**Государственное бюджетное образовательное учреждение**

**высшего профессионального образования**

**«Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрава РФ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | **Утверждено на заседании Учебно-методической комиссии по специальности «\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_»** |
|  |  | **Протокол №\_\_\_\_\_ от «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20\_\_г.** |
|  |  | **Председатель, (степень, звание, ФИО)** |

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ «МИКРОБИОЛОГИЯ»**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | Методическое обеспечение утверждено на заседании кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии |
|  |  | Протокол № 9 от « 9 » апреля 2013 г. |
|  |  |  |
|  |  | **Зав. кафедрой \_\_\_\_\_\_\_\_***\_\_*\_\_\_академик О.В.Бухарин |

**2.1 Пояснительная записка**

**Цель и задачи дисциплины**

1. Цель – изучение основных биологических свойств микроорганизмов, принципов и методов лабораторной диагностики, специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний. Знание предмета необходимо для практической деятельности врача любой специальности.
2. Задачи изучения микробиологии – студент должен овладеть теоретическими знаниями принципиально важных вопросов предмета, а также приобрести определенные навыки и умения в проведении лабораторных исследований для диагностики заболевания и применения специфических препаратов, а именно:

А) при изучении общей части предмета студент должен знать биологические свойства основных групп микроорганизмов, влияние факторов внешней среды на микроорганизмы, взаимоотношения, которые складываются между микробом и организмом человека (инфекция) и ответную реакцию организма человека. Механизмы иммунитета. Свойства антигенов и антител. Реакции иммунитета, их механизмы и практическое использование. Принципы приготовления и практического использования всех групп специфических препаратов для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

При изучении частной микробиологии должен знать этиологию, эпидемиологию и патогенез основных инфекционных заболеваний. Механизмы иммунитета. Принципы и методы лабораторной диагностики и специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Б) Студент должен уметь пользоваться оптическим микроскопом, посеять исследуемый материал от больного и выделить чистую культуру. Приготовить микропрепарат из микробных культур, окрасить простыми и сложными методами (Грамма и Циль-Нильсена). Идентифицировать микробы по морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам. Определить чувствительность микроба к антибиотикам и бактериофагам.

Уметь поставить основные реакции иммунитета с различными целями; прочитать результат иммунологических реакций и дать диагностическую оценку полученным результатам. Кроме того, уметь применить в условиях практической работы специфические препараты для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

**Основной учебник по дисциплине «**Медицинская микробиология, вирусология и иммунология»: учебник для студентов медвузов/ под ред. А.А.Воробьева. – 2-ое изд. М.:ООО «Мед.инф.агентство», 2006. – 704 с.

**2.2 Методические рекомендации по самостоятельной работе студентов в рамках лекционного курса**

Ведущую роль в организации учебного процесса играют лекции, которые определяют содержание и направленность работы студентов в освоении научных знаний, выполняют образовательную, воспитательную и учебно-организационную функцию. В лекции обобщаются результаты научных исследований, дается представление о современном состоянии изучаемого вопроса. Лекции вооружают студента необходимым минимумом знаний для самостоятельной работы и указывают ее цель и основные направления.

Для полноценного усвоения материала студент должен слушать лекцию и одновременно ее конспектировать. Правильно организованное конспектирование способствует дальнейшей подготовки к зачету или экзамену. Конспект лекции удобнее вести в общей тетради, пронумеровав ее и оставив первые страницы для оглавления, что дает возможность быстро найти нужную лекцию. Целесообразно в лекционной тетради оставить широкие поля, которые можно использовать для записи ссылок на литературу и источники, а также заполнять их дополнительным материалом, подчеркивающим особую важность тех или иных теоретических положений и пояснениями при самостоятельном чтении рекомендованной литературы при подготовке к зачету или экзамену.Дословно записывать содержание лекции нет необходимости. Конспектирование предполагает фиксирование лишь основных положений, главных мыслей и выводов. Необходимо обращать внимание на категории, формулировки, раскрывающие содержание тех или иных явлений и процессов, научные выводы и практические рекомендации.

Самостоятельная работа студента на лекции и заключается в выделении главного материала. Лекцию необходимо воспринимать творчески, избегать механического записывания. Любая информация, излагаемая преподавателем, может быть условно разделена на знакомую и незнакомую. Знакомая информация не требует от студента усилий для ее понимания – это уже в прошлом. Необходимо лишь постараться зафиксировать ее, чтобы в будущем в процессе оценки знаний продемонстрировать свободное владение этой информацией. Не стоит рассчитывать на то, что раз ее знаешь, то без малейшего труда и воспроизведешь, когда потребуется. Обычно знать и связно излагать – далеко не одно и то же. Незнакомые или редко используемые термины после того, как студент услышит их на лекции, попадают в его пассивный словарный запас, то есть он будет знать об их существовании, понимать значение, уметь правильно писать, но не обязательно – использовать в устной речи. Красота и богатство устной речи во многом определяются содержанием активного словарного запаса. Это означает, что, пока студент не проговорит несколько раз определенный термин, употребляя его в конкретном тексте, ему будет очень сложно этим термином пользоваться.

Незнакомую информацию следует прежде всего понять, осмыслить, а затем зафиксировать в сжатой форме в лекционной тетради. Если студент не смог в полной мере усвоить новые понятия, рекомендуется в индивидуальном порядке задать преподавателю уточняющие вопросы с целью уяснения теоретических положений, разрешения спорных ситуаций**.** Преподаватель может ответить на вопрос студента после окончания лекции или сразу в процессе лекционного занятия.

После того, как студент прослушал и законспектировал лекцию, целесообразно в тот же день обработать свой конспект: прочесть его, вписать пропущенное, исправить неточные выражения, формулировки, искажения, подчеркнуть важные места. Самостоятельная работа студента с лекционным материалом, состоящая из его повторения, структурирования, анализа, способствует усвоению полученных знаний.

Готовясь к практическому занятию, студент должен прежде всего ознакомиться с общим планом занятия. Далее следует внимательно прочесть конспект лекции по изучаемой теме и рекомендуемую литературу. При этом важно научиться выделять в рассматриваемой проблеме самое главное и сосредотачивать на нем основное внимание при подготовке. С незнакомыми терминами и понятиями следует ознакомиться в предлагаемом глоссарии, словаре или энциклопедии.

Лекции являются базой теоретической подготовки, так как дают систематизированные основы научных знаний. Знания, полученные на лекциях, должны закрепляться и углубляться в ходе самостоятельного дополнительного изучения. Для этого следует дорабатывать конспект лекции, делая в нем соответствующие записи при прочтении литературы, рекомендованной преподавателем и предусмотренной учебной программой.Самостоятельная работа студентов представляет собой одну из важнейших форм учебно-воспитательного процесса в высшей школе. При этом ее значимость имеет неуклонную тенденцию к возрастанию. Объясняется это тем, что в комплексе требований, предъявляемых к специалисту, все больший удельный вес приобретает умение самостоятельно ориентироваться в потоке информации и накопленных знаниях. Исходя из этого, кроме лекционного материала, в ходе подготовки к практическому занятию следует изучить основную литературу, ознакомиться с дополнительной литературой, новыми публикациями в периодических изданиях: журналах, газетах и т.д. При этом учесть рекомендации преподавателя и требования учебной программы. Также можно дополнить список использованной литературы современными источниками, не представленными в списке рекомендованной литературы, и в дальнейшем использовать собственные подготовленные учебные материалы при написании рефератов и сообщений.

Начинать надо с изучения рекомендованной литературы. Необходимо помнить, что на лекции обычно рассматривается не весь материал, а только его часть. Остальная его часть восполняется в процессе самостоятельной работы. В связи с этим работа с рекомендованной литературой обязательна. Особое внимание при этом необходимо обратить на содержание основных положений и выводов, объяснение явлений и фактов, уяснение практического приложения рассматриваемых теоретических вопросов. В процессе этой работы студент должен стремиться понять и запомнить основные положения рассматриваемого материала, примеры, поясняющие его, а также разобраться в иллюстративном материале. Далее, для углубленного изучения вопроса, следует ознакомиться с дополнительной литературой и новыми публикациями в периодических изданиях.

Чтобы в полной мере осознать и структурировать материал, представленный в основных и дополнительных источниках литературы, рекомендуется его законспектировать. Запись может осуществляться как кратко (в виде плана), так и более развернуто (тезисы, выписки). Для составления простого плана могут быть использованы названия глав и разделов из используемой литературы, которые служат в качестве отправных точек при ответе на вопрос семинара. Развернутый план помимо основных вопросов содержит подвопросы, также он предполагает выписывание наиболее существенных положений, показательных фактов и цифр. Более сложной формой записи являются тезисы. Они сжато передают содержание изучаемого материала. Достоинство тезисов состоит в том, что они дают возможность кратко передать основные мысли источника, выделить обобщения и выводы. Еще одной используемой формой записи являются выписки – отобранные из текста наиболее важные места или определения, записанные дословно или близко к тексту. Цитату целесообразно выделить, чтобы при чтении конспекта она сразу же бросалась в глаза. Важно помнить, что цитаты нужно отбирать очень строго и разборчиво, после прочтения всего текста.

Ведение записей способствует превращению чтения в активный процесс, мобилизует, наряду со зрительной, и моторную память. Следует помнить: у студента, систематически ведущего записи, создается свой индивидуальный фонд подсобных материалов для быстрого повторения прочитанного, для мобилизации накопленных знаний. Особенно важны и полезны записи тогда, когда в них находят отражение мысли, возникшие при самостоятельной работе.

**2.3 Методические указания по подготовке к практическим занятиям**

**Методические указания**

**Модуль1. Морфология и физиология микроорганизмов.**

1. Формируемые компетенции:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Шифр  компетенции | №  компетенции | Элементы компетенции |
| ОК | ОК-1 | - способность и готовность анализировать социально значимые проблемы и процессы, использовать на практике методы гуманитарных, естественнонаучных, медико-биологических и клинических наук в различных видах профессиональной и социальной деятельности **(ОК-1);** |
| ПК | ПК-3 | способность и готовность принимать участие в организации производственной деятельности фармацевтических предприятий и организаций по изготовлению и производству лекарственных средств **(ПК-3);** |
| ПК-4 | способность и готовность к производству лекарственных средств в условиях фармацевтических предприятий и организаций, включая выбор технологического процесса, необходимого технологического оборудования, с соблюдением требований международных стандартов **(ПК-4);** |

Практическое занятие №1.

2. Тема: Методы изучения морфологии микроорганизмов. Сравнительная морфология основных групп микроорганизмов.

3. Цель: ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов, сравнительной морфологией основных групп микроорганизмов, овладеть методом иммерсионной микроскопии.

4. Вопросы для рассмотрения:

1. Зависимость границ человеческого познания от уровня научно-технического прогресса. Становление микробиологии как науки.

2. Медицинская микробиология. Её значение в практической деятельности врача. Задачи предмета.

3. Оптическая микроскопия. Полезное увеличение. Разрешающая способность микроскопа.

4. Принципы иммерсионной, фазово-контрастной, флуоресцентной, электронной микроскопии.

5. Назначение и типы микропрепаратов из микроорганизмов: нативные, окрашенные (позитивно, негативно).

6. Основные группы микроорганизмов и их взаиморасположение в природе.

7. Связь формы и содержания, морфологии и функции на примере морфологии отдельных групп микроорганизмов.

8. Сравнительная морфология простейших, грибов, бактерий, спирохет, риккетсий, микоплазм, хламидий, вирусов.

5. Основные понятия темы.

Зависимость границ человеческого познания от уровня научно-технического прогресса. Становление микробиологии как науки. Исторические этапы развития. Вклад выдающихся ученых: А.Левенгук, Д.Самойлович, Э.Дженнер, Л.Пастер, Р.Кох, И.Мечников, П.Эрлих, Д.Ивановский, А.Флеминг, С.Виноградский, Н.Гамалея, П.Здродовский, Л.Зильбер, З.Ермольева, В.Тимаков, А.Смординцев, М.Чумаков, П.Кашкин.

Предмет медицинская микробиология. Задачи предмета. Значение медицинской микробиологии в практической деятельности врача.

Оптическая микроскопия. Строение микроскопа. Отличия сухих и иммерсионных объективов. Разрешающая способность микроскопа.

Принципы иммерсионной, фазово-контрастной, флуоресцентной, электронной микроскопии.

Типы микропрепаратов. . Методы приготовления препаратов для изучения микроорганизмов в живом состоянии (метод «висячей капли», метод «раздавленной капли»). Методы приготовления препаратов из различных биологических жидкостей организма (гноя, мокроты, крови) и чистых культур микроорганизмов (выращенных на плотных и в жидких питательных среда). Методы фиксации мазков (физический, химический). Методы простой окраски фиксированных мазков (позитивный и негативный методы).

Систематика микроорганизмов: определение понятия таксономические категории, примеры микроорганизмов, относящихся к каждой из категорий.

- Дать определение понятиям «вид», «штамм» и привести примеры.

- Выделить таксономические категории внутри вида: серовары, фаговары, резистовары, биовары – дать определение и привести примеры.

- Выявления общих морфологических признаков между основными группами микроорганизмов и отличительных черт.

- Морфология простейших, грибов, бактерий, спирохет, риккетсий и вирусов.

- Определить химические особенности микробных клеток, являющиеся основой для дифференциации бактерий на кислотоустойчивые и кислотонеустойчивые.

- Основные этапы механизма окраски кислотоустойчивых и кислотонеустойчивых бактерий.

6. Рекомендуемая литература:

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. СПб., 1998.
2. Методы общей бактериологии: пер. с англ. /под ред. Ф.Герхардта и др. - М. Мир, 1984.
3. Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах). Под редакцией Й.Ленгелера, Г.Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.
4. Б.Нолтинг. Новейшие методы исследования биосистем. М.: Техносфера, 2005
5. Коротяев А.И. Лищенко Н.Н. Молекулярная биология и медицина. М., 1987.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию.

ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1.Техника микроскопии:

а) ознакомиться с техникой фазово-контрастной и люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии (Работа 1);

б) обсудить схему и принципы действия иммерсионного и электронного микроскопов.

2. Освоить технику иммерсионной микроскопии при изучении сравнительной морфологии микроорганизмов. (Работа 2)

а) определить в готовых препаратах кокковидные и палочковидные формы бактерий;

б) рассмотреть лептоспиры в темнопольном микроскопе;

в) рассмотреть риккетсии в препарате из чистой культуры;

г) рассмотреть вирионы в препарате, обработанном по методу Морозова.

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1. Ознакомиться с различными методами микроскопии.**

Рассмотреть демонстрационный препарат: «раздавленная» капля из дрожжей,- при иммерсионной и фазово-контрастной микроскопии. Рассмотреть окрашенный флюорохромом препарат из дрожжей под люминесцентным микроскопом. Необходимо обратить внимание на качество изображения объектов. Сравнить способы микроскопии.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал  (материала для приготовления мазка) | **Микроскопический метод исследования** | | |
| Иммерсионная микроскопия  (рис.) | Фазово-контрастная микроскопия  (рис.) | Флуоресцентная микроскопия  (рис.) |
|  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какие преимущества имеет метод флуоресцентной микроскопии? 2. Какой принцип лежит в основе фазово-контрастной микроскопии?

Работа 2. Изучить морфологию основных групп микроорганизмов: бактерий, спирохет, риккетсий, вирусов.

Окрашенные препараты рассматривают под микроскопом с использованием масляной иммерсии.

Подготовка микроскопа для работы: поднять конденсор до уровня предметного столика, полностью открыть диафрагму, поставить плоское (при естественном освещении) или вогнутое (при искусственном освещении) зеркало. Осветить поле зрения под контролем объектива х 8.

Нанести на препарат каплю масла, положить препарат на столик микроскопа и закрепить зажимами. Установить иммерсионный объектив. Под контролем зрения (смотреть на объектив сбоку!) медленно опустить объектив макровинтом до погружения в масло. Затем, глядя в окуляр, медленно поднимать объектив до появления объекта. Провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, медленно вращая его только в пределах одного оборота.

Рассмотреть демонстрационные микропрепараты под световым микроскопом с масляной иммерсией. Препараты стафилококка, стрептококка, кишечной палочки, стрептобацилл, холерного вибриона, риккетсий Провачека окрашены по Граму. Препарат лептоспир окрашен негативным способом. Вирус оспы – по Морозову.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Микроорганизмы | | Рисунок | Метод окраски |
| Бактерии | Стафилококки |  |  |
| Кишечные палочки |  |  |
| Спирохеты | Трепонемы |  |  |
| Риккетсии | Риккетсии  Провачека |  |  |
| Вирусы | Вирус натуральной оспы |  |  |

Вывод: ответ на вопрос: как окрашиваются по Граму стафилококки, кишечная палочка?

задания для самостоятельной работы во внеучебное время

заполнить таблицу по микроскопическим методам исследования.

**Методы микроскопии.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид микроскопии | Принцип | Разрешающая способность | Применение |
| Иммерсионная |  |  |  |
| Темнопольная |  |  |  |
| Фазово-контрастная |  |  |  |
| Люминесцентная (флуоресцентная) |  |  |  |
| Электронная |  |  |  |

Практическое занятие №2.

2. Тема:«Строение бактериальной клетки».

3. Цель: изучить строение бактериальной клетки, овладеть методами приготовления и окраски микропрепаратов.

