. Хламидиями

14. Для выделения грибов из патологического материала используют:

- А. МПА
- Б. Среду Сабуро
- В. Сывороточный агар
- Г. МПБ

15. Грибы рода *Candida*:

- А. Относятся к дрожжеподобным грибам
- Б. Относятся к нитчатым грибам
- В. Относятся к мицелиарным грибам
- Г. Являются патогенными

16. При кератомикозах поражаются:

- А. Подкожная клетчатка
- Б. Кости
- В. Волосы
- Г. Внутренние органы

17. По отношению к температуре патогенные грибы являются:

- А. Психрофилами
- Б. Мезофилами
- В. Термофилами
- Г. Все ответы правильные

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                               |                           |
|-------------------------------|---------------------------|
| 18. Условно-патогенные грибы: | А. <i>Trichophyton</i>    |
| 19. Дерматофиты:              | Б. Род <i>Aspergillus</i> |
| 20. Образуют конидии:         | В. Оба                    |
| 21. Образуют микотоксины:     | Г. Ни то, ни другое       |

МОДУЛЬ №3

II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. Возбудитель чумы по отношению к температуре является:  
А. Мезофилом  
Б. Психрофилом  
В. Термофилом  
Г. Все ответы правильные
2. Вирулентные штаммы чумных палочек на плотных питательных средах образуют колонии:  
А. S-формы  
Б. R-формы, напоминающие кружевной платочек  
В. Круглые, выпуклые золотистого цвета колонии с ровными краями  
Г. Мелкие, круглые, блестящие колонии, как капельки ртути
3. Какую вакцину используют для специфической профилактики чумы?  
А. Убитую вакцину  
Б. Живую вакцину из аттенуированного штамма EV  
В. Анатоксин  
Г. СТИ
4. Переносчиком возбудителя эпидемического сыпного тифа являются:  
А. Блохи  
Б. Платяные вши  
В. Крысы  
Г. Клещи
5. Возбудителями эндемического сыпного тифа являются:  
А. Вирусы  
Б. Риккетсии  
В. Хламидии  
Г. Простейшие
6. Метод окраски препарата толстой капли крови по Романовскому-Гимзе применяют для диагностики:  
А. Брюшного тифа  
Б. Малярии  
В. Амебиаза  
Г. Эпидермофитии
7. Токсоплазма имеет форму:  
А. Кокковидную  
Б. Палочковидную  
В. Полумесяца  
Г. Спиралевидную
8. Трансплацентарный путь передачи возможен при:  
А. Амебиазе  
Б. Токсоплазмозе  
В. Малярии  
Г. Кандидозе
9. К какому классу простейших относятся токсоплазмы:  
А. Жгутиконосцам  
Б. Реснитчатым  
В. Споровикам  
Г. Саркодовым
10. Основным методом лабораторной диагностики амебиаза является:  
А. Бактериологический  
Б. Микроскопический

- В. Кожно-аллергический
- Г. Биологический

11. Возбудителем токсоплазмоза является:

- А. *T.gondii*
- Б. *E.histolytica*
- В. *P.vivax*
- Г. *P.ovale*

12. Совершенные грибы – это:

- А. Грибы с половым способом размножения
- Б. Грибы с бесполым способом размножения
- В. Грибы, имеющие септы
- Г. Грибы, не образующие септ

13. Стригуций лишай вызывается грибами рода:

- А. *Trichophyton*
- Б. *Aspergillus*
- В. *Candida*
- Г. *Fusarium*

14. К системным, или глубоким микозам относится:

- А. Гистоплазмоз
  - Б. Фавус (парша)
  - В. Споротрихоз
  - Г. Микроспория
15. Что такое конидии?

- А. Эндоспоры
- Б. Экзоспоры
- В. Спорообразующие структуры
- Г. Поперечная перегородка в гифе

16. Заболевания, возникающие при употреблении продуктов питания, которые содержат токсины-метаболиты, продуцируемые *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*:

- А. Эрготизм
- Б. Афлатоксикозы
- В. Зигомикозы
- Г. Криптококкоз

17. Оппортунистические микозы:

- А. Вызывают патогенные грибы
- Б. Вызывают условно-патогенные грибы
- В. Вызывают неклассифицированные патогенные грибы
- Г. Вызывают дерматофиты

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| 18. Кератомикозы:       | А. <i>Microsporum</i>              |
| 19. Субкутанные микозы: | Б. Возбудитель разноцветного лишая |
| 20. Глубокие микозы:    | В. Споротрихоз                     |
| 21. Эпидермофитии:      | Г. Бластомикоз                     |

#### МОДУЛЬ № 4

##### I ВАРИАНТ

(Выберите один или несколько верных ответов)

1. Установить серологический тип вируса гриппа можно с помощью:
- а) реакции агглютинации на стекле;
  - б) реакции торможения гемагглютинации;
  - в) реакции непрямой гемагглютинации;
  - г) реакции гемагглютинации.

