

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

основной профессиональной образовательной программы высшего образования-программы специалитета по специальности 33.05.01.Фармация, утвержденной 31.08.2020г.

**СБОРНИК МЕТОДИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК
ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

ВЕСЕННИЙ СЕМЕСТР

Владикавказ 2012

Под редакцией доктора медицинских наук, профессора, зав. каф. микробиологии ГОУ ВПО СОГМА Л.Я. Плахтий.

Авторский коллектив: к.м.н. Черткоева М.Г., к.м.н. Гатиева Е.И.

Основное назначение указаний – методическая помощь студентам к каждому практическому занятию в весеннем семестре. Указания составлены в соответствии с федеральной программой по микробиологии, вирусологии и иммунологии студентов 1 курса.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Л.В. Бибаева –д.м.н., профессор, зав.кафедрой биологии с экологией ГОУ ВПО СОГМА Росздрава.

А.А. Подлужная – к.ф.н., доцент кафедры технологии лекарственных форм и организации фармацевтического дела ГОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова».

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, 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-Tetracoccus.

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 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 соответственными 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.

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. Особенность 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 липидам (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 10-30сек.
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, 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 Naemosporina.

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 малярии-овале.

Малярийные плазмодии – паразиты со сложным гетероксеническим 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 бесполым 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 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 амebiазе 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 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 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 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 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
По составу	Простые	Жидкие — МПБ, пептон-ная вода Плотные — МПА
	Сложные	Жидкие — сахарный бульон Плотные — сахарный агар, кровяной агар
По происхождению	Естественные	Молоко, свёрнутая сыворотка, срез сырого картофеля
	Искусственные	Молочно-солевой агар Сывороточный агар Асцит-агар Кровяной агар
	Синтетические	Среда Игла, среда 199
По назначению	Селективные (элективные) -для стафилококка: -для грам(-) кокков и дифтероидов: -для энтеробактерий: -для холерного вибриона: -для лактобацилл и грибов	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
	Дифференциально-диагностические Универсальные Среды обогащения Консервирующие	Эндо, Плоскирева, Левина, Ресселя, Гисса МПБ, МПА, кровяной агар Среда Мюллера Среды с глицерином
По консистенции	Жидкие Полужидкие Плотные	МПБ, пептонная вода, сахарный МПБ МПЖеле, желатиновая МПА, кровяной агар

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 микроанаэроостата. 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 CO₂ и низком содержании кислорода. Например: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*.

Методы культивирования анаэробов

Способы создания анаэробных условий

а) механический — удаление (откачивание) воздуха из анаэроостата с помощью вакуумного отсоса. Затем анаэроостат 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*). Край 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 (методразведений)

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 37⁰С 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 Цейслера секторами с последующим культивированием в анаэроостате.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

Укажите все правильные ответы:

1. Для культивирования анаэробов без анаэроостата 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, фаголизависимым 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, CO₂, H₂O, SH₂ 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 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 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.

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 аллантаисную 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 (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.

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»-Vіга. 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 аллантаисную 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 вируссодержащего 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 С) 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 гроздьсообразования (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, антогонизм, 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 транзиторную микрофлору. *Постоянная* микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. *Транзиторная* 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

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 45⁰ МПА. Осторожно перемешивают, затем чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном и инкубируют сутки в термостате

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

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

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

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

2. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

а) определить микробную обсемененность воздуха седиментационным методом. Для исследования воздуха чашки Петри с МПА открыть на 10 мин., затем инкубировать в термостате при 37⁰С.

б) определить

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОГО ЧИСЛА ВОДЫ

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА ВОДЫ

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

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ВОЗДУХА

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов с аптечной посуды

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

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. *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, *sphaira*- 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.sytingae*), 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 склеротии 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. amylovora*
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. michiganense*

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 β -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 кап-сульные 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.

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) точковая 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 170×10^5 жизнеспособных клеток, а в 1 мл — 170×10^6 , 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⁻, 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 37^0C , 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* Str^S; реципиент — штамм *E. Coli* K12 F⁻ *leu*⁺ Str^R. Hfr — обозначение состояния, для которого характерна высокая частота рекомбинации. Селективная среда для выделения рекомбинантов - минимальная глюкозосолевая среда: KH_2PO_4 — 6,5 г, MgSO_4 — 0,1 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1 г, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 0,001 г, 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 37^0C 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 37^0C 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 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, вихревые 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:

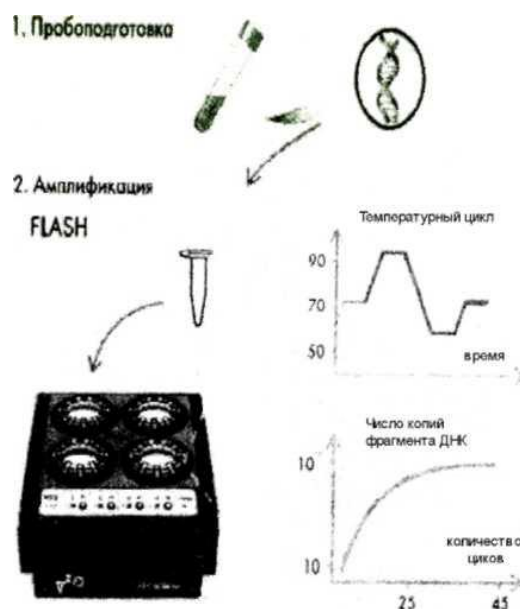
- В результате нагревания до 94 -95°C двойная цепь ДНК разделяется на две отдельные цепи.