4. Вопросы для рассмотрения:

1. Строение бактериальной клетки, как результат эволюционной адаптации (конкретные примеры: капсула, споры, жгутики и др.).

2. Обязательные и необязательные компоненты бактериальной клетки: химический состав, строение и функция, методы выявления.

3. Понятие методах окраски бактерий и их назначение. Механизм окраски по Грамму и Цилю-Нильсену .

5. Основные понятия темы:

- Перечислить все структурные элементы бактериальной клетки, методы обнаружения.

- Химический состав, строение и функция каждого компонента бактериальной клетки: нуклеоид, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, рибосомы, мезосомы, капсула, спора, жгутики, внутрибактериальные включения, пили.

- Дать определение бактериям, частично и полностью утратившие клеточную стенку, перечислить причины утраты.

- Перечислить отличительные особенности L-форм, протопластов, сферопластов.

- Дать определение сложным методам окраски бактерий, их назначение.

- Варианты микроорганизмов по отношению к окраске по Граму.

- Определить химические особенности микробных клеток, являющиеся основой для дифференциации бактерий на грамположительные и грамотрицательные.

- Основные этапы механизма окраски грамположительных и грамотрицательных бактерий.

6. Рекомендуемая литература:

1. Коротяев А.И. Лищенко Н.Н. Молекулярная биология и медицина. М., 1987.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. СПб., 1998.
3. Методы общей бактериологии: пер. с англ. /под ред. Ф.Герхардта и др. - М. Мир, 1984.
4. Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах). Под редакцией Й.Ленгелера, Г.Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.
5. Б.Нолтинг. Новейшие методы исследования биосистем. М.: Техносфера, 2005.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию.

**ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Строение бактериальной клетки (Работа 1.)

а) Жгутики

* + рассмотреть препарат из бактерий со жгутиками, окрашенный по Грею;

обнаружить движение бактерий при темнопольной микроскопии в препарате «раздавленная» капля;

б) Капсула. Рассмотреть препарат из бактерий (клебсиелла с капсулой), окрашенный по Бурри-Гинсу;

в) Внутриклеточные включения. Рассмотреть препарат из дифтерийных палочек с зернами волютина, окрашенный метиленовой синькой;

г) Споры бактерий

* + рассмотреть препарат из палочек со спорами, окрашенный по Граму;

д) Клеточная стенка. Рассмотреть препарат плазмолиз дрожжей, окраска по Бурри-Гинсу.

2. Методика изготовления окрашенных и неокрашенных микропрепаратов (Работа 2):

а) приготовить из агаровой культуры препарат и окрасить метиленовым синим или фуксином;

б) приготовить из взвеси дрожжей препарат и окрасить негативным методом.

**САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ**

Работа 1 Изучить компоненты бактериальной клетки.

Рассмотреть демонстрационные препараты в световом микроскопе с масляной иммерсией:

1) Плазмолиз дрожжей, окраска по Бурри-Гинсу;

2) Палочка со спорой, окраска по Граму;

3) Палочка со жгутиками, импрегнация серебром

4) Палочка с капсулой в органе, окраска фуксином

5) Дифтерийная палочка с зернами волютина, окраска метиленовым синим.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонент  бактериальной клетки | Исследуемый материал | Метод обнаружения, окраска | Результат (рисунок с обозначениями) |
| Клеточная стенка |  |  |  |
| Капсула |  |  |  |
| Споры |  |  |  |
| Жгутики |  |  |  |
| Внутриклеточные включения |  |  |  |

Вывод: ответы на вопросы:

1. Какое функциональное значение имеют изученные компоненты бактериальной клетки?

2. Какие два рода клинически значимых спорообразующих микроорганизмов Вы знаете? Чем они отличаются друг от друга по морфологическим свойствам?

Работа 2. Овладеть методом приготовления и простой окраски микропрепаратов из чистой культуры бактерий.

I. Приготовление препарата из агаровой культуры

Для приготовления мазка необходимо взять чистое обезжиренное стекло. На предметном стекле обозначают стеклографом место нанесения материала. На обратную сторону стекла от обозначенного места наносят петлей каплю физиологического раствора. В левую руку берут пробирку с агаровой культурой, а в правую - петлю за петледержатель. Петлю обжигают на пламени горелки. Пробку прижимают к ладони 4 и 5 пальцами и медленными вращающими движениями извлекают из пробирки. Край пробирки обжигают. Петлю вводят в пробирку и остужают о стенки. Скользящим движением петлей берут материал и осторожно, не задевая о стенки, извлекают. Пробирку снова обжигают и закрывают пробкой.

В каплю физиологического раствора вносят исследуемую культуру и смешивают петлей до образования слегка мутноватой взвеси. Полученную взвесь равномерно распределяют на поверхности стекла, чтобы диаметр мазка был 1 – 1,5 см. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют, для этого проводят стекло над пламенем горелки три раза, при этом мазок должен быть сверху. Препарат окрашивают фуксином (1-2 мин) или метиленовой синькой (3-5 мин).

Для окраски негативным способом на стекло наносят каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе и смешивают с каплей туши. Препарат высушивают.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Позитивный метод окраски | | Негативный метод окраски тушью (рис.) |
| Фуксином (рис.) | Метиленовым синим (рис.) |
|  |  |  |

Обозначения к рисункам:

1. Название микроорганизма.

2. Фон (окрашен/не окрашен)

Вывод: ответ на вопросы:

1. Какие красители наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов?

2. В чем преимущества негативной окраски микроорганизмов?

3. Почему в микробиологических исследованиях используется метод иммерсионной микроскопии (преимущества метода)?

задания для самостоятельной работы во внеучебное время

Заполнить таблицу **«Обязательные и необязательные компоненты бактерий»**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пп | Обязательные компоненты | Необязательные компоненты |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |
| 4 |  |  |
| 5 |  |  |
| 6 |  |  |

Практическое занятие № 3.

2. Тема: Условия культивирования микроорганизмов. Бактериологический метод диагногстики инфекционных заболваний.

3. Цель: Изучить условия культивирования бактерий и и овладеть бактериологическим методом диагностики инфекционных заболеваний.

4. Вопросы для самоподготовки:

1. Физиологическая роль питания и дыхания у бактерий.

2.Ферменты бактерий и их практическое использование. Биотехнология.

3.Дифференциация микроорганизмов по типу дыхания, питания и отношению к температуре.

4.Динамика роста бактериальной популяции в жидкой питательной среде.

5.Практическое использование знаний о физиологии микроорганизмов. Условия культивирования бактерий:

а) типы питательных сред;

б) культивирование облигатных паразитов;

в) культивирование анаэробов.

6. Правила забора и транспортировки исследуемого материала для бактериологического исследования.

7. Правила оформления направления на бактериологическое исследование.

8. .Методы выделения чистых культур микроорганизмов.

9. Бактериологический метод диагностики. Цель. Этапы. Диагностическая ценность.

5.Основные понятия темы .

Микроорганизмам как всему живому присущи три основных физиологических функции: питание, дыхание и размножение.

**Питание** необходимо для синтеза в клетке всех органических структур, оно осуществляется с поглощением энергии. Основным источником энергии являются окислительно-восстановительные процессы (дыхание). По типу питания микробы делятся на **аутотрофы и гетеротрофы.** Аутотрофы усваивают азот и углерод из неорганических веществ (СО2 и др.), а гетеротрофы – из сложных органических соединений (аминокислоты, моносахара и др.), синтезированных ранее другими живыми организмами. Гетеротрофы в свою очередь делятся на **сапрофиты и паразиты**. Сапрофиты нуждаются в органических соединениях мертвого субстрата (возбудители газовой инфекции: Cl. рerfringens и др.), а паразиты получают питательные вещества в организме-хозяине. Паразиты могут быть облигатными (внутриклеточными) и факультативными. Облигатные внутриклеточные паразиты (вирусы) лишены способности жить и размножаться вне клеток хозяина, так как зависят от их метаболизма. Факультативные паразиты (гонококки, стрептококки, шигеллы и др.) могут питаться как в организме, так и вне его, так как обеспечены автономными ферментными системами преобразования веществ и энергии.

**Дыхание** микроорганизмов – биологическое окисление субстрата с выделением необходимой для метаболизма энергии. По типу дыхания микроорганизмы делятся на 3 основных группы: **аэробы, анаэробы, факультативные анаэробы/аэробы.** Аэробы могут жить только в присутствии кислорода (V.cholerae), анаэробы (облигатные) только в отсутствии кислорода (Cl.tetani), факультативные анаэробы могут жить при любом процентном содержании кислорода и без него (St.aureus).

**Размножение** бактерий осуществляется путем простого поперечного деления клетки.

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на **термофилы (**диапазон роста 50 - 70 оС), **мезофилы (**диапазон роста 20 - 40 оС) и **психрофилы (**диапазон роста 0 - 10 оС). Большинство патогенных для человека бактерий относятся к группе мезофилов.

**Культивирование** микроорганизмов осуществляют при создании ряда условий с учетом типов питания, дыхания, отношения к температуре и скорости размножения.

Для культивирования сапрофитов и факультативных паразитов используют исскусственные питательные среды, которые по своему назначения бывают **простые, элективные и дифференциально-диагностические,** а по консистенции – жидкие, полужидкие и плотные. Простые среды: мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, пригодны для выращивания большинства бактерий. Элективные среды позволяют культивировать определенный вид или виды микроорганизмов: щелочная пептонная вода для холерного вибриона, среда Китта-Тароцци для облигатных анаэробов. Дифференциально-диагностические среды используют для изучения биохимичесих свойств микроорганизмов: среда Эндо, стафитесты.

Культивирование облигатных внутриклеточных паразитов осуществляют на «живых» средах: культуре клеток, курином эмбрионе, экспериментальном животном.

Создание особых условий **анаэробиоза** требуется при культивировании облигатных анаэробов. При этом используют особые приборы и среды: анаэростат, эксикатор, среды Вильсона-Блер, Китта-Тароцци и др.

Подавляющее большинство объектов изучения медицинской микробиологии культивируют при температуре 37оС в специальном приборе **термостате** в течение18 -24 часов.

Микроорганизмам как всему живому присущи три основных физиологических функции: питание, дыхание и размножение.

**Питание** необходимо для синтеза в клетке всех органических структур, оно осуществляется с поглощением энергии. Основным источником энергии являются окислительно-восстановительные процессы (дыхание). По типу питания микробы делятся на **аутотрофы и гетеротрофы.** Аутотрофы усваивают азот и углерод из неорганических веществ (СО2 и др.), а гетеротрофы – из сложных органических соединений (аминокислоты, моносахара и др.), синтезированных ранее другими живыми организмами. Гетеротрофы в свою очередь делятся на **сапрофиты и паразиты**. Сапрофиты нуждаются в органических соединениях мертвого субстрата (возбудители газовой инфекции: Cl. рerfringens и др.), а паразиты получают питательные вещества в организме-хозяине. Паразиты могут быть облигатными (внутриклеточными) и факультативными. Облигатные внутриклеточные паразиты (вирусы) лишены способности жить и размножаться вне клеток хозяина, так как зависят от их метаболизма. Факультативные паразиты (гонококки, стрептококки, шигеллы и др.) могут питаться как в организме, так и вне его, так как обеспечены автономными ферментными системами преобразования веществ и энергии.

**Дыхание** микроорганизмов – биологическое окисление субстрата с выделением необходимой для метаболизма энергии. По типу дыхания микроорганизмы делятся на 3 основных группы: **аэробы, анаэробы, факультативные анаэробы/аэробы.** Аэробы могут жить только в присутствии кислорода (V.cholerae), анаэробы (облигатные) только в отсутствии кислорода (Cl.tetani), факультативные анаэробы могут жить при любом процентном содержании кислорода и без него (St.aureus).

**Размножение** бактерий осуществляется путем простого поперечного деления клетки.

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на **термофилы (**диапазон роста 50 - 70 оС), **мезофилы (**диапазон роста 20 - 40 оС) и **психрофилы (**диапазон роста 0 - 10 оС). Большинство патогенных для человека бактерий относятся к группе мезофилов.

**Культивирование** микроорганизмов осуществляют при создании ряда условий с учетом типов питания, дыхания, отношения к температуре и скорости размножения.

Для культивирования сапрофитов и факультативных паразитов используют исскусственные питательные среды, которые по своему назначения бывают **простые, элективные и дифференциально-диагностические,** а по консистенции – жидкие, полужидкие и плотные. Простые среды: мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, пригодны для выращивания большинства бактерий. Элективные среды позволяют культивировать определенный вид или виды микроорганизмов: щелочная пептонная вода для холерного вибриона, среда Китта-Тароцци для облигатных анаэробов. Дифференциально-диагностические среды используют для изучения биохимичесих свойств микроорганизмов: среда Эндо, стафитесты.

Культивирование облигатных внутриклеточных паразитов осуществляют на «живых» средах: культуре клеток, курином эмбрионе, экспериментальном животном.

Создание особых условий **анаэробиоза** требуется при культивировании облигатных анаэробов. При этом используют особые приборы и среды: анаэростат, эксикатор, среды Вильсона-Блер, Китта-Тароцци и др.

Подавляющее большинство объектов изучения медицинской микробиологии культивируют при температуре 37оС в специальном приборе **термостате** в течение18 -24 часов.

**Бактериологический метод** является основным методом диагностики инфекционных заболеваний. Его сущность – определение вида возбудителя инфекции, следовательно, на основании результатов бактериологического метода можно поставить этиологический (окончательный) диагноз. Основным недостатком метода является длительность исследования – от 3 до 5 суток, а в отдельных случаях и более.

Успех проведения бактериологического метода во многом зависит от предварительного этапа, включающего забор исследуемого материала и его транспортировку, оформление направления в бактериологическую лабораторию. При этом необходимо соблюдение ряда правил.

1. **Забор** исследуемого материала необходимо провести до начала антибактериальной терапии или через 8-10 часов после введения последней дозы антибиотика. Чтобы избежать загрязнения пробы микрофлорой окружающей среды необходимо соблюдать строжайшую асептику. Для этого использовать стерильный материал: а) ватные тампоны для взятия материала из раны, со слизистых оболочек (глаз, зева, носа); б) проволочную петлю для взятки материала из влагалища, анального отверстия; в) шприц для взятия крови, гноя; г) стерильную посуду для непосредственного сбора в нее мочи, мокроты, испражнений.
2. **Транспортировку** полученного материала следует производить в максимально короткие сроки (2-3 часа) в специальных биксах или пеналах.
3. **Направление** прилагают к клиническому образцу в качестве сопроводительного документа. Оно содержит основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования:

* фамилия, имя, отчество, возраст пациента;
* предполагаемый диагноз заболевания;
* предшествующая антимикробная терапия;
* характер материала;
* дата и время взятия материала;
* цель исследования;
* название лечебного учреждения, номер отделения, палаты;
* подпись лечащего врача.

Бактериологический метод осуществляется в два этапа (рис.2.1.):

1. Выделение чистой культуры возбудителя (1-2 суток);
2. Идентификация чистой культуры (1-3 суток).

На первом этапе проводится посев исследуемого материала на твердую или в жидкую питательную среду, оценка культуральных свойств, отбор подозрительных колоний и их отсев на скошенный агар. Этап идентификации включает обязательное изучение морфологии, биохимических свойств и антигенной структуры выделенной чистой культуры, а также проведение дополнительных исследований по определению антибиотикочувствительности, фагочувствительности, фаготипирования, изучения патогенности и персистентных свойств.

6. Рекомендуемая литература:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медвузов / Под ред. А.А.Воробьева. – 2-ое изд. М.: ООО «Мед.инф.агентство», 20006. – 704с.

2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология.МИА. Москва, 20001, 723с.

3. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. Спб., 1998.

4. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии , вирусологии и иммунологии / Под ред. О.В.Бухарина – М.: Медицина, 2002, 340с.

5. Медицинская микробиология (Вопросы. Ответы. Схемы) / Под ред. О.В.Бухарина – М.: Медицина, 2004,

1. Самостоятельная работа студентов к занятию.

**Работа 1**

**Цель:** Освоить бактериологический метод диагностики.

**Задача**. В бактериологическую лабораторию поступил исследуемый материал (испражнения) от больного с предварительным диагнозом: «Пищевая токсикоинфекция?». При микроскопии материала обнаружены грамположительные кокки и грамотрицательные палочки.

Выделите чистые культуры микроорганизмов, проведите их идентификацию. Определете этиологию пищевой токсикоинфекции.

**Методика:**

Все этапы бактериологического метода условно осуществляются в течение одного занятия: студент выполняет манипуляции очередного этапа, относит материал в термостат и сразу получает готовый результат для выполнения следующего этапа исследования.

1. Посев исследуемого материала на агар в чашке Петри методом механического разобщения с целью получения отдельных колоний (1-ый день).

Простерилизованной в пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и вносят в чашку, слегка приоткрыв крышку. На поверхности питательной среды материал распределяют петлей следующим образом: у края чашки частыми штрихами образуют овальную площадку, на которой остается значительная часть материала, затем проводят параллельные штрихи на расстоянии 0,5 см от одного края чащики к другому. При посеве петлю следует держать параллельно агару, чтобы не царапать его (рис.2.2.а). После рассева петлю вынимают из чашки и немедленно обжигают в пламени, одновременно закрывая чашку Петри крышкой. Чашку маркируют и помещают вверх дном в термостат на сутки.

2.Изучение культуральных свойств выросших колоний (2-ой день).