2. «Бешенство» в латинской терминологии:
- а) Variola
  - б) Rabies
  - в) Anthrax
  - г) Pestis
3. Интерферон обеспечивает противовирусную защиту клетки, т.к. препятствует:
- а) адсорбции вируса на клетке;
  - б) проникновению вируса в клетку;
  - в) репродукции вируса;
  - г) лизису пораженной клетки;
  - д) активации киллеров.
4. Источником и резервуаром вируса простого герпеса являются:
- а) животные
  - б) пищевые продукты
  - в) вирусоносители
  - г) птицы
  - д) грызуны
5. ВИЧ относится к группе вирусов:
- а) ДНК-геномных;
  - б) РНК-геномных;
  - в) сложных;
  - г) простых
6. Для серодиагностики вирусных гепатитов применяют:
- а) реакцию торможения гемагглютинации;
  - б) иммуноферментный анализ;
  - в) реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации;
  - г) реакцию гемагглютинации;
  - д) реакцию агглютинации на стекле.
7. Нейротропными вирусами считаются:
- а) вирус гриппа;
  - б) вирус гепатита С;
  - в) вирус бешенства;
  - г) вирус простого герпеса;
  - д) вирус герпес-зостер.
8. Воздушно-капельным путем передаются вирусы:
- а) вирус гепатита В
  - б) ВИЧ
  - в) вирусы кори
  - г) вирусы клещевого энцефалита
  - д) вирус бешенства
9. Для плановой специфической профилактики полиомиелита используют:
- а) живую вакцину;
  - б) анатоксин;
  - в) убитую вакцину;
  - г) специфическую сыворотку;
  - д) интерферон.
10. Семейство ретровирусов отличается наличием:
- а) РНК-полимеразы
  - б) ДНК-полимеразы
  - в) эндонуклеазы
  - г) обратной транскриптазы
  - д) экзонуклеазы
11. Вирус птичьего гриппа относится:

- а) к вирусу гриппа типа С
- б) к вирусу гриппа типа А
- в) к вирусу гриппа типа В
- г) к вирусу гриппа типа Д

12. Вирусы полиомиелита относят к семейству:

- а) калицивирусов
- б) ретровирусов
- в) поксвирусов
- г) пикорнавирусов

13. Основной путь передачи вируса гепатита А:

- а) парентеральный
- б) воздушно-капельный
- в) фекально-оральный
- г) контактный

14. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус гепатита В?

- а) РНК
- б) ДНК
- в) ДНК и РНК
- г) не содержит нуклеиновую кислоту

15. ВИЧ передается следующими способами:

- а) половым
- б) воздушно-капельным
- в) фекально-оральным
- г) парентеральным
- д) трансплацентарным

16. Укажите правильное утверждение: ВИЧ-инфекция это:

- а) сапроноз
- б) антропоноз
- в) зооноз
- г) зооантропоноз

17. Укажите правильное утверждение: СПИД - это:

- а) оппортунистическая инфекция
- б) синоним ВИЧ-инфекции
- в) стадия болезни
- г) самостоятельное заболевание

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                                       |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 18. Фекально-оральный путь передачи:  | а) гепатиты В, С         |
| 19. Парентеральный путь передачи:     | б) полиомиелит           |
| 20. Трансмиссивный путь передачи:     | в) гепатиты А, Е         |
| 21. Воздушно-капельный путь передачи: | г) клещевой энцефалит    |
|                                       | д) краснуха              |
|                                       | е) эпидемический паротит |

## МОДУЛЬ № 4

### II ВАРИАНТ

(Выберите один или несколько верных ответов)