- 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.

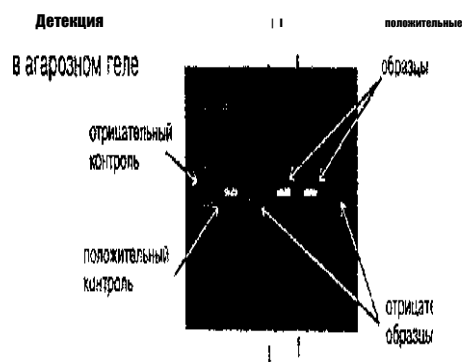
- Синтез (элонгация) — достраивание второй цепи ДНК.

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. 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.

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 деконтаминации, 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 50-60⁰С в течении 30 минут, а при температуре 70⁰ 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.	Фильтрование			
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 (фильтрование).

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 отработанном патологическом материале.

Систематизация приборов, процессов обработки и средств для дезинфекции и стерилизации

Классификация инструментов	Основные типы инструментов	Характер обработки и виды воздействий
Критические - 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.	Стерилизация - вирулицидные, спороцидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия. Длительная экспозиция: гамма-лучи, плазма, длительная газовая и химическая стерилизация, автоклавирование (2 атм. 15 мин), сухой жар (максим. режим, 2 часа)
Полукритические - 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.	Дезинфекция высокого уровня - вирулицидные, спороцидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия. Кратковременная экспозиция: 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.	Дезинфекция среднего уровня: вирулицидные, туберкулоцидные, бактерицидные воздействия.
	УЗ-ванночки и УФ-лампы стоматологов, физиотерапевтические инструменты, ложки для слепков.	Средства для химической дезинфекции с указанием на маркировке туберкулоцидной активности.
Некритические соприкасаются с неповрежденной кожей	Термометры для измерения температуры кожных покровов, стетоскопы, манжетки аппаратов для	Дезинфекция уровня: бактерицидные воздействия. Средства для химической дезинфекции без указания на маркировке наличия

	измерения давления, настольные приборы и т. п.	туберкулоцидной активности.
--	--	-----------------------------

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Укажите правильные ответы:

1. 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-лактамных 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-лактамных антибиотиков. Транспептидазы представляют собой набор белков-ферментов, локализованных в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Отдельные бета-лактамы различаются по степени сродства к тому или иному ферменту, которые получили название пенициллинсвязывающих белков. Поэтому биологический эффект бета-лактамных антибиотиков различен: бактериостатический, бактерицидный, литический.

Кроме бета-лактамных антибиотиков, синтез клеточной стенки поражают такие антибиотики, как бацитрацин, фосфомицин, циклосерин, ванкомицин, ристомидин, 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 высеян 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 высокочувствительна	диаметр зоны угнетения роста бактерий 30 и более мм.
Культура средне чувствительна	диаметр зоны угнетения роста бактерий не менее 20 мм.
Культура 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 инфекции.
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 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 секретлируемыми (экзотоксин) и несекретлируемыми (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. 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 видового иммунитета 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) 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 кольцепреципитации.

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.

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 закрепленной невосприимчивости вида к данному антигену или микроорганизму.

-*Приобретенный иммунитет* специфичен и не передаётся по наследству. Он формируется естественно и создается искусственно. Естественный приобретенный иммунитет появляется после перенесённого 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 им-мунокомпетентными клетками) и *клеточно-гуморальным* (обусловлен и антителами, и им-мунокомпетентными 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 сенсibilизированных 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 — плазм-клетками. 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	диагност икума
	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 ко́льце́преципитации

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° 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 (РИТА)

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 «раскрытого 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, 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°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° 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 (адьюванта), 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 коровьей 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 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 м³ до 1—2 м³. 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 цельновирсионные 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 удастся 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 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 | 1. Столбняк |
| б) Секстаанатоксин | 2. газовая гангрена |
| в) Тетраанатоксин | 3. Оба |
| г) АДС-М | 4. Ни то, ни другое |
| д) Противогангренозная сыворотка | |

4. Иммунологические препараты для профилактики и лечения ботулизма:

- а) антитоксическая сыворотка
- б) АКДС
- в) тетраанатоксин
- г) АДС