Через сутки при правильном посеве на последних штрихах вырастают отдельные колонии (рис.2.2.б). Дифференцируют разные типы колоний по величине, цвету (Рис. 2.3.а), форме, прозрачности, характеру поверхности (гладкая, шероховатая) и края (ровный, зазубренный) (рис.2.3.б). Из материала части колоний готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Остаток изучаемой колонии отсевают петлей в пробирку на скошенный питательный агар для получения чистой культуры. Посев ставят в термостат на сутки.

3. Идентификация выделенной чистой культуры (3-ий день).

Через сутки выросшую чистую культуру идентифицируют по основным видовым признакам. Изучают морфологию при микроскопии мазка из чистой культуры. Осуществляют посев чистой культуры на дифференциально-диагностические тест-системы (стафитест, энтеротест) для изучения биохимической активности. Для этого готовят 1-миллиардную взвесь бактерий в физиологическом растворе, затем дозаторными или пастеровскими пипетками вносят 0,1 мл взвеси в лунки тест-системы. Планшет относят в термостат на сутки.

4. Определение вида выделенных микроорганизмов (4-ый день).

Через 24 часа оценивают результаты биохимической активности по изменению цвета индикатора в лунке и сопоставляют их с дифференцирующими таблицами тест-системы. По результатам изучения свойств выделенных чистых культур определяют виды микроорганизмов, что является одной из конечных целей бактериологического метода диагностики. Используют определитель Берджи.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 этап. Идентификация чистой культуры | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 день  Биохимические свойства | | | | | | | | | | | | | | | |
| Энтеротест | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | | 3 | 4 | 5 | | 6 | 7 | 8 | | 9 | 10 | 11 | | 12 |
| Стафитест | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Виды выделенных микроорганизмов (латинская транскрипция). 2. Можно ли на основании полученных результатов сделать заключение об этиологии ПТИ? Почему?).

**Работа 2**

**Методы культивирования анаэробов**

**Цель**: Изучить методы культивирования анаэробов.

**Методика:**

1. Рассмотреть прибор анаэростат и ознакомиться с принципом его работы.

Анаэростат – прибор для создания бескислородной воздушной среды представляет собой толстостенную металлическую емкость для помещения чашек Петри или пробирок. Система газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и замерять давление (рис. 2.4.б).

1. Ознакомиться с условиями создания анаэробиоза в эксикаторе (свеча, тиогликолевая кислота).

Эксикатор – толстостенная стеклянная емкость с притертой крышкой и подставкой для чашек Петри. На дно эксикатора ставится горящая свеча либо наливается тиогликолевая кислота (химический редуцент кислорода), затем крышка притирается (рис. 2.4.а).

3. Рассмотреть чашку с сокультивированием аэробов и анаэробов (способ Фортнера).

В чашку Петри на поверхность питательного агара, разделенного пополам посредине чашки, производят посев на одной половине аэробов, на другой – анаэробов. Чашку герметизируют парафином и помещают в термостат. При остаточном кислороде растут аэробы, после его утилизации начинают расти анаэробы.

4. Рассмотреть и изучить состав специальных сред для культивирования анаэробов.

Среда Китта-Тароцци - питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных. Глюкоза и кусочки органов обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла. Среда контроля стерильности (СКС) – 0,3% агар с добавлением тиогликолевой кислоты (редуцент О2), посев уколом.

Среда Вильсона-Блер – высокий столбик питательного агара с добавлением солей натрия и железа, посев уколом. Анаэробы образуют черные колонии в глубине столбика за счет химической реакции с солями металлов.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| **Методы, среды** | **Условия создания анаэробиоза** |
| 1. Физический. 2. Химический 3. Биологический 4. Специальные среды;  * Китта-Тароцци; * Вильсона-Блер; * СКС (среда контроля стерильности); * Высокий столбик агара. |  |

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ

РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1. Основные процессы, составляющие физиологию микроорганизмов 2. Группы бактерий по типу дыхания 3. Питательные среды для культивирования облигатных анаэробов 4. Группы бактерий по способности утилизировать углерод и азот 5. На какие группы классифицируют гетеротрофы? 6. На какие группы классифицируют паразиты? 7. Дать определение облигатным паразитам   1. Дайте определение колоний  2. Дайте определение чистой культуре бактерий  3. Перечислите принципы выделения чистых культур бактерий  4.Назовите этапы бактериологического метода диагностики  5. По каким обязательным критериям проводят идентификацию чистой культуры?  6. Какие дополнительные признаки определяют у чистой культуры?   1. Назвать условия культивирования бактерий 2. Назовите типы питательных сред по назначению 3. Перечислите способы размножения бактерий | Питание, дыхание, размножение, изменчивость.   1. Облигатные аэробы 2. Облигатные анаэробы 3. Факультативно-анаэробные микроорганизмы 4. Микроаэрофилы   Среда Китта-Тароцци, среда Вильсона-Блер, СКС.  Аутотрофы, гетеротрофы  Сапрофиты и паразиты  Облигатные и факультативные  Микроорганизмы, полностью лишенные способности жить вне клеток живого организма (вирусы, риккетсии, хламидии)  Потомство одной клетки при размножении на твердой питательной среде  Популяция микроорганизмов, состоящая из особей одного вида   1. Механическое разобщение микроорганизмов при посеве 2. Использование биологических свойств бактерий 3. Выделение чистой культуры 4. Идентификация чистой культуры 5. Морфология 6. Биохимические свойства 7. Антигенная структура   1.Антибиотикорезистентность  2. Фаготипирование  3. Факторы патогенности и персистенции   1. Питательная среда 2. Оптимальная температура 3. Аэробные или анаэробные условия 4. Время культивирования 5. Простые 6. Элективные 7. Дифференциально-диагностические   1.Поперечное деление |  | Потомство одной клетки при размножении на твердой питательной среде  Популяция микроорганизмов, состоящая из особей одного вида   1. Механическое разобщение микроорганизмов при посеве 2. Использование биологических свойств бактерий 3. Выделение чистой культуры 4. Идентификация чистой культуры 5. Морфология 6. Биохимические свойства 7. Антигенная структура   1.Антибиотикорезистентность  2. Фаготипирование  3. Факторы патогенности и персистенции |

ПИСЬМЕННОЕ ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

В тетради для практических занятий составить и заполнить таблицу.

Таблица. Характеристика этапов бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Объект исследования | Этап выделения чистой культуры  (методика) | Этап идентификации чистой культуры (методика) | Результат исследования |
| 1. Исследуемый материал | 1.  2.  3. |  |  |
| 2. Чистая культура бактерий |  | 1.  2.  3. |  |

Практическое занятие № 4.

2. Тема: Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.

3. Цель: Изучить действие физических и химических факторов на микроорганизмы, ознакомиться с практическим использованием в медицине результатов действия абиотических факторов на микроорганизмы и усвоить принципы микробиологической оценки качества стерилизации.

4. Вопросы для самоподготовки:

1.Факторы внешней среды, действующие на микроорганизмы.

2.Результаты действия факторов внешней среды на микроорганизмы.

3. Условия, определяющие результат действие факторов.

4.Практическое использование знаний о воздействии факторов внешней среды на микробы – культивирование, стерилизация, дезинфекция, антисептика, химиотерапия.

5.Понятие об асептике.

5. Основные понятия темы:

Группы факторов внешней среды, воздействующие на микроорганизмы. При обсуждении вопроса приводятся конкретные примеры факторов внешней среды. Используется учебная таблица «Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы».

- Результаты действия факторов внешней среды на микроорганизмы. Обсуждаются возможные варианты результатов действия факторов и приводятся примеры их конкретного практического применения.

- Условия, определяющие результат действия фактора. При обсуждении вопроса приводятся конкретные примеры зависимости результата действия от свойств и параметров факторов и объектов воздействия. Целесообразно при ответах студентов использовать в качестве иллюстрации демонстрационный материал практических работ.

- Варианты губительного действия факторов внешней среды на микробы. При обсуждении оценивается клиническое значение этих вариантов при химиотерапии.

- Практическое использование губительного действия факторов внешней среды на микробы. При обсуждении вопроса выясняется сущность таких мероприятий, как стерилизация, дезинфекция, антисептика, химиотерапия, асептика.

- Химиотерапия инфекционных болезней. Выясняются основные свойства химиопрепаратов, понятие химиотерапевтического индекса. Используются учебные планшеты «Основные группы химиопрепаратов».

6. Рекомендуемая литература:

1. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Некультивируемые формы бактерий и их роль в сохранении возбудителей сапронозов во внешней среде // Журн. микробиол., 1997. №3. С. 116–121.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб., 1998.
3. Литвин В.Ю. и др. Эколого-генетические механизмы перехода Salmonella typhimurium в покоящееся состояние в окружающей среде // Журн. микробиол., 2001. №6. С 32–36.
4. Марьин В.А. Рост, пассивация и отмирание микроорганизмов. М., 2004.
5. Шандала М.Г. Дезинфектологические проблемы медицинской эндоскопии // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2005. №6 С.8–12.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию:

**ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Действие физических и химических факторов на бактерии:

* поставить опыт по действию карболовой кислоты на взвесь стафилококка (Работа 1);
* учесть результат опыта по действию УФЛ на бактерии (Работа 2).

2. Практическое применение действия факторов внешней среды на микроорганизмы:

* ознакомиться с устройством и работой автоклава – экскурсия в автоклавную (Работа 3);

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

**Цель**: Оценить действие карболовой кислоты на стафилококк.

**Задача**. Лабораторную посуду после работы с патогенным стафилококком необходимо подвергнуть дезинфекции 5% карболовой кислотой.

Отработайте временной режим губительного действия карболовой килосты на стафилококк.

**Методика:**

1. Пастеровской пипеткой добавляют 5 капель взвеси стафилококка в пробирку с 1 мл 5% карболовой кислоты.
2. Из пробирки с карболовой кислотой 4-5 капель жидкости засевают на скошенный агар: первый раз – через 10, а второй раз через 30 минут после начала опыта.
3. Посевы помещают в термостат на 24 часа.
4. Через сутки учитывают результаты опыта. Просматривают пробирки и определяют наличие или отсутствие роста микроба.

Результат работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид бактерий | Результат действия 5% карболовой кислоты | |
| Через 10 минут  Рост (есть, нет) | Через 30 минут  Рост (есть, нет) |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. От чего зависит результат эффективного действия карболовой кислоты на стафилококк? 2. Какой режим обработки лабораторной посуды Вы рекомендуете?).

**Работа 2**

**Цель**: Оценить действие УФЛ на взвесь неспорообразующих бактерий.

**Задача**. При посеве воздуха из операционной выделена культура золотистого стафилококка. Необходимо установить эффективный временной режим стерилизации воздуха операционной ультрафиолетовыми лучами.

**Методика:**

1. Готовят 1-миллиардную взвесь выделенного стафилококка по стандарту мутности. Для этого чистую культуру микроба суспензируют в 2 мл стерильного физиологического раствора.
2. Производят посев шпателем по 0,1 мл взвеси стафилококка на питательный агар в две чашки Петри для получения сполошного роста бактерий. Для этого на поверхность агара наносят пипеткой 0,1 мл взвеси и затем стерильным шпателем осторожно гладящими движениями распределяют материал по всей поверхности чашки. Шпатель и пипетку помещают в стакан с дезраствором.
3. С чашек Петри после посева снимают крышки, прикрывают чашки картоном, в центре которого вырезана буква «М».
4. Помещают чашки под лучи кварцевой лампы на расстоянии 30-40 см на 10 минут и на 30 минут соответственно.
5. После облучения чашки накрывают крышками, маркируют и помещают в термостат на 18-24 часа.
6. Через сутки учитывают результат опыта. Определяют наличие стерильной зоны в виде буквы «М» на фоне сплошного роста стафилококка при эффективном режиме кварцевания (рис.2.6.).

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид бактерий | Результат действия УФЛ | |
| Экспозиция 10 мин. (рис.) | Экспозиция 30 мин (рис.) |
|  |  |  |

Вывод: (ответить на вопрос: Какой режим воздействия УФЛ Вы рекомендуете для стерилизации операционной и почему?).

**Работа 3**

**Цель:** Ознакомиться с правилами и режимом работы автоклава, основными методами стерилизации.

**Методика:**

1. Внимательно прослушать информацию во время экскурсии в автоклавную.
2. Ознакомиться с устройством, правилами и режимом работы автоклава (рис.2.5.б).
3. Ознакомиться с принципами основных методов стерилизации.
4. Изучить методы контроля стерильности сред и материалов.
5. Оформить протокол исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Метод стерилизации | Действующие факторы | Режим  стерилизации | Контроль качества стерилизации |
| 1. Автоклавирование 2. Сухожаровой шкаф 3. Дробная стерилизация |  |  |  |

Практическое занятие № 5.

2. Тема: Действие биологических факторов на микроорганизмы. Генетика микроорганизмов.

3. Цель: Изучить теоретические предпосылки и овладеть практическими навыками проведения мероприятий с использованием действия биологических факторов и генотипической изменчивости бактерий.

4. Вопросы для самоподготовки.

1. Антибиотики. Определение. Природа, происхождение, спектр, механизмы и результаты действия на микроорганизмы.

2. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и пути ее преодоления.

3. Осложнения антибиотикотерапии.

4. Бактериоцины. Свойства. Практическое значение.

5. Бактериофаги. Природа и свойства. Этапы взаимодействия с клеткой. Практическое использование.

6. Эубиотики. Природа, механизм действия. Практическое использование.

7. Механизмы генотипической изменчивости – мутации, трансформация, трансдукция, лизогенная конверсия, конъюгация.

8. Метод молекулярной гибридизации (ДНК-зондирование), ПЦР в диагностике заболеваний.

5. Основные понятия темы:

История открытия антибиотиков. При обсуждении этого вопроса необходимо выяснить вклад А.Флеминга, З.В. Ермольевой, З. Ваксмана в открытие и создание первых антибиотиков.

- Биологическая сущность антибиотиков. При обсуждении этого вопроса дается определение антибиотиков, выясняется их биологическая роль как средств межвидового антагонизма.

- Классификация антибиотиков по происхождению. Выясняются достоинства и недостатки основных групп антибиотиков. Приводятся примеры представителей каждой группы. Особое внимание уделяется роли универсального природного антибиотика лизоцима. Можно привести материалы по его изучению сотрудниками кафедры и академии.

- Основные фармакологические группы антибиотиков. При обсуждении этого вопроса необходимо использовать таблицу «Основные группы антибиотиков» и учебный демонстрационный планшет.

- Механизм действия антибиотиков. При обсуждении этого вопроса указываются точки приложения антибиотиков в бактериальной клетке, при этом необходимо вспомнить об обязательных структурных компонентах микробной клетки. В процессе обсуждения можно использовать рисование на доске или таблицу «Основные группы антибиотиков».

- Осложнения при антибиотикотерапии. Выясняются причины возникновения токсического действия антибиотиков, дисбактериоза, аллергических проявлений, иммуносупрессии, формирования антибиотикорезистентности. Следует обратить внимание студентов на невозможность полного устранения побочных явлений при антибиотикотерапии, но в то же время максимальное их нивелирование при использовании принципов рациональной антибиотикотерапии.

- Эубиотики как средства этиотропной терапии. При обсуждении этого вопроса дается определение эубиотиков. Выясняется биологическая роль бактериоциногении. Определяются механизм действия препаратов и показания к их применению. В процессе ответа студент может использовать учебный планшет «Препараты для этиотропной терапии».

- Бактериофаги как средства этиотропной терапии. Кратко представляется морфогенез бактериофагов. Даются различия умеренного и вирулентного бактериофагов и их практическое использование в медицине. Можно использовать таблицу «Бактериофаги».

- Генетическая изменчивость бактерий. Выясняются основные механизмы генетической изменчивости. Обсуждается роль генной инженерии в получении и производстве новых микробных препаратов и их продуцентов. При ответе можно использовать таблицу «Генотипическая изменчивость бактерий».

6. Рекомендуемая литература:

1. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологи и медицине. Томск, 1974.

2. Волошин С.А., Капрельянц А.С. Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях //Биохимия, 2004. № 11. С.1555-1564.

1. Гинцбург А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний //Журн. микробиол., 1998. № 3. С.86-95.
2. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение //Антибиотики и химиотерапия, 1999. № 6. С.33-40.
3. Кудлай Д.Г. Бактериоциногения. Л., 1966.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию:

1. Изучить действие антибиотиков на бактерии:

* определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом диффузии в агар (индикаторных дисков) (Работа 1);
* определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом серийных разведений (Работа 2).

4. Изучить действие бактериофагов.

* учесть результаты реакции фаготипирования (Работа 3);

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

**Цель**: Овладеть навыком определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом индикаторных дисков.

**Задача**. В клинику поступил больной с диагнозом «Стафилококковая пневмония». Для успешного этиологического лечения с целью выбора эффективного антибиотика было рекомендовано определение антибиотикограммы возбудителя. Проведите исследование. Оцените результат. Сделайте вывод.

**Методика:**

1. Исследуемую культуру суспензируют в 2 мл стерильного физиологического раствора и готовят 1-миллиардную взвесь по стандарту мутности.
2. Бактериальную взвесь (1 мл) стерильной пипеткой наливают на поверхность среды в чашку Петри и равномерно распределяют путем покачивания (либо шпателем). Избыток жидкости удаляют пастеровской пипеткой. Шпатель и пипетки помещают в стакан с дезраствором.
3. На различные участки засеянного агара пинцетом помещают диски с антибиотиками (6-8), стараясь не касаться агара. Диск пинцетом слегка прижимают к агару.
4. Чашки с посевами помещают в термостат на 18-24 часа.
5. Через сутки проводят оценку результата опыта путем измерения зоны задержки роста (в мм) бактерий по диаметру, включая бумажный диск (Рис.2.7.).