1. К РНК-содержащим вирусам относятся:
  - а) пикорнавирусы
  - б) герпесвирусы
  - в) ретровирусы
  - г) ортомиксовирусы
2. В семейство ортомиксовирусов входят возбудители:
  - а) полиомиелита
  - б) гриппа
  - в) ВИЧ
  - г) бешенства
3. Интерферон обладает следующим действием:
  - а) лизирующим в отношении пораженной клетки;
  - б) стимулирующим фагоцитоз;
  - в) ингибирующим трансляцию;
  - г) специфическим связыванием с вирусом;
  - д) активирующим трансляцию.
4. Определить антитела в крови больного к определенному серотипу вируса гриппа можно с помощью:
  - а) реакции агглютинации на стекле;
  - б) реакции гемагглютинации;
  - в) иммуноферментного анализа;
  - г) реакции преципитации
5. Вирус гриппа относится к группе вирусов:
  - а) ДНК-геномных;
  - б) РНК-геномных;
  - в) сложных;
  - г) семейства ретровирусов;
  - д) семейства пикорнавирусов.
6. Характерными признаками семейства ретровирусов являются:
  - а) Н и N антигены капсида;
  - б) фермент обратная транскриптаза;
  - в) фрагментированность генома;
  - г) две идентичные нити РНК в геноме;
  - д) выход из клетки почкованием.
7. Энтеротропными считаются:
  - а) вирус полиомиелита;
  - б) вирус гепатита С;
  - в) вирус бешенства;
  - г) вирус клещевого энцефалита.
8. Клиника СПИДа определяется рядом осложнений, вызванных оппортунистическими агентами:
  - а) герпес-вирусами;
  - б) возбудителем дифтерии;
  - в) грибами Кандида;
  - г) фузобактериями;
  - д) микобактериями туберкулеза.
9. Для специфической профилактики бешенства используют:
  - а) живую вакцину;
  - б) анатоксин;
  - в) инаktivированную вакцину;
  - г) гамма-глобулин;
  - д) гамма-интерферон.
10. Какие осложнения может вызвать вирус эпидемического паротита у человека?

- а) орхит
  - б) менингит
  - в) энцефалит
  - г) пневмонию
  - д) гепатит
11. Какой тип нуклеиновой кислоты содержит вирус ветряной оспы?
- а) РНК
  - б) ДНК
  - в) ДНК и РНК
  - г) не содержит нуклеиновую кислоту
12. Вирусы полиомиелита – это:
- а) ДНК-содержащие вирусы
  - б) простые вирусы
  - в) РНК-содержащие вирусы
  - г) сложные вирусы
13. Какой тип нуклеиновой кислоты содержат вирусы гепатитов А и Е?
- а) ДНК
  - б) РНК
  - в) ДНК и РНК
  - г) не содержат нуклеиновую кислоту
14. К какому семейству относится возбудитель ВИЧ-инфекции?
- а) Рабдовирусов
  - б) Ортомиксовирусов
  - в) Пикорнавирусов
  - г) Ретровирусов
  - д) Тогавирусов
15. Вирус краснухи характеризуется следующими свойствами:
- а) ДНК-содержащий
  - б) способен проходить через плацентарный барьер и заражать плод
  - в) относится к семейству тогавирусов
  - г) обладает гемагглютинирующей активностью
  - д) сложноорганизованный вирус
16. Укажите неправильное утверждение. Путь передачи ВИЧ:
- а) воздушно-капельный
  - б) трансплантационный
  - в) половой
  - г) трансплацентарный
  - д) парентеральный
17. Укажите неправильное утверждение. ВИЧ-инфицированные лица имеют право:
- а) на доступное медицинское освидетельствование
  - б) на получение квалифицированной медицинской помощи всех видов
  - в) быть донором
  - г) добровольного обследования
  - д) анонимного обследования

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

Какую вакцину используют для специфической профилактики:

- |                             |                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------|
| 18. Эпидемического паротита | а) АКДС                                      |
| 19. Бешенства               | б) БЦЖ                                       |
| 20. Гепатита В              | в) живую вакцину, полученную Смородинцевым   |
| 21. Полиомиелита            | г) антирабическую вакцину                    |
|                             | д) генно-инженерную вакцину                  |
|                             | е) вакцину Смородинцева А.А. и Чумакова М.П. |

I ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. В таблетированных препаратах общая обсемененность не должна превышать:  
А. 5 тысяч микробных клеток на таблетку  
Б. 10 тысяч микробных клеток на таблетку  
В. 100 тысяч микробных клеток на таблетку  
Г. 1 тысячи микробных клеток на таблетку
2. Какой микроорганизм является санитарно-показательным для воздуха?  
А. Кишечная палочка  
Б. Золотистый стафилококк  
В. Вейлонеллы  
Г. Фузобактерии
3. Какую питательную среду используют для определения грибов рода *Candida* при обследовании смывов с аптечной посуды?  
А. МПА  
Б. Сабуро  
В. Кровяной агар  
Г. Желточно-солевой агар
4. Сколько времени и при какой температуре культивируют посевы лекарственных средств на тиогликолевой питательной среде для определения микробной обсемененности?  
А. 7 суток при температуре 37° С  
Б. 14 суток при температуре 37° С  
В. 14 суток при температуре 25° С  
Г. 24 часа при температуре 37° С
5. Какая из перечисленных форм лекарственных препаратов должна быть стерильной?  
А. Глазные капли  
Б. Таблетки  
В. Пасты  
Г. Мази
6. На какой питательной среде изучается лецитиназная активность стафилококков?  
А. Кровяном агаре  
Б. Желточно-солевом агаре  
В. МПА  
Г. Эндо
7. Для выявления протей каким методом делается посев лекарственных средств на МПА?  
А. Дригальского  
Б. Шукевича  
В. Коха  
Г. Райта
8. На какую питательную среду делается посев лекарственных средств для выявления микробов из семейства энтеробактерий?  
А. Сабуро  
Б. Тиогликолевую  
В. Эндо  
Г. МПА
9. Санитарно-показательные микробы для питьевой воды:  
А. Стафилококки  
Б. Туберкулезная палочка  
В. БГКП (бактерии группы кишечных палочек)

Г. Клостридии перфрингенс

10. Для санитарно-бактериологического изучения загрязненности воздуха в помещении используют метод:

- А. Мембранных фильтров
- Б. Седиментационный
- В. Бумажных дисков
- Г. Шукевича

11. Как определяют стерильность лекарственных средств с антимикробным действием?

- А. Путем мембранной фильтрации
- Б. Заражением лабораторных животных
- В. При посеве на тиогликолевую питательную среду
- Г. При посеве на питательную среду Сабуро

12. Как часто в аптеках должен осуществляться бактериологический контроль согласно инструкции, утвержденной приказом Министерства Здравоохранения?

- А. Не менее двух раз в квартал
- Б. Не менее одного раза в месяц
- В. Не менее одного раза в квартал
- Г. Не менее двух раз в месяц

13. Что такое нестерильные лекарственные формы?

- А. Лекарственные формы, в которых допускается содержание определенного количества непатогенных микробов
- Б. Лекарственные формы, в которых допускается содержание определенного количества патогенных микробов
- В. Лекарственные формы, в которых допускается содержание неопределенного количества патогенных микробов
- Г. Лекарственные формы, в которых допускается содержание неопределенного количества непатогенных микробов

14. Что такое пирогенные вещества?

- А. Экзотоксины
- Б. Эндотоксины (преимущественно грамотрицательных бактерий)
- В. Споры грибов
- Г. Споры бактерий

15. Что может стать причиной микробного обсеменения готовых лекарств? Укажите неправильный ответ:

- А. Микробное загрязнение растительного лекарственного сырья
- Б. Микробное загрязнение воздуха производственных помещений
- В. Микробное загрязнение оборудования, посуды, дистиллированной воды
- Г. Стерильность рук персонала

16. К фитозоонозам чаще всего относят: (укажите неправильный ответ)

- А. Кишечный иерсиниоз
- Б. Микотоксикозы
- В. Псевдотуберкулез
- Г. Сальмонеллез

17. Что такое микробное число лекарственного сырья?

- А. Количество патогенных микробов в 1 г лекарственного сырья
- Б. Количество непатогенных микробов в 1 кг лекарственного сырья
- В. Общее количество микробов в 1 г лекарственного сырья
- Г. Количество спорообразующих микробов в 1 г лекарственного сырья

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

18. Число кишечных палочек в 1 л воды:

А. Микробное число

19. Наименьшее количество воды, в котором определяется одна кишечная палочка:

Б. Перфрингенс-титр

20. Общее количество микроорганизмов

В. Коли-титр

в определенном объеме исследуемого материала:

Г. Коли-индекс

21. Микробное число воздуха:

Д. Количество

микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха

#### МОДУЛЬ №5

#### II ВАРИАНТ

(Укажите один правильный ответ)