Результаты выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

Шкала оценки чувствительности бактерий к антибиотикам

|  |  |
| --- | --- |
| Размер зоны задержки роста в мм | Чувствительность |
| До 10 мм  Более 10 мм | Не чувствителен  Чувствителен |

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид  возбудителя | Результат посева на чувствительность к антибиотикам (рисунок с обозначениями) | Величина зон задержки роста ( в мм) | | | | | |
| Антибиотики | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. К каким антибиотикам чувствителен выделенный возбудитель? Какой антибиотик Вы рекомендуете для лечения и почему?).

**Работа 2**

**Цель**: Определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом серийных разведений.

**Задача**. С целью назначения больному рациональной схемы лечения пенициллином потребовалось определить бактериостатическую и бактерицидную концентрацию препарата по отношению к возбудителю – золотистому стафилококку.

**Методика:**

1. В пробирки разливают стерильный мясо-пептонный бульон (МПБ) по 1 мл.
2. Добавляют исследуемый антибиотик в различных концентрациях: от 1 ед/мл до 128 ед/мл.
3. Заливают в пробирки 18-часовую бульонную культуру стафилококка по 1 мл.
4. Инкубируют посевы в термостате 24 часа.
5. Через сутки учитывают результаты опыта:

а) Определяют минимальную подавляющую (бактериостатическую) концентрацию антибиотика (МПК). За нее принимают наименьшую концентрацию антибиотика, при которой не происходит размножение бактерий, и содержимое пробирки остается прозрачным.

б) Определяют минимальную бактерицидную концентрацию антибиотика (МБК). Для этого из пробирок с отсутствием видимого роста и из пробирки с минимальной концентрацией антибиотика, где рост есть (контроль), производят высев секторами на мясо-пептонный агар в чашки Петри. На секторах обозначают концентрацию антибиотика, из которой сделан высев. Чашки относят в термостат на 18-24 часа.

6. Через сутки просматривают чашки и определяют МБК по отсутствию роста бактерий на агаре в соответствующих секторах.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентрация антибиотика в МПБ (ед/мл) | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | К |  |
| Наличие роста микроба в МПБ (мясо-пептонный бульон) |  |  |  |  |  |  |  |  |  | МПК |
| Наличие роста микроба при высеве на МПА (мясо-пептонный агар) |  |  |  |  |  |  |  |  |  | МБК |

Вывод: (ответить на вопросы: Почему МБК выше, чем МПК? Может ли быть наоборот? Почему?).

**Работа 3**

**Цель**: Определить фаготип исследуемой культуры.

**Задача**. В районе произошла вспышка брюшного тифа. Из воды у места водозабора выделен возбудитель S.typhi. С целью установления пути распространения инфекции рекомендовано определить фаготипы выделенных бактерий (из воды и от больных людей). Оцените результат. Сделайте вывод.

**Методика:**

1. На чашки Петри засевают шпателем взвеси исследуемых культур.
2. На засеянную поверхность агара пастеровскими пипетками наносят аккуратными каплями сальмонеллезные индикаторные бактериофаги различных типов. Места нанесения фагов маркируют на дне чашки. Пипетки и шпатель помещают в стакан с дезраствором.
3. Посев помещают в термостат на 24 часа.
4. Через сутки учитывают результат. На поверхности выросших исследуемых культур определяют зоны лизиса бактерий соответствующим типом фага (Рис.2.10.).
5. Сравнивают фаготипы выделенных из разных источников культур бактерий.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид возбудителя | Результат | |
| Исследуемая культура № 1 (вода)  (рис. с обозначениями) | Исследуемая культура № 2 (больной А)  (рис.с обозначениями) |
|  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: Явилась ли вода фактором распространения данной инфекции? Почему?).

Практическое занятие № 6.

2. Тема: Рубежный контроль «Морфология и физиология микроорганизмов»

3. Цель: Осуществление контроля знаний по разделу модуля 1. «Морфология и физиология микроорганизмов».

4. Задачи:

- Оценить теоретическую подготовку по материалам модуля «Морфология и физиология микроорганизмов».

- Оценить навыки и умения, полученные на практических занятиях модуля «Морфология и физиология микроорганизмов».

Итоговое занятие состоит из трех этапов: тестирование, обсуждение теоретических вопросов по билетам и проверка практических навыков.

Тестовые задания и билеты итогового занятия содержат вопросы по разделам:

1. История микробиологии;
2. Морфология микроорганизмов;
3. Физиология микроорганизмов.

5. Вопросы для рассмотрения.

1. Микробиология как фундаментальная наука, объекты изучения. Задачи и значение микробиологии в деятельности провизора.

2. Основные этапы развития микробиологии и иммунологии (А.Левенгук, Э.Дженнер, И.Мечников).

3. Работы Л. Пастера и Р. Коха. Их значение для медицинской микробиологии.

4. Д.И. Ивановский – основоположник вирусологии. История вирусологии. Роль отечественных ученых в развитии науки (Л.А.Зильбер).

5. Роль отечественных ученых в развитии микробиологии (И.И.Мечников, З.В. Ермольева, Д.К. Заболотный, П.Ф. Здродовский).

6. Основные принципы классификации микроорганизмов по Берги. Таксономические категории: род, вид, серовар, биовар, фаговар, штамм.

7. Методы изучения морфологии микроорганизмов. Виды микроскопии: иммерсионная, люминесцентная, фазово-контрастная, электронная.

8. Классификация бактерий по морфологии. Ультраструктура бактерий.

9. Понятие о вирусе. Морфология и структура вириона. Типы взаимодействия вируса с клеткой. Фазы репродукции.

10. Бактериофаги. Умеренные и вирулентные бактериофаги. Лизогения. Лизогенная конверсия. Практическое применение бактериофагов в медицине и генной инженерии.

11. Классификация бактерий по типам питания. Механизм питания. Практическое использование ферментативной активности микроорганизмов: идентификация, биотехнология.

12. Основные типы дыхания бактерий. Культивирование анаэробов.

13. Способы размножения микроорганизмов. Фазы размножения бактериальной популяции.

14. Условия культивирования микроорганизмов. Питательные среды, их классификация. Культивирование вирусов.

15. Чистая культура бактерий и методы ее выделения.

16. Действие на микроорганизмы физических, химических и биологических факторов. Практическое применение. Методы стерилизации и дезинфекции. Асептика и антисептика.

17. Химиотерапевтические препараты, основные группы. Химиотерапевтический индекс. Химиотерапия и химиопрофилактика инфекционных болезней.

18. Антибиотики. Классификация по происхождению, химической структуре, спектру действия. Механизм действия антибиотиков.

19. Осложнения при антибиотикотерапии. Механизмы формирования лекарственной устойчивости микроорганизмов. Принципы рациональной антибиотикотерапии.

20. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам (метод индикаторных дисков, метод серийных разведений).

21. Организация генетического аппарата у бактерий и вирусов. Генотип. Фенотип. Мутационная и модификационная изменчивость, роль в эволюции.

22. Виды генетических рекомбинаций у бактерий: трансформация, трансдукция, конъюгация.

23. Плазмиды бактерий. Виды плазмид. Использование в генной инженерии.

24. Цели и задачи генной инженерии. Получение иммунобиологических препаратов с использованием генной инженерии. Понятие о биотехнологии.

25. Способы окраски микроорганизмов (методы Грама, Циля-Нильсена). Особенности строения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

26. Бактериоциногения. Эубиотики. Механизм действия. Показания к применению.

**Набор микро- и макропрепаратов для оценки навыков и умений**

**Контрольные микропрепараты:**

1. Кишечная палочка (окр. по Граму) .
2. Стрептобацилла (окр. по Граму).
3. Палочка со спорой (окр. по Граму и Циль-Нильсену).
4. Дифтерийная палочка (окр. метиленовой синькой).
5. Палочка с капсулой или капсульный диплококк (окр. фуксином).
6. Стафилококки (окр. по Граму).
7. Стрептококки (окр. по Граму).
8. Сарцины (окр. по Граму).

**Контрольные макропрепараты:**

1. Среда Китт-Тароцци.
2. Среда Эндо (с ростом кишечной палочки).
3. Чашки с:

* фаготипированием;
* определением чувствительности бактерий к антибиотикам методом индикаторных дисков;
* биологическим методом культивирования анаэробов;
* опытом по определению бактериоцинов.

1. Набор препаратов: химиотерапевтические препараты (антибиотики и др.), бактериофаги, эубиотики.
2. Приборы для создания анаэробных условий : анаэростат, эксикатор.
3. Набор для определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений;
4. Химический тест контроля стерильности при автоклавировании (ампула с бензойной кислотой);
5. Планшеты «Стафитест», «Энтеротест».

6. Рекомендуемая литература:

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. СПб., 1998.
2. Методы общей бактериологии: пер. с англ. /под ред. Ф.Герхардта и др. - М. Мир, 1984.
3. Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах). Под редакцией Й.Ленгелера, Г.Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.
4. Б.Нолтинг. Новейшие методы исследования биосистем. М.: Техносфера, 2005

5. Медицинская микробиология (Вопросы. Ответы. Схемы) / Под ред. О.В.Бухарина – М.: Медицина, 2004,

**Модуль 2. Инфекция и иммунитет**

1. Формируемые компетенции:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Шифр  компетенции | №  компетенции | Элементы компетенции |
| ОК | ОК-1 | - способность и готовность анализировать социально значимые проблемы и процессы, использовать на практике методы гуманитарных, естественнонаучных, медико-биологических и клинических наук в различных видах профессиональной и социальной деятельности **(ОК-1);** |
| ПК | ПК-3 | способность и готовность принимать участие в организации производственной деятельности фармацевтических предприятий и организаций по изготовлению и производству лекарственных средств **(ПК-3);** |
| ПК-4 | способность и готовность к производству лекарственных средств в условиях фармацевтических предприятий и организаций, включая выбор технологического процесса, необходимого технологического оборудования, с соблюдением требований международных стандартов **(ПК-4);** |

Практическое занятие №1.

2. Тема:Инфекционный процесс. Микрофлора тела человека и внешней среды.

3. Цель: Выяснить роль микроорганизмов, объектов внешней среды в инфекционном процессе. Овладеть умением оценки факторов патогенности микроорганизмов и микробиологических критериев эпидемической оценки объектов внешней среды.

4. Задачи:

Обучающая: изучить роль микроорганизмов, объектов внешней среды в инфекционном процессе.

Развивающая: овладеть методами изучения факторов вирулентности и персистенции микроорганизмов; методами оценки эпидемиче ского состояния объектов внешней среды.

Воспитывающая: мотивировать важность усвоения материала для дальнейшего применения знаний в практической деятельности провизора.

5. Вопросы для рассмотрения:

* 1. Определение понятий: «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционное заболевание».
  2. Движущие силы инфекционного процесса.
  3. Роль микроба в инфекционном процессе. Патогенность и вирулентность.
  4. Факторы колонизации, вирулентности и персистенции.
  5. Роль внешней среды как движущей силы инфекционного процесса.

6. Санитарно-показательные микроорганизмы.

5. Основные понятия темы:

Возникновение, течение и исход инфекционного процесса обусловлены тремя движущими силами: патогенным микроорганизмом (с его количественными и качественными характеристиками); состоянием восприимчивого макроорганизма; факторами внешней среды (т.е. экологическими), где происходит взаимодействие микроба с макроорганизмом.

**Микроб** характеризуется двумя качествами: патогенностью и вирулентностью. Патогенность – видовой, генотипический признак. Патогенность – способность вида микробов вызывать инфекционный процесс у одного или нескольких видов организмов. Пример патогенных видов: Corynebacterium diphtheriae, Vibrio cholerae – патогенные вида для человека; Mуcobacterium bovis – патогенный вид для человека и крупного рогатого скота. Вирулентность - индивидуальный (штаммовый), фенотипический признак, мера патогенности в конкретном штамме. Пример вирулентности: штамм № 1 V.cholerae высоковирулентный по отношению к больному А, т.к. вызвал смерть больного от холеры; штамм № 2 V.cholerae низковирулентный по отношению к лицу Б, т.к. вызвал у него инфекционный процесс в форме здорового бактерионосительства. Патогенность микроорганизма реализуется 3-мя группами факторов: колонизации, вирулентности и персистенции.

**Факторы колонизации** обеспечивают способность патогена (патогенного микроорганизма) заселить определенную экологическую нишу в организме хозяина (как правило, у входных ворот инфекции): адгезины, бактериоцины, железосвязывающие белки и др. Адгезины – поверхностные структуры микроорганизмов (пили, белки наружной мембраны, липотейхоевые кислоты), способствующие прикреплению возбудителя к клеткам организма. Бактериоцины – антагонистически активные вещества, подавляющие нормальную микрофлору организма. Железосвязывающие белки обеспечивают усвоение железа патогеном, способствуя его колонизации и инвазии.

**Факторы вирулентности** обеспечивают способность патогена к инвазии (преодолению барьеров защиты, распространению) и поражению клеток, тканей, органов. К факторам вирулентности относятся токсины и ферменты «агрессии».

**Токсины. Эндотоксины** характерны для грамотрицательных микроорганизмов, не специфичны по механизму действия, вызывают общую интоксикацию организма. **Экзотоксины** – это секретируемые токсины белковой природы со специфическим действием на организм. По механизму действия делятся на мембранотоксины (гемолизины, цитотоксины и др.), функциональные блокаторы (холероген и др.), эксфолиатины и эритрогенины. Из экзотоксинов путем их инактивации получают вакцины-анатоксины (столбнячный, дифтерийный и т.д.).

**Ферменты «защиты и агрессии» (факторы альтерации)** многим патогенным микроорганизмам свойственно образование ферментов, способствующих проникновению, распространению микроба вглубь тканей и противостоянию защитным факторам макроорганизма (фибринолизин, гиалуронидаза, лецитиназа, плазмокоагулаза; протеазы, разрушающие иммуноглобулины, и другие факторы).

а) Плазмокоагулаза – фермент сворачивает фибрин за счет активации предсуществующего в плазме крови протромбина, тем самым защищая бактерии от клеточных и гуморальных факторов защиты иммунитета.

б) Лизоцим (микробный) – фермент, оказывающий литическое действие на грамположительные микроорганизмы, участвует в аутолизе и делении бактериальной клетки, придает штамму – продуценту селективные преимущества при колонизации кожных покровов и слизистых.

в) Гиалуронидаза – экзофермент, деполимеризирующий гиалуроновую кислоту, что обеспечивает прохождение бактерий через соединительно-тканные барьеры.

г) Летициназа (лецитовителлаза) – фермент, расщепляющий липопротеид оболочек клеток. Выявляется в виде помутнения или образования радужных венчиков вокруг колоний на специальной желточной среде. В данном феномене участвует и фермент липаза, ответственный за формирование поверхностной радужной пленки. Эти два фермента обеспечивают выживание микроорганизмов на коже, в очагах нагноения.

**Факторы персистенции** обеспечивают способность патогена длительно переживать в организме хозяина путем защиты от механизмов иммунитета (иммуносупрессорное воздействие).

К факторам персистенции относятся поверхностне структуры бактериальной клетки (капсула, оболочечные антигены, пептидогликан) и секретируемые факторы, подавляющие механизмы иммунитета.

**Капсула** – представляет собой слизистый слой, как правило, состоящий из мукополисахаридных фибрилл. Капсула у многих бактерий маскирует микробы от фагоцитов, либо подавляет фагоцитоз, тем самым обладая иммуносупрессивным свойством. **Оболоченные антигены** (Vi - , A-, M- белки и др.) подавляют фагоцитоз, блокируют Ig. **Пептидогликан** входит в состав эндотоксина, подавляет фагоцитоз. **Секретируемые факторы персистенции:** антилизоцимный, антикомплементарный, антиинтерфероновый, антикарнозиновый, антидефенсиновый и др. – инактивируют клеточные и гуморальные механизмы иммунитета. К механизмам персистенции патогена, кроме «экранирования» пептидогликана за счет поверхностных структур бактериальной клетки и секреции иммунодепрессантов, относятся антигенная мимикрия (сходство антигенов микроба и человека), образование L-форм (потеря пептидогликана – основной мишени действия факторов иммунитета).

**Микрофлора внешней среды.** Важность изучения микрофлоры внешней среды (почвы, воздуха, воды) определяется тем, что объекты внешней среды являются путями передачи инфекции. При изучении и оценке микрофлоры объектов внешней среды учитывается общее количество микробов в 1 м3 воздуха, их виды и патогенность. Это можно сделать только при помощи бактериологического метода, позволяющего подсчитать число колоний и, выделив чистые культуры, определить их вид. Для оценки санитарного состояния объектов внешней среды используются санитарно-показательные микробы

6. Рекомендуемая литература:

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
2. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина. 1985.
3. Железнякова Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегии обеих сторон. //Медицинская иммунология, 2006. Т.8. № 5-6. С.597-614.
4. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. Издательство НГМА. Нижний Новгород, 1999.
5. Покровский В.И., Брико Н.И. Эпидемиологический подход и причинная обусловленность болезней человека //Эпидемиология и инфекционные болезни, 2005. № 6. С.4-8.
6. Экология микроорганизмов человека /Под ред.академика РАМН О.В. Бухарина. Екатеринбург, 2006.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию.