1. В 1 г или 1 мл лекарственного препарата для приема внутрь должно быть не более:  
А. 1000 бактерий и 100 грибов  
Б. 5000 бактерий и 500 дрожжевых и плесневых грибов  
В. 100 бактерий и 10 дрожжевых и плесневых грибов  
Г. 10 бактерий
2. Какой микроорганизм является санитарно-показательным для воды?  
А. Эпидермальный стафилококк  
Б. Кишечная палочка  
В. Спирохеты  
Г. Менингококки
3. Какие должны быть в норме результаты посевов стерильных лекарственных средств на питательных средах?  
А. Рост единичных колоний  
Б. Отсутствие роста колоний  
В. Рост большого количества колоний  
Г. Рост не более 10 колоний
4. На какой питательной среде выявляют синегнойную палочку?  
А. Кровяном агаре  
Б. Сывороточном агаре  
В. Среде с глицерином  
Г. Желточно-солевым агаре
5. Каких животных используют для определения пирогенности лекарственных средств?  
А. Крыс  
Б. Кроликов  
В. Мышей  
Г. Морских свинок
6. Какая питательная среда используется для определения микробной обсемененности готовых лекарств?  
А. Кровяной агар  
Б. Сабуро  
В. МПА  
Г. Висмут-сульфит агар
7. Метод мембранных фильтров используют для изучения:  
А. Санитарно-микробиологического состояния воды  
Б. Определения чувствительности бактерий к антибиотикам  
В. Санитарно-микробиологического состояния воздуха закрытых помещений  
Г. Санитарно-микробиологического состояния почвы
8. Количество кишечных палочек в 1 л воды:  
А. Коли-титр  
Б. Коли-индекс  
В. Микробное число  
Г. Перфрингенс-титр
9. Как должна стерилизоваться аптечная посуда, согласно нормативным документам?  
А. Автоклавированием при 120°C (1 атм) в течение 45 минут  
Б. Сухим жаром при 140°C в течение 45 минут  
В. Гамма-излучением в течение 40 минут  
Г. Дробной стерилизацией
10. Чему должно быть равно микробное число воздуха в асептическом блоке, согласно нормативным документам?  
А. Не должно превышать 500-750 до и 1000 микробов/м<sup>3</sup> после работы  
Б. 5-10 до и 50-100 микробов/м<sup>3</sup> после работы  
В. 100-200 до и 400-500 микробов/м<sup>3</sup> после работы  
Г. 50-100 до и 200-300 микробов/м<sup>3</sup> после работы

11. Микроорганизмы, которые не должны присутствовать в нестерильных лекарственных средствах. Укажите неправильный ответ:  
 А. Бактерии семейства энтеробактерий  
 Б. Синегнойная палочка  
 В. Лимонно-желтый стафилококк  
 Г. Золотистый стафилококк
12. При каком режиме обработки разрушаются пирогенные вещества?  
 А. Кипячение  
 Б. Автоклавирование в течение 3 часов  
 В. Обработка сухим жаром  
 Г. Дробная стерилизация
13. Что такое лекарственное сырье?  
 А. Замороженные растения и их части  
 Б. Высушенные растения и их части  
 В. Свежесобранные растения и их части  
 Г. Все ответы верные
14. Какие мероприятия проводятся для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами? Укажите неправильный ответ:  
 А. Биологические  
 Б. Физико-химические  
 В. Механические  
 Г. Карантинные
15. Для предупреждения микробной порчи готовых лекарственных веществ необходимо соблюдение следующих условий. Укажите неправильный ответ:  
 А. Соблюдение правил личной гигиены  
 Б. Качественное обеззараживание воздуха аптечных помещений  
 В. Правильная обработка посуды, оборудования  
 Г. Не соблюдение правил личной гигиены
16. Что такое микробное число нестерильных лекарственных форм?  
 А. Количество бактерий и грибов в 1 г(мл) лекарственных форм  
 Б. Количество бактерий в 1 г(мл) лекарственных форм  
 В. Количество бактерий и грибов в 10 г(мл) лекарственных форм  
 Г. Количество грибов в 1 г(мл) лекарственных форм
17. В 1 г(мл) нестерильного лекарственного препарата для местного применения не должно быть:  
 А. Более 100 микробов, в том числе грибов  
 Б. Более 1000 микробов  
 В. Более 10 микробов  
 Г. Более 500 микробов

#### СОСТАВЬТЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ПАРЫ: ВОПРОС-ОТВЕТ

- |                                                                                          |                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18. В таблетированных лекарственных препаратах общая обсемененность не должна превышать: | А. 10 тыс. микробов на таблетку<br>Б. 100 тыс. микробов на таблетку<br>В. 5 тыс. микробов на таблетку              |
| 19. Способы деkontаминации сырья и готовых лекарственных средств:                        | А. Ионизирующее излучение<br>Б. Механический                                                                       |
| 20. К стерильным лекарственным формам относят:                                           | А. Глазные капли<br>Б. Растворы для инъекций<br>В. Оба<br>Г. Ни то, ни другое                                      |
| 21. Объектами бактериологического контроля в аптеках являются:                           | А. Вода дистиллированная<br>Б. Инъекционные растворы<br>В. Аптечная посуда<br>Г. Нестерильные лекарственные формы. |