**Работа 1.**

**Цель:** Изучить некоторые факторы колонизации, вирулентности и персистенции бактерий и методы их выявления.

**Методика:**

**Гемолизины –** для выявления гемолизинов делают посев чистой культуры на 3-5% кровяной агар и после суточной инкубации при 370С определяют зоны гемолиза вокруг выросших колоний.

**Плазмокоагулаза –** выявляется путем посева чистой культуры на цитратную плазму крови. Реакцию ставят в двух узких пробирках. В каждую наливают по 0,5 мл цитратной плазмы. В опытную пробирку вносят петлю агаровой культуры микробов. В контрольную пробирку культура не вносится. Пробирки ставят в термостат при 370С на 24 часа. При положительном результате в пробирке с культурой появляется сгусток, в контроле плазма остается жидкой.

**Лизоцим** (микробный) – для определения лизоцимной активности на поверхность агара с засеянным в него тест-микробом (микрококком) наносится в виде бляшек исследуемая культура. Появление зон лизиса микрококка вокруг культуры свидетельствует о лизоцимной активности микроорганизмов.

**Гиалуронидаза –** для определения гиалуронидазы в опытную пробирку вносят бульонную исследуемую культуру бактерий, гиалуроновую кислоту, в контрольную – только гиалуроновую кислоту. После 20-минутной инкубации в термостате в обе пробирки добавляют 15% уксусную кислоту. При наличии у микробов гиалуронидазы жидкость в опытной пробирке остается гомегенной, при отсутствии – появляется сгуток муцина. В контрольной пробирке сгусток муцина образуется всегда в результате взаимодействия гиалуроновой и уксусной кислоты.

**Лицитиназа** (лецитовителлаза) - выявляется путем посева чистой культуры на чашку с желточно-солевым агаром (ЖСА) штрихом или бляшкой. Чашки инкубируют в термостате при 370С в течение суток. При положительном результате вокруг колоний образуется радужный венчик. Учитывают в отраженном свете.

**Адгезины –** оцениваются по способности бактерий прилипать к эритроцитам. Для этого эритроциты человека 1 группы, предварительно отмытые буферным раствором и доведенные до концентрации 106 кл/мл, смешивают на предметном стекле с чистой культурой в соотношении 1 : 3 и инкубируют 30 мин. при 37 С. Затем делают мазок, окрашивают синькой Мансона и подсчитывают индекс адгезии (количество микробов, адгезированных на эритроцитах / количество эритроцитов, участвующих в адгезии).

**Персистентные свойства микроорганизмов – антилизоцимная активность** (АЛА) – для определения АЛА в плотную питательную среду добавляют определенное количество лизоцима, на поверхность засевают в виде бляшек исследуемые бактерии, а через сутки, после обработки хлороформом, наносят 2-й слой агара с микрококком. Учет проводят по росту микрококка вокруг культур, инактивировавших лизоцим.

Зарисуйте результаты выявления разных факторов вирулентности, сделайте обозначения к рисункам, определите назначение каждого фактора.

**ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Результат** | **Фактор патогенности** | | | | | | |
| **Адгезины** | **Гемолизин** | **Плазмокоа**  **гулаза** | **Гиалуронидаза** | **Лизоцим** | **Лецитиназа** | **Антилизоцимная активность** |
| Рисунок с обозначениями |  |  |  |  |  |  |  |
| Назначение факторов (вывод) |  |  |  |  |  |  |  |

**Работа 2.**

**Цель:** Оценить результат определения фекального загрязнения воды методом мембранной фильтрации.

**Задача.** В населенном пункте возникли случаи кишечных заболеваний. В центр государственного санэпиднадзора направлена водопроводная вода для определения фекального загрязнения. Дайте оценку качества воды по качеству общих колиформных бактерий (ОКБ) и определите пригодность использования ее для питья.

**Протокол исследования (рисунок):**

**Цель:** Оценить результат определения фекального загрязнения воды методом мембранной фильтрации.

Вывод: (Оветить на вопрос: Пригодна ли вода для питья? Почему?)

**ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

В тетрадь для практических занятий переписать и заполнить данные таблицы

**Факторы патогенности микроорганизмов**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Фактор патогенности | Природа фактора | Функциональное назначение | Метод обнаружения |
| 1. Капсула 2. Гемолизин 3. Лицитиназа 4. Лизоцим микробный 5. АЛА |  |  |  |

Практическое занятие №2.

2. Тема:Роль макроорганизма в инфекционном процессе. Биологический метод диагностики.

3. Цель:Выяснить роль макроорганизма и внешней среды в инфекционном процессе. Овладеть методами воспроизведения и оценки результатов экспериментальной инфекции и оценки факторов естественной резистентности.

4. Вопросы для самоподготовки:

1. Роль макроорганизма в инфекционном процессе (понятие о восприимчивости, инфекционной чувствительности)
2. Причины и условия, влияющие на восприимчивость и инфекционную чувствительность макроорганизма.
3. Факторы естественной резистентности организма человека.
4. Влияние внешней среды на устойчивость макроорганизма к действию патогенных микробов.
5. Роль социальных факторов в возникновении и развитии инфекционного процесса.
6. Этапы в развитии инфекционного заболевания.
7. Пути распространения микробов и токсинов в организме.
8. Формы инфекционного процесса по длительности и по выраженности клинических проявлений.
9. Экспериментальная инфекция и ее значение в научных исследованиях и практической медицине. Биологический метод диагностики (биологическая проба).

5. Основные понятия темы:

Часто решающим фактором, определяющим во многом форму проявления, длительность, тяжесть и исход инфекционного процесса, является состояние **макроорганизма**, его способность механизмами неспецифической (факторы естественной разистентности или факторы неспецифической резистентности) и специфической (антигенспецифические механизмы, т.е. иммунный ответ) защиты уничтожить и удалить из организма микробы и продукты их жизнедеятельности. К факторам неспецифической резистентности относятся механические (кожа, слизистые), физико-химические (ферменты, лизоцим, рН и др.) и иммунобиологические барьеры (фагоцитоз, комплемент, интерфероны, защитные белки сыворотки крови и др.). Механизмы неспецифической защиты определяют бактерицидные свойства кожи, слизистых, крови и других тканей и органов. Неспецифическая защита от микроорганизмов реализуется по преимуществу с участием миелоидных клеток (моноцитов/макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов и т.д.) и гуморальных составляющих – лизоцима, бета-лизинов, пропердина; белков острой фазы, включая белки системы комплемента, фибронектин, С-реактивный протеин и др.

**Бактерицидная активность кожи** как один из факторов естественной защиты включает несколько механизмов:

1. антимикробные свойства секретов кожи (потовых желез и др.);
2. механический барьер;
3. антагонистическая активность нормальной микрофлоры.

**Бактерицидный эффект сыворотки** проявляется в способности сыворотки обезвреживать попавших в кровь микроорганизмов и реализуется за счет участия различных белков и ферментов сыворотки (лизоцим, комлемент, бета-лизины, пропердин, естественные антитела и др.).

**Система комплемента** представлена большой группой взаимодействующих между собой белков (20 белков идентифицированы иммунологически) и гликопротеидов сыворотки крови, обозначаемых символом «С», а девять основных компонентов комплемента – цифрами: С1, С2, С3, … С9. Каждый компонент расщепляется на субъединицы, обозначаемые буквами – Сlq, C3a, C3b и т.д. Вырабатываются белки комплемента макрофагами, нейтрофилами, клетками печени и составляют 5-10% всех белков сыворотки. В организме комплемент находится в неактивном состоянии и активируется рядом факторов. После активации его действие носит каскадный характер, что приводит к образованию мембраноатакующего комплекса и последующему лизису клетки мишени.

**Функция системы комлемента:**

1. **Лизис** чужеродных клеток и бактерий;
2. **Опсонизация** чужеродных клеток, включая бактерии, которые становятся более доступными для макрофагов благодаря феномену иммунного прилипания (обусловлен фиксацией С3b компонента на бактериях и наличием рецептора для С3b на макрофагах).
3. **Стимуляция хемотаксиса.**
4. **Стимуляция фагоцита** (обусловлена присоединением к иммунному комплексу Cq или C3b).
5. **Опосредует процесс воспаления** (повышение сосудистой проницаемости – С5а, С3а; усиление выброса биологичеси активных веществ- анафилотоксинов – С5а, С3а).

Известны два основных пути активации комплемента: **классический** (активируется комплексом антиген-антитело – IgG, Ig M); **альтернативный** (индуцируется ЛПС, антигенами вирусов, грибов, простейших, иммунными комплексами с Ig A, Ig E и т.д.). **С3 компонент комплемента** играет центральную роль в обоих путях активации.

**Лизоцим –** термостабильный белок со свойствами фермента, разрушает клеточную стенку преимущественно грамположительных бактерий, разрывая β-гликозидные связи между аминосахарами пептидогликана, что способствует образованию протопластов с последующим их лизисом. Содержится во всех тканевых жидкостях, в лейкоцитах, макрофагах и других фагоцитирующих клетках. Продуцируется лизоцим преимущественно клетками моноцитарно/макрофагального ряда. Лизоцим усиливает антибактериальную активность комплекса антиген (микроб)-антитело-комплемент, способствуя лизису пептидогликана клеточной стенки бактерий.

.

7. Рекомендуемая литература:

1. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург, 2001. 282с.
2. Лобанов В.В. Роль липополисахарида при воздействии комплемента на грамотрицательные бактерии //Журн.микробиол., 2004. № 5. С.114-118.
3. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. Издательство НГМА. Нижний Новгород, 1999. 393с.
4. Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г., Бондаренко В.М. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов //Журн.микробиол., 2003. № 3. С.98-105.
5. Усвяцов Б.Я. Закономерности инфекционного процесса. Оренбург, 2005.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию.

**Работа 1.**

**Цель:** Овладеть навыком оценки результатов биологического метода диагностики.

**Задача.** В хирургическое отделение поступил больной с ранением голени. В отделяемом раны микроскопическим методом обнаружены грамположительные палочки. Чистую культуру бактериологическим методом выделить не удалось. С целью выделения возбудителя, изучения его вирулентных свойств исследуемый материал был доставлен в лабораторию для проведения биологической пробы. Проведите исследование и оцените его результат. Оформите протокол опыта.

**Методика:**

**Экспериментальная инфекция.** Закономерности инфекционного процесса могут быть изучены в биологическом методе диагностики при воспроизведении экспериментальной инфекции. Заражение экспериментальных животных может производиться с целью:

1. изучения вирулентности микробов;
2. воспроизведения и изучения инфекционного процесса;
3. испытания лечебного эффекта химиотерапевтических и иммунологических препаратов;
4. выделения чистой культуры возбудителя и ее идентификации.

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшнным, внутривенным, пероральным или эндоназальным. Во всех случаях, за исключением перорального и эндоназального способов, заражение осуществляется с помощью шприца. Вскрытие трупов животных производится стерильными инструментами, соблюдая правила асептики. При вскрытии производят осмотр органов, осуществляют посев тканей и органов на питательные среды для бактериологического исследования, готовят мазки-отпечатки для обнаружения микроорганизмов, для изучения их вирулентных свойств (обнаружение каспулы). Для оценки степени вирулентности микробов определяют LD50 (доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных), а затем выделяют чистую культуру и изучают ее вирулентные свойства.

Изменения, обнаруженные при вскрытии трупа животного, а также результаты батериологического исследования вносят в протокол вскрытия.

Помощник фиксирует мышь, держа ее головой вниз, при этом кишечник перемещается к диафрагме Левой рукой оттягивают заднюю лапку в сторону, протирают спиртом паховую область и, чтобы не поранить кишечник, инъекции делают в нижнюю часть живота в середине паховой области. Направление иглы перпендикулярно телу мыши. Сначала прокалывается кожа, затем брюшная стенка и игла «проваливается» в брюшную полость. Этим методом вводится исследуемый материал в объеме 0,1 мл.

Зараженные животные помещаются в клетку, на которой приклеивают этикетку, где указывается дата заражения, количество зараженных животных, доза и использованный исследуемый материал.

После гибели животного производится вскрытие трупа с целью обнаружения возбудителя путем микроскопического исследования мазков-отпечатков из органов и выделения чистой культуры.

* на специальную доску, покрытую ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, помещают труп мышки вверх брюшком и фиксируют за лапки металлическими булавками;
* вскрытие трупа производят стерильными инструментами;
* проводят отсепаровку кожи от подлежащей ткани, вскрывают грудную полость, делают посев крови из сердца на кровяной агар и готовят мазок на предметном стекле;
* вскрывают брюшную полость, осматривают органы брюшной полости, проводят посев ткани печени и селезенки (при необходимости других органов и тканей) на кровяной агар и готовят мазки-отпечатки из этих органов на предметном стекле. Микропрепараты окрасить, исследовать на обнаружение капсулы.

**ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Первый день | | | | | | | |
| Дата  заражения | Вид животного | | Материал для заражения | | Микроскопия материала для заражения (рис.) | | |
|  | | | | | | | |
| Второй день | | | | | | | |
| Дата гибели животного | Дата вскрытия трупа животного | | Результат микроскопического исследования (рис.) | | | | |
| крови | печени | | | селезенки |
|  | | | | | | | |
| Третий день | | | | | | | |
| Результат посева из: | | | | | | | |
| Крови | | Печени | | | | селезенки | |
| Микроскопия выросших бактерий (рис.) | | | | | | | |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Вирулентна ли палочка для мышей? 2. Какие факторы вирулентности бактерий Вы обнаружили? 3. От какой формы инфекции по локализации и длительности течения погибла мышь?).

**ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

В тетрадь для практических занятий переписать и заполнить данные таблицы

**Формы инфекционного процесса**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Форма инфекционного процесса | Описание | Схематическое изображение | Пример из клинической практики |
| Острая  Хроническая  Суперинфекция  Реинфекция  Вторичная инфекция |  |  |  |

Практическое занятие №3.

2. Тема: Учение об иммунитете. Понятие об антигене.

3. Цель: Изучить закономерности взаимодействия антигенов с организмом человека и в системе «антиген-антитело». Изучить принципы и овладеть методами постановки и оценки реакций иммунитета для идентификации бактерий на основе выявления специфических антигенов. Ознакомиться с принципами изготовления и применения диагностических препаратов.

4. Вопросы для рассмотрения:

1. Иммунитет. Определение понятия.
2. Виды иммунитета по происхождению и условиям формирования.
3. Характеристика гуморальных и клеточных факторов иммунитета.
4. Антигены. Определение. Свойства. Химическая природа. Материальная основа специфичности.
5. Антигенная структура бактериальной клетки. Виды антигенов по специфичности. Значение для практической медицины.
6. Реакция агглютинации. Механизм, практическое использование.
7. Реакция преципитации, ингредиенты. Механизм. Практическое использование.
8. Механизм реакции иммунофлуоресценции (РИФ). Практическое использование.
9. Диагностические препараты: виды, определение, получение, применение.

5. Основные понятия темы:

**Реакции иммунитета**

Серологическими называют реакции иммунитета между антигенами (АГ) и антителами (АТ). Детерминанта АГ связывается с активным центром АТ. Соединение АГ и АТ осуществляется посредством водородных и гидрофобных связей, взаимодействия ионов, кулоновских и ван-дер-вальсовых сил. Прочность соединения АГ с АТ обеспечивается не только силами связывания, но и оптимальной стерической адаптацией активного центра АТ к АГ-детерминанте.

Серологические реакции протекают в две фазы. Первая – специфическая невидимая, - заключается во взаимодействии АГ с АТ. Вторая фаза – видимая, - проявляется в зависимости от типа реакции, который определяется свойствами АГ, АТ и другими ингридиентами реакций. Различают несколько типов реакций: агглютинация, преципитация (иммуная диффузия), лизис, нейтрализация и другие.

**Реакция агглютинации**

В реакции агглютинации (РА) антиген участвует в виде корпускулярной частицы. Это могут быть суспензии микроорганизмов, клетки, например эритроциты. При смешивании со специфической антисывороткой происходит склеивание и оседание визуально различимых хлопьев – иммунных комплексов.

Реакцию агглютинации можно ставить качесвенно – на стекле и количественно – в пробирках, где готовятся разведения сыворотки.

**Реакция преципитации**

В реакции преципитации (РП) участвует растворенный антиген. При контакте с антителами – преципитинами образуется осадок. Реакцию преципитации можно проводить в жидкой среде (в пробирках) и в геле (в чашках Петри). При постановке РП в пробирках жидкость, содержащую один из реагентов, например, прозрачный экстракт из микробных клеток, наслаивают на прозрачную преципитирующую сыворотку. В положительных случаях на границе соприкосновения жидкостей через 1-5 минут образуется серо-белое кольцо. РП, как и РА, идет в электролите, но отличается более высокой чувствительностью.

Одной из разновидностей РП в геле является реакция определения токсигенности дифтерийной палочки. Для этого в чашку Петри на питательную среду помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой. Затем чашку засевают испытуемыми культурами в виде пятачков на расстоянии 0,6-0,8 см от края бумаги. Чашки инкубируют при 370С в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с антитоксином образуются линии преципитации в виде дуг.

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)**

Прямая (метод Кунса).

Микроорганизмы, обработанные антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в люминесцентном микроскопе.

Непрямая.

На 1-ом этапе микроорганизмы взаимодействуют со специфической сывороткой.

Далее воздействуют на образовавшийся иммунный комплекс антиглобулиновой сывороткой, меченой флюорохромом. Иммунный комплекс с помощью этого коньюгата светится в люминесцентном микроскопе.

**Специфические диагностические препараты**

1. Диагностикумы содержат специфические антигены определенного вида, типа (взвесь обезвреженных микроорганизмов или очищенные антигенные препараты), применяются для обнаружения антител в сыворотке крови больного – серологический метод диагностики. Различают диагностикумы бактериальные, вирусные, анатоксинные и др. Анатоксинные диагностикумы (дифтерийный, столбнячный и др.) содержат специфические антигены, используются при определении антитоксического иммунитета – серологический метод диагностики.
2. Бактериофаги – живые вирусы бактерий определенного вида или типа используются для фагитипирования при идентификации бактерий – бактериологический метод диагностики.
3. Диагностические сыворотки содержат специфические антитела, применяются для определения вида, типа микроорганизмов (методы 1-ого принципа диагностики).

Диагностические сыворотки получают путем иммунизации животных (в основном кроликов) соответствующими микробами или их антигенами. Сыворотки по назначению классифицируют на агглютинирующие, гемолитические, противовирусные, люминесцирующие.

Титром агглютинирующей сыворотки называется то максимальное ее разведение, при котором происходит агглютинация с соответсвующим микроорганизмом. Если изучаемый микроб агглютинируется с сывороткой до половины титра и выше, то реакцию можно считать положительной, а данный микроб – принадлежащим соответствующему виду или типу.

Монорецепторные сыворотки содержат только видовые или типовые антитела и не дают групповых реакций агглютинации. Монорецепторные сыворотки получают путем освобождения поливалентных сывороток от групповых антител (реакция Кастеллани).

7. Рекомендуемая литература:

1. Бухарин О.В., Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург, 2001.
2. Давтян Т.К., Геворкян Г.А., Погосян Д.А. Возникновение и факторы эволюции иммунной системы //Успехи современной биологии, 2007. № 1. С.5-12.
3. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии /Пер. с англ. М.: Мир, 2006.
4. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. Спб., Наука, 2001. 390с. (Т3; Т4; Т5).
5. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.К. Иммунология. М.: Медицина, 2002. 533с.
6. Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновден Н. Основы клинической иммунологии /Пер. с англ. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию.

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть методикой оценки результатов реакции агглютинации для определения вида бактерий (реакция Грубера).

**Задача.** В бактериологической лаборатории выделили культуру бактерий от больного с предположительным диагнозом «Брюшной тиф». Поставлена реакция агглютинации (реакция Грубера) со специфическими иммунными сыворотками, титр которых 1/1600. Учтите развернутую реакцию с набором иммунных сывороток для определения антигенов.

**Методика:**

Учет производится после 24-часового пребывания пробирок в термостате. В каждой пробирке находится разведенная диагностическая сыворотка – известные антитела (1:50, 1:100, 1:200 и т.д.) и чистая культура бактерий – неизвестный антиген. В контрольной пробирке вместо сыворотки физиологический раствор. При положительном результате осадок из хлопьев покрывает все дно пробирки в виде раскрытого зонтика, обращенного куполом вниз. Жидкость над осадком прозрачная. При встряхивании осадок распадается на зерна или хлопья, жидкость остается прозрачной. При отрицательной реакции на дне пробирки образуется небольшой осадок, недосадочная жидкость остается мутной. При встряхивании осадок поднимается вверх в виде «змейки» и равномерно распределяется в жидкость, которая приобретает первоначальную мутность.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название иммунных  сывороток | Разведение сыворотки | | | | | |
| 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | К |
| Брюшнотифозная  Паратифозная А |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. К какому виду относится выделенная чистая культура бактерий? Почему? 2. Как объяснить положительную реакцию с обеими сыворотками?).

**Работа 2**

**Цель:** Изучить механизм и овладеть методикой оценки результатов реакции диффузной преципитации в геле для определения токсигенности бактерий (дифтерийной палочки).

**Методика:**

Рассмотреть чашку с поставленной реакцией, выявить токсигенные штаммы.

**ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями.

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Токсигенная ли исследуемая культура дифтерийной палочки? Почему? 2. Какой тип дифтерийного токсина (экзотоксин, эндотоксин? Почему?).

**Работа 3.**

В тетрадь для практических занятий переписать и заполнить данные таблицы по основным препаратам для специфической диагностики инфекционных заболеваний.

**Примеры диагностических препаратов.**

**Агглютинирующая ОВ-сыворотка** против серогруппы энтеропатогенных кишечных палочек О26. Получена путем гипериммунизации кроликов взвесью бактерий серогруппы О26. Применяют для постановки реакции агглютинации с целью определения серогруппы кишечных палочек (бактериологический метод). При учете реакции обратить внимание на титр сыворотки. Реакция считается специфической, если она положительна в разведении сыворотки не меньше, чем половина ее титра.

**Люминесцирующая брюшнотифозная сыворотка** содержит антитела, окрашенные флуорохромами. Применяется для определения вида бактерий в исследуемом материале в реакции иммуно-флуоресценции (РИФ) – экспресс-метод.

**Дизентерийный диагностикум** состоит из взвеси убитых бактерий Флекснера и Зонне. Используется для постановки реакций иммунитета в серологическом методе.

**Брюшнотифозный Ви-бактериофаг** получен из фаголизата брюшнотифозных бактерий. Применяется для типирования брюшнотифозных бактерий в бактериологическом методе.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Название препарата | Состав | К какой группе диагностических препаратов относится | Практическое использование (метод диагностики) | Указать разведение диагностической сыворотки, при котором реакция агглютинации считается положительной |
|  |  |  |  |  |  |

**ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

В тетрадь для практических занятий схематично зарисовать антигенную структуру бактериальной клетки.

Практическое занятие № 4.

2. Тема: Понятие об антителах. Иммунный статус.

3. Цель: Изучить принципы и овладеть методами постановки и оценки реакций иммунитета для выявления специфических антител. Овладеть методами оценки иммунного статуса. Изучить основные группы препаратов, использующихся для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

4. Вопросы для рассмотрения:

1. Иммунная система. Строение. Регуляция.

1. .Механизм антителообразования.

3. Антитела. Классы иммуноглобулинов, их определение.

1. Иммунодефициты. Аутоиммунные заболевания.
2. Оценка иммунного статуса.
3. Серологическая диагностика инфекционных заболеваний.
4. Специфические лечебно-профилактические препараты: вакцины, сыворотки, гаммаглобулины.

5. Основные понятия темы:

**Структура и функционирование иммунной системы.**  Иммунная система -совокупность всей лимфоидной ткани организма человека. Представлена центральными и периферическими органами. Саморегуляция осуществляется посредством выработки цитокинов, регуляция со стороны центральной нервной и эндокринной систем.

**Иммунный статус**- совокупность показателей активности иммунной системы. Иммунный статус оценивается с целью выявления иммунодефицитов и аутоиммунных заболеваний, при назначении иммуномодуляторов.

**Антитела -** специфические гаммаглобулины сыворотки крови, вырабатываемые клетками иммунной системы в ответ на введение антигена и нейтрализующие его.

**Серологический метод диагностики** - определение антител в сыворотке крови обследуемого. Диагностическими критериями является нарастание титра антител в динамике или диагностический титр антител.

**Определение иммунного статуса**

Иммунный статус определяется совокупностью показателей специфических и неспецифических факторов защиты и характеризует индивидуальную иммунореактивность организма. Оценка иммунного статуса имеет значение для:

* выявления иммунологической недостаточности (иммунодефицита) и других патологических нарушений работы иммунной системы;
* наблюдения за эффективностью иммунодепрессивной или иммуностимулирующей терапии;
* определения показаний и выбора терапевтических препаратов.

Исследование иммунного статуса включает проведение тестов 1 и 2 уровней.

**Тесты 1-го уровня (ориентирующие):**

1. Определение факторов естественной резистентности (БАС, лизоцим, комплемент и др.).
2. Подсчет абсолютного и относительного числа лимфоцитов в периферической крови.
3. Подсчет числа Т- и В-лимфоцитов.
4. Оценка фагоцитарной активности лейкоцитов.
5. Определение концентрации разных классов иммуноглобулинов.

**Тесты 2-го уровня (аналитические):**

1. Определение субпопуляции Т-лимфоцитов.
2. Определение функциональной активности Т- и В-лимфоцитов (Рис. 4.14).
3. Определение медиаторов иммунной системы.
4. Тесты на ГЧЗТ.

**Препараты для специфической профилактики и терапии**

**инфекционных заболеваний**

К специфическим лечебно-профилактическим препаратам относятся вакцины, сыворотки, бактериофаги.

1. Вакцины – препараты, служащие для создания активного иммунитета, содержат специфические антигены в виде микроорганизмов или очищенных антигенных препаратов. Вакцины классифицируют на живые, убитые, химические и анатоксины в зависимости от состояния входящих в них антигенов. Вакцины, предназначенные для иммунизации против одной или нескольких инфекций, получили название моно- или поливакцины соответственно. Ассоциированные вакцины содержат смесь антигенов различных бактерий и анатоксинов (АКДС).
2. Лечебно-профилактические сыворотки, иммуноглобулины – препараты, служащие для создания пассивного иммунитета, содержат специфические антитела. Иммуноглобулины – максимально очищенные препараты (специфические антитела), получают из сывороток. Сыворотки получают из крови людей-доноров или животных (лошадей), иммунизированных соответствующими вакцинными препаратами. Различают сыворотки (иммуноглобулины) антитоксические, антибактериальные, антивирусные.
3. Бактериофаги (живые вирусы бактерий) – применяют для лечения и профилактики. Действие основано на специфическом лизисе возбудителя.

6. Рекомендуемая литература:

* + 1. Иммунология /Под ред. У.Пола. М.: «Мир», 1987. т. 1. 466с.
    2. Мягкова М.А. и соавт. Естественные антитела к физиологически активным соединениям //Иммунология, 2000. № 6. С.6-10.
    3. Медуницин Н.В. Где находится иммунологическая память? Роль антигена в поддержании иммунологической памяти //Иммунология, 2001. № 6. С.19-24.
    4. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2002. 534с.
    5. Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновлен Н. Основы клинической иммунологии. Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2008.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию:

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть методикой учета и оценки результатов реакции агглютинации для определения антител в сыворотке крови больного.

**Задача.** В инфекционной больнице в течение 10 дней находится на стационарном лечении больной П. с предполагаемым диагнозом «Брюшной тиф»?, «Паратиф А?». Выделить чистую культуру бактерий не представляется возможным. У больного была взята кровь для поиска специфических антител с помощью реакции агглютинации (реакции Видаля). Оцените результаты проведенного исследования. Сделайте вывод.

**Методика:**

Учитывается результат демонстрационной реакции агглютинации с двумя диагностикумами. В каждой пробирке – диагностикум и сыворотка больного в определенном разведении. В контрольных пробирках реакция отрицательная – осадок при встряхивании поднимается в виде «змейки» и равномерно распределяется. При положительной реакции – жикость в пробирке прозрачная, осадок в виде хлопьев. Положительную реакция отмечают знаком «+», отрицательную – знаком « - ».

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Диагностикумы | Разведение сыворотки больного | | | | |
| 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 |
| Паратифозный А  Брюшнотифозный |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какой диагноз подтвердился? Почему? 2. Почему реакция агглютинации происходит с обоими диагностикумами?).

**Работа 2**

**Цель:** Овладеть методикой оценки иммунного статуса с помощью тестов 1-го уровня.

**Задача.** Больной А. – 22 года, страдает рецидивирующим фурункулезом. Было предположено, что заболевание протекает на фоне вторичного иммунодефицита (ИД). С целью диагностики ИД было проведено иммунологическое исследование крови больного. Оцените полученные данные и сделайте вывод.

**Методика:**

Используются демонстрационные препараты.

1. Оценка факторов естественной резистентности описана в разделе «Инфекция».
2. Лейкоцитарная формула периферической крови подсчитывается по общепринятой методике.
3. Подсчет количества Т- и В-лимфоцитов проводится в реакциях Е- и ЕАС-розеткообразования (Е-РОК и ЕАС-РОК):

а) Е-розетки – комплексы, состоящие из Т-лимфоцитов человека и прилипающих к нему эритроцитов быка. Образование Е-РОК обусловлено взаимодействием определенных поверхностных структур Т-лимфоцитов с данными эритроцитами. Розеткообразующей считается клетка с тремя и более прилипшими эритроцитами.

б) ЕАС-розетки – комплексы, которые образуют В-лимфоциты с эритроцитами барана (Е), нагруженными антителами (А) и комплементом (С). Взаимодействие обусловлено наличием у В-лимфоцитов рецепторов к комплементу.

1. Определение активности фагоцитоза и фагоцитарного показателя:

* обнаруживают под микроскопом 10-20 лейкоцитов, передвигая предметное стекло так, чтобы под объективом находился край препарата из исследуемой крови;
* подсчитывают число микробов, захваченных каждым обнаруженным лейкоцитом. Фагоцитарный показатель (ФП)-частное от деления суммы захваченных микробов на число фагоцитов, то есть среднее число микробов в одном лейкоците.

Активность фагоцитоза (АФ) – процент лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе.

5. Определение уровней иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии по Манчини.

В основе метода лежит реакция преципитации в агаре. В агар вносится в качестве антител антиглобулиновая сыворотка (например, против иммуноглобулинов класса А). В лунку в качестве антигена вносится исследуемая сыворотка для определения иммуноглобулинов. При положительном результате видно кольцо преципитации, причем чем больше в сыворотке иммуноглобулинов данного класса, тем больше диаметр кольца вокруг лунки.

Контрольные лунки содержат стандартные сыворотки, имеющие известное количество иммуноглобулинов, что служит контролем технической чистоты проводимого исследования и определяет выбор калибровочной таблицы.

Студенты рассматривают демонстрационные препараты, не проводя самостоятельного подсчета, и интерпретируют предложенные в протоколе результаты. Делают рисунки некоторых препаратов.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Исследуемые показатели | Норма | Показатели обследуемого А |
| Лейкоциты, мм3  Нейтрофилы, %  Лимфоциты, %  Моноциты, %  Т-РОК, %  В-РОК, %  АФ, %  ФП  Ig А, мг%  Ig М, мг%  Ig С, мг% | 5500  60  35  5  68  18  60  4,2  160  140  1700 | 3700  55  44  1  60  15\*  35  2,9\*  21  50\*  728 |

\* Сделайте рисунки с обозначениями: рис.1, рис.2, рис.3.

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какие тесты позволяют оценить состояние клеточного иммунитета, а какие – гуморального? 2. Есть ли иммунодефицит у данного больного и по каким показателям? 3. Какие могут быть возможные причины для развития иммунодефицита?).

**Работа 3.**

В тетрадь для практических занятий переписать и заполнить данные таблицы по основным препаратам для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Примеры специфических препаратов:

**Чумная живая вакцина** содержит высущенную культуру чумных бактерий штамма ЕV. Применяется для активной профилактики чумы по эпидпоказаниям.

**Инактивированнная вакцина против японского энцефалита** содержат вирус японского энцефалита инактивированный формалином. Применяется по эпидпоказаниям.

**Адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин** (АДС) состоит из смеси очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, адсорбированных на гидроокиси алюминия. Применяется для плановой иммунизации против дифтерии и столбняка детей в возрасте от 3-х месяцев.

**Противодифтерийная антитоксическая сыворотка** содержит антитела против экзотоксина дифтерийных палочек. Получают из крови лошадей гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Применяется для лечения и экстренной профилактики дифтерии. Вводится дробно по Безредке.

**Антистафилококковый иммуноглобулин** содержит антитела к стафилококковому экзотоксину. Готовится из крови иммунизированных доноров. Применяется для лечения больных стафилококковым сепсисом и другими стафилококковыми заболеваниями.

**Сальмонеллезный поливалентный бактериофаг** представляет собой фильтрат фаголизата типичных штаммов сальмонелл групп А, В, С, Д, Е. Применяют для лечения и экстренной профилактики.

Протокол исследования:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Название препарата | Состав | К какой группе лечебно-профилактических препаратов относится | Показания для применения | Какой вид иммунитета (по происхождению) создается в организме |

**ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

В тетради для практических работ зарисовать строение молекулы IgG и сделать обозначения основных функциональных фрагментов.

Практическое занятие № 5.

2. Тема: Система АГ-АТ в диагностике инфекционных болезней

3. Цель: Изучить механизм и практическое использование реакций иммунитета и гиперчувствительности замедленного и немедленного типов в лабораторной и клинической практике.

4. Вопросы для подготовки:

1. Гирперчуствительность немедленного типа. Механизм формирования.

2.Гиперчуствительность замедленного типа. Механизм формирования. Практическое использование .

3. Аллергический метод диагностики инфекционных заболеваний.

4. РПГА, РСК, ИФА - механизм, применение в лабораторной практике.

5. Основные понятия темы:

**Аллергия**

Аллергия – особый тип специфической реакции организма на антиген (аллерген), связанный с развитием повышенной чувствительности (гиперчувствительности) на повторное действие данного антигена. Гиперчувстительность бывает 2-х типов: ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа и ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа. ГНТ – реакции IgE – опосредованные: анафилаксия, атопии, цитотоксические реакции, реакция иммунных комплексов, сывороточная болезнь. ГЗТ – реакции, опосредованные Т-клетками: инфекционная (микробная) аллергия, контактная аллергия от действия низкомолекулярных органических и неорганических веществ (лекарственные препараты, красители).

Диагностика аллергий осуществляется путем постановки аллергических проб с помощью диагностических препаратов – аллергенов.

**Гиперчуствительность немедленного типа (ГЧНТ)** - анафилаксия, реакция со стороны иммунной системы на аллергены не инфекционной природы, связанная с выработкой иммуноглобулинов класса Е и запуском гистаминзависимых реакций.

**Гиперчуствительность замедленного типа (ГЧЗТ) –** инфекционная аллергия, формируется при ряде инфекций – туберкулез, брюшной тиф, связана с образованием сенсибилизированных Т-лимфоцитов и запуском реакций специфического клеточного воспаления.

**Аллергический метод диагностики инфекционных заболеваний -**  определение состояния ГЧЗТ при постановке кожной аллергической пробы со специфическим аллергеном.

**Использование системы АГ-АТ в диагностике инфекционных заболеваний**

Специфичность серологических реакций можно использовать для идентификации АГ или АТ, если один из реагентов известен. В реализации 1-го принципа диагностики можно с помощью известных АТ обнаружить АГ микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале (экспресс-метод), при идентификации чистой культуры (бактериологический метод), при заражении животного (биологический метод). В реализации 2-ого принципа диагностики можно с помощью известного АГ обнаружить специфические антитела в сыворотке обследуемого (серологический метод

**Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА)**

Реакция основана на адсорбции известного реагента (антигена или антитела) на поверхности эритроцитов.

Образование комплекса АГ-АТ влечет за собой и склеивание эритроцитов, что легко учитывать. Таким образом эритроциты не участвуют непосредственно в образовании комплекса АГ-АТ, но служат его индикаторами. РНГА более чувствительна, чем РА.

**Иммуноферментный метод**

Высокочувствитеьный метод выявления АГ или АТ на основе реакции АГ-АТ с применением меченных ферментами АГ или АТ.

Принципальная схема иммуноферментного анализа для выявления АТ является следующей. Известный АГ (вирус, белок) – диагностикум фиксируется на твердой фазе. К нему добавляют сыворотку обследуемого с неизвестными АТ. После инкубации и промывки на антигене остаются специфичные к нему АТ, если таковые имелись в сыворотке обследуемого. Для обнаружения комплекса АГ-Ат, к нему добавляют кроличью антиглобулиновую сыворотку меченую ферментом (АГС-Ф). Для получения данной сыворотки иммунизируют кролика глобулинами человека. Полученную от кролика сыворотку метят каким-либо ферментом, например, пероксидазой хрена. Если в обследуемой сыворотке есть АТ к АГ (диагностикум), то они будут служить антигеном для антиглобулиновой сыворотки. После второй промывки образовашийся комплекс АГ+АТ+АГС-Ф можно обнаружить, добавив субстрат к ферменту и индикатор на продукты расщепления субстрата. Изменение цвета индикатора свидетельствует о наличии искомых АТ в сыворотке обследуемого.

**Реакция связывания комплемента**

Это реакция лизиса антигена (например цитолиза, бактериолиза) под действием антител с участием комплемента. Если антиген – это бактериальная клетка или вирус, то лизис не сопровождается видимыми проявлениями. Поэтому, чтобы обнаружить наличие комплекса «АГ+АТ + комплемент» в опытной системе, где неизвестен один из компонентов (АГ или АТ) используют индикаторную систему АГ+АТ, где оба компонента известны и лизис антигена хорошо проявляется, т.к. в качестве АГ берут эритроциты. Реакция основана на способности комплемента – комплексной системы белков нормальной сыворотки позвоночных, фиксироваться на комплексе АГ-АТ и последующем лизисе антигена. В РСК участвуют пять компонентов: АГ-АТ опытной системы, в которой один из реагентов неизвестен, комплемента и АГ-АТ индикаторной системы. Индикаторная – гемолитическая система состоит из взвеси эритроцитов барана и гемолитической сыворотки кролика, полученной путем его иммулизации эритроцитами. Если АГ и Ат в опытной системе соотвествуют друг другу, то результатом этого взаимодействия является связывание комплемента. Индикаторная система выявляет свободный, не связавшийся комплемент. Если комплемент остался свободным, то он свяжется с комплексом эритроциты – гемолитическая сыворотка и будет лизировать эритроциты. Таким образом, наличие гемолиза означает отрицательный результат РСК, а отсутствие гемолиза – положительный результат.

6. Рекомендуемая литература:

1. Иммунология /Под ред. У.Пола. М.: «Мир», 1987. т. 1. 466с.

2.Мягкова М.А. и соавт. Естественные антитела к физиологически активным соединениям //Иммунология, 2000. № 6. С.6-10.

3.Медуницин Н.В. Где находится иммунологическая память? Роль антигена в поддержании иммунологической памяти //Иммунология, 2001. № 6. С.19-24.

4. 5.Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2002. 534с.

6.Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновлен Н. Основы клинической иммунологии. Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2008.

7. Самостоятельная работа студентов к занятию:

**Работа 1**

**Цель:** Ознакомиться с механизмом реакции связывания комплемента (РСК), овладеть методикой учета результатов реакции для выявления антител.

**Задача.** В клинику поступил больной с предполагаемым диагнозом «Хроническая гонорея». Для подтверждения диагноза проведено серологическое исследование путем постановки РСК. Изучите механизм РСК, ингредиенты запишите в таблицу протокола № 1. Изучите результаты поставленной реакции (протокол № 2) и сделайте вывод о предполагаемом диагнозе.

**Методика:**

Реакция связывания комплемента (РСК) учитывается по наличию или отсутствию гемолиза. В контрольных пробирках должен быть гемолиз («лаковая» кровь), так как там реакция заведомо отрицательная. В опытной пробирке при положительном результате не должен быть гемолиз (задержка гемолиза).

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ № 1

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Название  ингредиента | Состав | Получение | Участие в системе | |
| опытная | индикаторная |

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ № 2

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Диагностикум | Разведения сыворотки | | | | |
| 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | К |
| Гонококковый |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Подтвердился ли диагноз хронической гонореи? Почему? 2. Какова роль комплемента в организме? 3. Какова роль комплемента в РСК?).

**Работа 2**

**Цель:** Ознакомиться с механизмом иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител и овладеть методикой учета результатов.

**Задача.** В анонимный кабинет обратился гражданин Я. с просьбой проверить его на инфицирование ВИЧ. Проведено серологическое исследование с применением ИФА. Учтите результат и сделайте вывод.

**Методика:**

Учет ИФА осуществляют по окрашиванию содержимого лунок планшета (обычно желто-оранжевое). Интенсивность окрашивания регистрируют на спектрофотометре или визуально, сравнивая цветность раствора в лунках с образцами и с контролями.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Диагностикум | Сыворотки | | |
| Исследуемая сыворотка | Положительная контрольная сыворотка | Отрицательная контрольная сыворотка |
| Диагностикум ВИЧ | | | |

Вывод: (ответить на вопросы: 1.Перечислите основные ингредиенты ИФА для выявления антител. 2. Как выглядит лунка с отрицательной контрольной сывороткой? Почему? 3. Чем отличается лунка с исследуемой сывороткой от контрольной? О чем это свидетельствует?).

**Работа 3**

**Цель:** Познакомиться с механизмом реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) для определения антител в динамике и методикой учета результатов. Научиться дифференцировать истинную реакцию иммунитета от анамнестической.

**Задача.** В клинику поступил больной с предполагаемым диагнозом «Грипп?», «Парагрипп?». Для выяснения диагноза провести серологическое исследование в динамике с постановкой РПГА.

**Методика:**

Учет проводится после 24 часов инкубации при 370С. При положительном результате осадок из красных хлопьев покрывает все дно лунки или пробирки в виде раскрытого зонтика, обращенного куполом вниз. При отрицательной реакции на дне лунки или пробирки виден компактный осадок красного цвета в виде пуговки с ровным краем (осадок из несклеившихся эритроцитов).

**ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Диагностикумы | Разведение сыворотки | | | | | |
| 1/20 | 1/30 | 1/160 | 1/380 | 1/640 | К |
| Гриппозный 3 день  10 день  Парагриппозный  3 день  10 день |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какой диагноз подтвердился? Почему? 2. Какая реакция является истинной, а какая анамнестической? Почему? 3. В чем преимущества РПГА перед РА?).

**ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

**ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

Нарисуйте в виде схемы механизм развития ГЧЗТ.

Практическое занятие № 6

* 1. Тема: Рубежный контроль по модулю «Инфекция и иммунитет»
  2. Цель: Оценка знаний и умений студентов по теме «Инфекция и иммунитет»
  3. Вопросы для самоподготовки:

1.Понятия: «Инфекционный процесс», «инфекционная болезнь». Характеристика движущих сил инфекционного процесса.

2. Патогенность и вирулентность микробов. Факторы патогенности. Методы выявления.

3. Динамика развития инфекционной болезни. Формы инфекции: смешанная, вторичная, реинфекция, суперинфекция.

4. Неспецифические факторы защиты организма человека от микробов. Роль нормальной микрофлоры организма человека в норме.

5. Микрофлора окружающей среды: воды, воздуха, почвы. Санитарно-показательные микроорганизмы.

6. Микроорганизмы, поражающие растительное и лекарственное сырье. Источники загрязнения лекарственных средств.

7. Методы бактериологического контроля стерильных и нестерильных лекарственных форм, дистиллированной воды.

8. Понятие об иммунитете. Виды иммунитета: видовой, приобретенный, естественный, искусственный, активный, пассивный.

9. Иммунная система организма. Иммунокомпетентные клетки, их основные функции. Кооперация клеток в иммунном ответе.

10. Антигены, свойства. Антигенная структура бактерий. Антигены вирусов. Аутоантигены.

11. Практическое использование антигенов в медицине: вакцины, диагностикумы, аллергены. Получение, назначение.

12. Антитела, структура, свойства. Классы иммуноглобулинов, их функции. Динамика антителообразования. Первичный и вторичный иммунный ответ.

13. Формы иммунного ответа. Понятие об иммунологической памяти, иммунологической толерантности.

14. Гиперчувствительность немедленного типа. Анафилаксия. Сывороточная болезнь. Атопии. Механизм возникновения, методы предупреждения.

15. Гиперчувствительность замедленного типа. Механизм проявления. Значение кожно-аллергических проб (примеры) в диагностике инфекционных заболеваний.

16. Антитоксины. Определение, получение. Реакция нейтрализации токсина антитоксином. Применение антитоксических сывороток в медицине. Единицы измерения активности.

17. Агглютинины. Реакция агглютинации, ее разновидности. Реакция непрямой гемагглютинации. Практическое использование.

18. Реакция преципитации. Механизм, компоненты, применение.

19. Лизины. Реакция гемолиза и бактериолиза. Реакция связывания комплемента. Применение в диагностике инфекционных заболеваний.

20. Реакции с применением меченых компонентов: иммуноферментный анализ, реакция иммунной флюоресценции, радиоиммунный метод.

21. Реакции нейтрализации вирусов: РЗГА, РЗЦПД и др. Механизм, практическое использование.

22. Диагностические сыворотки. Моноклональные антитела. Монорецепторные сыворотки. Получение и практическое использование.

23. Вакцинопрофилактика. Типы вакцин: живые, инактивированные. Химические, анатоксины. Адьюванты. Вакцинотерапия, показания, примеры.

24. Серотерапия и серопрофилактика инфекционных болезней. Сыворотки и гаммаглобулины. Получение, показания к применению. Примеры.

25. Принципы и методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Примеры диагностической ценности.

26. Понятие о клинической иммунологии. Методы оценки иммунного статуса. Иммунодефициты первичные и вторичные. Иммуномодуляторы.

Макропрепараты:

1. Реакция связывания комлемента для определения антител
2. Реакция агглютинации для определения вида микроба.
3. Чашка с реакцией преципитации для определения классов Ig.
4. Чашка с реакцией преципитации для определения токсигенности дифтерийных бактерий.
5. Препараты для специфической диагностики инфекционных заболеваний (диагностикумы, иммунные сыворотки, аллергены, бактериофаги).
6. Набор препаратов для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, бактериофаги).
7. Планшет с результатами РПГА в серологическом методе.
8. Планшет с результатами ИФА в серологическом методе.

7. Рекомендуемая литература:

1. Бухарин О.В., Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург, 2001.
2. Давтян Т.К., Геворкян Г.А., Погосян Д.А. Возникновение и факторы эволюции иммунной системы //Успехи современной биологии, 2007. № 1. С.5-12.
3. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии /Пер. с англ. М.: Мир, 2006.
4. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. Спб., Наука, 2001. 390с. (Т3; Т4; Т5).
5. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.К. Иммунология. М.: Медицина, 2002. 533с.
6. Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновден Н. Основы клинической иммунологии /Пер. с англ. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008.

**Модуль 3. Частная бактериология**

1. Формируемые компетенции:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Шифр  компетенции | №  компетенции | Элементы компетенции |
| ОК | ОК-1 | - способность и готовность анализировать социально значимые проблемы и процессы, использовать на практике методы гуманитарных, естественнонаучных, медико-биологических и клинических наук в различных видах профессиональной и социальной деятельности **(ОК-1);** |
| ПК | ПК-3 | способность и готовность принимать участие в организации производственной деятельности фармацевтических предприятий и организаций по изготовлению и производству лекарственных средств **(ПК-3);** |
| ПК-4 | способность и готовность к производству лекарственных средств в условиях фармацевтических предприятий и организаций, включая выбор технологического процесса, необходимого технологического оборудования, с соблюдением требований международных стандартов **(ПК-4);** |

Практическое занятие № 1.

**2. Тема:** Микробиология риккетсиозов и хламидиозов

**3. Цель:** Изучить принципы лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики риккетсиозов и хламидиозов.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Морфологическое и биологическое своеобразие риккетсий. Особенности культивирования.
2. Классификация риккетсиозов по П.Ф.Здродовскому.
3. Патогенез основных риккетсиозов.
4. Лабораторная диагностика сыпных тифов, Ку-лихорадки, пятнистых лихорадок.
5. Специфическая профилактика риккетсиозов.
6. Неспецифические противоэпидемические мероприятия при риккетсиозах.
7. Хламидии, морфобиологические свойства.
8. Эпидемиология и патогенез хламидиозов.
9. Лабораторная диагностика хламидиозов.

**5. Основные понятия темы.**

Риккетсиозы - острые лихорадочные инфекции, сопровождающиеся пятнисто-петехиальными высыпаниями на коже и слизистых. Возбудителями риккетсиозов являются риккетсии - обширная группа мелких полиморфных грамотрицательных бактерий. Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами Поэтому для их культивирования прибегают к заражению животных (морские свинки, белые мыши), куриного эмбриона или культур клеток. Основными факторами патогенности риккетсий является эндотоксин и способность к инвазии в клетки эндотелия сосудов. В антигенной структуре риккетсий различают групповой термостабильный антиген и видоспецифические термолабильные антигены. Во внешней среде риккетсии быстро погибают.

В лабораторной диагностике риккетсиозов, в основном, реализуется принцип поиска специфических изменений в организме. При всех риккетсиозах используется серологический метод, в котором обнаружение специфических антител становится возможным, начиная с 4-5 дня болезни. В серологических реакциях РСК и РПГА для поиска антител используются видоспецифические антигены риккетсий. Выявление специфической сенсибилизации организма больного методом постановки аллергической пробы возможно только при Ку-лихорадке. Значение биологического метода в диагностике риккетсиозов определяется возможностью дифференциации антропонозных и зоонозных риккетсиозов при заражении морских свинок-самцов. В случае зоонозного риккетсиоза у экспериментального животного развивается риккетсиозный периорхит (скротальный феномен).

Эпидемический сыпной тиф. Возбудитель-риккетсия Провачека (Rickettsia prowazekii). Источником болезни является человек, переносчиком - платяная вошь. При укусе или расчесах возбудитель попадает в кровь, где поражает эндотелий сосудов с образованием гранулем и тромбов. Следствием этого является появление розеолезно-петехиальной сыпи. Заболевание сопровождается тяжелой интоксикацией. Лабораторная диагностика базируется на серологическом методе. Для специфической профилактики по эпидемическим показаниям используют живую и химическую вакцины.

Болезнь Брилля - рецидивный сыпной тиф вследствие ослабления иммунитета при длительной персистенции возбудителя R. рrowazekii в организме после перенесенного заболевания. Для дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и рецидивов болезни Брилля определяют в серологическом методе динамику Ig M (сыпной тиф) и IgG (болезнь Брилля).

Эндемический (крысиный) сыпной тиф. Возбудитель-риккетсия Музера (Rickettsia typhi). Источником являются крысы, переносчиками - крысиные блохи и вши. Лабораторная диагностика включает проведение биологической пробы и серологический метод. Специфическая профилактика не разработана.

Ку-лихорадка (пневмориккетсиоз). Возбудитель-риккетсия Бернета (Coxiella burnetii). Основным источником инфекции для человека является крупный и мелкий рогатый скот, пути передачи - аэрогенный, алиментарный, водный, реже трансмиссивный. Лабораторная диагностика включает серологический и аллергический методы. Для специфической профилактики в эндемических очагах инфекции по эпидемическим показаниям применяют живую вакцину.

Группа клещевых пятнистых лихорадок объединяет шесть природно-очаговых зоонозных риккетсиозов, резервуаром и переносчиком которых являются иксодовые и гамазовые клещи. В лабораторной диагностике могут быть использованы биологический и серологический методы.

Хламидиозы – острые и хронические инфекционные заболевания с преимущественным поражением глаз и органов мочеполовой системы. Возбудители относятся к роду Chlamidia, мелким грамотрицательным бактериям с облигатным внутриклеточным паразитизмом). Основные патогены: C.trachomatis серовары А, В, С (трахома), серовары от Д до К (урогенительный хламидиоз).

6. Рекомендуемая литература.

1. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. Медгиз, 1972.
2. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека. М. СПб., 2002.
3. Рудаков Н.В. Таксономия, экология и эволюционные связи риккетсий //Вестник РАМН, 2008. № 7. С.10-15.
4. Тарасевич И.В. Экология риккетсий и эпидемиология риккетсиозов //Вестник РАМН, 2008. № 7. С.5-10.

**7. Самостоятельные работы к занятию**

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

Серологическая диагностика сыпного тифа

Цель: Освоить навык оценки результатов РСК в серологической диагностике сыпного тифа.

Задача. В клинику поступил больной с высокой температурой и пятнисто-петехиальной сыпью по всему телу. Болен 7-й день. Был поставлен предварительный диагноз: "Сыпной тиф". Для установления этиологического диагноза кровь больного была направлена в лабораторию для выявления специфических антител в реакции связывания комплемента. Оцените результаты. Сделайте вывод.

Методика.

Комплементсвязывающие антитела при сыпном тифе обнаруживаются с 5-6 дня болезни, достигая максимума к 14-16 дню и сохраняются в организме переболевших долгие годы. РСК при сыпном тифе строго специфична.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Разведение  сыворот-  ки  Антигены | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | К |
| Р.Провачека  Р.Музера |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Удалось ли поставить этиологический диагноз? Какие противоэпидемические мероприятия необходимо провести в очаге инфекции?)

Работа 2. Дифференциальная диагностика болезни Брилля

Цель: Оценить диагностическую ценность РПГА в серологической диагностике болезни Брилля.

Задача. Больной 60 лет поступил в клинику на 5-й день болезни с температурой 39, спутанным сознанием, сыпью по всему телу. Родственники указывают на перенесенный в молодости сыпной тиф. Был поставлен предварительный диагноз "Болезнь Брилля, рецидив". Для подтверждения диагноза кровь больного была направлена в лабораторию для определения антител в реакции пассивной гемагглютинации. Оцените результаты. Сделайте вывод.

Методика. РПГА при сыпном тифе позволяет отличить активную форму болезни и ближайшую реконвалесценцию, при которых бывает положительной в разведении 1:1000 и более, от ранее перенесенного заболевания.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Разведение  сыворотки  Антигены | 1/250 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | К |
| Р.Провачека  Р. Музера |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Подтвержден ли предварительный диагноз? Почему? Какие дополнительные исследования Вы предложили бы для окончательного подтверждения диагноза?)

**Работа 3**

Цель: Изучить специфические препараты для диагностики и профилактики риккетсиозов.

Методика.

Изучить ампулы с препаратами и аннотации к ним по теме "Риккетсиозы".

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п\п | Название | Состав | Способ  получения | К какой группе относится | Показания к применению |

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

В тетради для практических занятий составить и заполнить таблицу.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Риккетсиоз | Возбудитель  (лат.) | Источник инфекции | Переносчик | Пути передачи | Методы диагностики |
| 1.Эпидемический сыпной тиф  2.Эндемический сыпной тиф  3.Ку-лихорадка |  |  |  |  |  |

**Практическое занятие № 2 .**

**2. Тема:** Микробиология спирохетозов.

**3. Цель:** Изучить принципы лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики спирохетозов.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Этиология, эпидемиология и патогенез сифилиса.
2. Методы лабораторной диагностики сифилиса в различные периоды
3. заболевания.
4. Механизм реакции Вассермана, ее отличие от РСК.
5. Лептоспироз. Этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика
6. Специфическая терапия и профилактика лептоспироза.

**5. Основные понятия темы.**

Возбудителями спирохетозов являются патогенные виды спирохет: Treponema pallidum – сифилиса, Leptospira interrogans – лептоспироза и Borrelia recurrentis – возвратного тифа. Все спирохеты по морфологии – извитые спиралевидные микроорганизмы, отличающиеся количеством и размером завитков, а также тинкториальными свойствами). Основной способ окраски спирохет – по Романовскому-Гимзе. В экспрессной диагностике спирохетозов широко используется метод темнопольной микроскопии. Культивирование спирохет представляет определенные трудности, используются специальные среды.

Сифилис – острое и хроническое заболевание, передающееся преимущественно половым путем, имеет системный характер поражения, четкую этапность развития патогенеза и клинических периодов. Возбудитель сифилиса – Treponema pallidum (бледная трепонема) имеет 8-12 равномерных завитков, по Романовскому-Гимзе окрашивается в слабо-розовый цвет . При росте на искусственных питательных средах утрачивает вирулентность, меняет биохимические и антигенные свойства. Удается культивировать трепонему с сохраненными видовыми признаками в яичке кролика при постановке биологической пробы. Для трепонемы характерна низкая устойчивость во внешней среде.

В лабораторной диагностике сифилиса реализуют оба принципа, определяющие направление исследования: 1. Поиск возбудителя в организме (микроскопический метод); 2. Поиск специфических изменений в организме под действием возбудителя (серологический метод). Использование основных методов лабораторной диагностики сифилиса – микроскопического и серологического определяется фазой патогенеза и соответствующим периодом клинического течения заболевания. В период первичного сифилиса, характеризующегося формированием твердого шанкра у места входных ворот инфекции, где локализуется возбудитель, используют микроскопический метод - реакцию иммунной флюоресценции (РИФ) и микроскопию в темном поле. Диагностически значимым признаком при микроскопии в темном поле является выявление четырех типов движения бледной трепонемы: качательного, сгибательного, вращательного и поступательного. В период вторичного сифилиса, когда трепонема выделяется с поверхности сифилидов, а в крови накапливаются антитела, используют и микроскопический, и серологический методы. В серологическом методе диагностики сифилиса применяют две основных иммунологических реакции: для выявления антител - специфическую реакцию связывания комплемента (РСК) с трепонемным диагностикумом, для выявления характерных физико-химических изменений в сыворотке крови больного - неспецифическую реакцию Вассермана с кардиолипиновым антигеном бычьего сердца. Последняя может быть ложноположительной при ряде заболеваний и состояний, таких как беременность, онкопроцессы, лихорадочные состояния, туберкулез и др. В периоды третичного сифилиса и нейросифилиса, когда обнаружение возбудителя является казуистическим, вследствие его внутриорганного расположения (формирование гумм), основным методом диагностики является серологический метод.

Лептоспироз - природно-очаговая зоонозная инфекция с преимущественно водным путем передачи и септическим типом течения. Возбудитель Leptospira interrogans - спирохета с 12-18 равномерными мелкими завитками первого порядка, концевые части образуют крупные вторичные завитки (Рис. 5.7.3.). В связи с этим форма микроба при микроскопии напоминает буквы С или S. При окраске по Романовскому-Гимзе лептоспира приобретает розовый цвет. Культивировать лептоспиры удается в жидких и полужидких средах с обязательным добавлением 5-10% кроличьей сыворотки. Известно всего около 200 сероваров L.interrogans, на территории СНГ - 27 сероваров, все они дают положительные перекрестные реакции. Для проведения серологической диагностики используют антиген липополисахаридной природы, выделенный из многих штаммов лептоспир. Основной фактор патогенности лептоспир - эндотоксин, вызывающий общую интоксикацию и кровоизлияния за счет повышения проницаемости сосудов. Для лептоспир характерна высокая устойчивость во внешней среде: сохраняемость в открытых водоемах - до 30 суток, во влажной почве - до 270 дней.

В лабораторной диагностике лептоспироза используют микроскопический, бактериологический, биологический и серологический методы. Методы первого принципа диагностики осуществляют только в специализированных лабораториях. В связи с этим основным методом лабораторной диагностики лептоспироза является серологический. Для выявления специфических антител используют реакцию связывания комплемента с общим лептоспирозным антигеном и РПГА с лептоспирозным эритроцитарным диагностикумом. Специфическая профилактика лептоспироза осуществляется по эпидемическим показаниям с использованием лептоспирозной вакцины. Для специфической терапии применяют лептоспирозный гамма-глобулин.

**6. Рекомендуемая литература.**

1. Бернасовская.Е.П. и др. Лептоспироз. Киев, 1989.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб., 1998.
3. Маянский А.Н. Микробиология для врачей (Очерки патогенетической микробиологии). Нижний Новгород, 1999.
4. Милич М.В. Эволюция сифилиса. 1987.
5. О совершенствовании серологической диагностики сифилиса. Приказ № 87. М., МЗ РФ, 2001.
6. Оркин В.Ф., Завьялов А.И. К 100-летию открытия сифилиса //Журн.микробиол. 2006. № 6. С.106-107.
7. Родионов А.Н. Сифилис. СПб, 1997.

**7. Самостоятельные работы к занятию**

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1. Серологическая диагностика сифилиса.**

Цель: Оценить диагностическую ценность реакции Вассермана и РСК в серологической диагностике сифилиса.

Задача. В женскую консультацию обратились 2 беременных женщины (А. и С.) с жалобами на сыпь. Кровь женщин была отправлена для постановки реакции Вассермана и РСК. Оцените результаты исследования. Оформите протокол.

ПРОТОКОЛ ИСЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ФИО | Исследу-емый  материал | **Р. Вассермана** | | | | | **Р С К** | | | | | Отли чия РВ от  РСК |
| 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | К | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | К |
| А.  С. |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. У кого из женщин подтверждается диагноз сифилиса и почему? 2. Можно ли определить стадию заболевания,

по каким признакам? 3. Объясните положительный результат реакции

Вассермана у здоровой беременной женщины).

**Работа 2. Серологическая диагностика лептоспироза.**

Цель: Оценить диагностическую значимость серологического метода в диагностике лептоспироза.

Задача. В клинику поступил больной с лихорадочным заболеванием на 8-й день болезни. Местность, где проживал больной , неблагополучна по

лептоспирозу. У больного была дважды взята кровь – в момент поступления и через неделю, – и направлена на исследование для определения специфи-

ческих антител с диагностикумом L. interrogans в реакции связывания комплемента.

Оцените результаты. Оформите протокол.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Сроки взятия сыворотки больного | **Разведение сыворотки** | | | | |
| 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | К |
| 8-й день  15-й день |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Подтвержден ли диагноз лептоспироза? 2.Обоснуйте диагностическую значимость проведенного исследования).

**Работа 3. Специфическая терапия и профилактика лептоспироза.**

Цель: Выбрать препараты для специфической профилактики и терапии лептоспироза.

Задача. В местности, эндемичной по лептоспирозу, после купания в пруду 3 ребенка заболели, был подтвержден диагноз "Лептоспироз". Какой из специфических препаратов Вы предложите для лечения детей? Какой специфический препарат и кому следует назначить для улучшения эпидемической ситуации?

Методика: Изучить аннотации к специфическим лечебно-профилактическим препаратам по теме "Спирохетозы".

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | **Состав** | Способ  получения | Механизм действия | **Показания к**  назначению |

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

В тетради для практических занятий составить и заполнить таблицу.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Инфекция | Возбу-дитель (лат.) | Морфоло-гические отличия (рис.) | Источник инфекции | Методы диагностики | Специфические лечебно-профилактические препараты |
| Сифилис |  |  |  |  |  |
| Лептоспироз |  |  |  |  |  |

**Практическое занятие № 3.**

**2. Тема:** Микробиология дифтерии и туберкулёза.

**3. Цель:** Выяснить особенности этиологии туберкулеза и дифтерии, овладеть умением оценки результатов лабораторной диагностики дифтерии и туберкулеза, научиться решать практические задачи по специфической профилактике и терапии дифтерии и туберкулеза.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

* 1. Таксономия и характеристика возбудителей дифтерии.

2. Эпидемиология и патогенез дифтерии.

3.Лабораторная диагностика дифтерии. Выявление токсигенности дифтерийной палочки.

1. Иммунитет при дифтерии, выявление антитоксинов (РПГА).
2. Специфическая терапия и профилактики дифтерии.
3. Лабораторная диагностика, терапия и профилактика коклюша (для студентов педиатрического факультета)
4. Таксономия микобактерий. Морфо-биологические свойства микобактерий туберкулеза.
5. Эпидемиология и патогенез туберкулеза. Роль ГЗТ в патогенезе и иммунитете при туберкулезе.
6. Методы лабораторной диагностики туберкулеза. Аллергическая проба и ее практическое значение.
7. Специфическая профилактика туберкулеза. Терапия.

**5. Основные понятия темы:**

- морфологические и биологические свойства возбудителя туберкулеза, морфологическую изменчивость туберкулезной палочки и ее химического состава, формы инфекционного процесса при туберкулезе; гиперчувствительности замедленного типа в патогенезе туберкулезной инфекции, диагностика туберкулеза. Основными факторами патогенности туберкулезных палочек являются корд-фактор (гликолипид) и туберкулин (белок, эндотоксин, аллерген).

Чаще всего развивается туберкулез легких. Распространены скрытая форма инфекции и бессимптомное заболевание. Степень восприимчивости людей зависит от социальных условий. В патогенезе важную роль играет аллергия – гиперчувствительность замедленного типа. В диагностике туберкулеза используют оба принципа: обнаружение возбудителя и определение специфических изменений организма. Для обнаружения возбудителя используют микроскопический, биологический и бактериологический методы. Выбор исследуемого материала зависит от формы поражения: чаще мокрота, реже гной, спинномозговая жидкость, моча и т.д. Мокроту собирают в чистую баночку (лучше в стерильную), герметично закрытую непромокаемой пробкой. Для исследования из мокроты отбирают гнойные комочки. Микропрепарат окрашивают по Цилю-Нильсену и наблюдают на синем фоне мокроты туберкулезные палочки красного цвета (рис.5.2.5). Для экспресс-диагностики широко применяют люминесцентную микроскопию и метод флюоресцирующих антител. Так как бактериологический метод длителен, то часто используют метод микрокультур для ускоренной диагностики. Предметные стекла с нанесенным исследуемым материалом обрабатывают 10% серной кислотой для уничтожения посторонней флоры, удаляют серную кислоту физиологическим раствором и погружают в жидкую кровяную среду. После 48-72 часов инкубации в термостате красят по Цилю-Нильсену и наблюдают под микроскопом микроколонии из туберкулезных палочек красного цвета, расположенных в виде жгутов, «косичек» (рис. 5.3.6.).

Наиболее чувствительным методом обнаружения возбудителя является биологический (особенно при диагностике туберкулеза почек). Исследуемый материал после обработки серной кислотой вводят морской свинке внутрибрюшинно в количестве 1-2 мл. Быстрое падение веса животного и увеличение паховых лимфоузлов свидетельствует о развитии туберкулеза. В пунктате из лимфоузлов обнаруживаются микобактерии туберкулеза.

Основным методом 2-ого принципа диагностики является аллергический (выявление ГЗТ). Внутрикожно вводят аллерген – препарат туберкулин (РРД – очищенный белок из микобактерий туберкулеза). Проба Манту ставится для диагностики болезни и скрытой формы инфекции (при решении вопроса о ревакцинации), а также для прогнозирования течения процесса (нормэргия, анэргия, гиперэргия). Специфическая профилактика туберкулеза проводится живой вакциной BCG (Bacille Calmette-Guerin). Начинают вакцинацию новорожденных (5-7-й день жизни) внутрикожно с последующей ревакцинацией в 7, 12 и 17 лет при отрицательной пробе Манту.

- морфологии возбудителя дифтерии, особенности патогенеза дифтерии, факторов патогенности дифтерийных палочек, бактерионосительства токсигенной дифтерийной палочки, лабораторная диагностика дифтерии, иммунитет при дифтерии. Основным фактором патогенности дифтерийной палочки является экзотоксин (цитотоксин), мишенью действия которого являются: клетки слизистой верхних дыхательных путей (дифтеритическое воспаление), сердце (миокардит), надпочечники (некроз), периферические нервы (полиневрит). Кроме заболевания, важное эпидемиологическое значение имеет бактерионосительство токсигенной дифтерийной палочки, поэтому в широких масштабах проводится лабораторное обследование детей и других декретированных групп населения на дифтерийное бактерионосительство. Главные задачи бактериологического исследования две: а) дифференциация дифтерийной палочки от ложнодифтерийных бактерий; б) доказательство токсигенности дифтерийных бактерий, так как нетоксигенные штаммы болезнь не вызывают. Эпидемиологическую опасность представляет носительство токсигенных дифтерийных бактерий. Основная реакция на определение токсигенности – реакция иммунодиффузии (реакция преципитации в геле или тест Илека – Оухтерлони). После перенесенного заболевания вырабатывается стойкий антитоксический иммунитет, защищающий от повторного заболевания. Антибактериальный иммунитет, защищающий от бактерионосительства, не всегда напряженный, поэтому возможны реконвалесцентное бактерионосительство и реинфекция. Для специфической профилактики используется дифтерийный анатоксин, входящий в состав разных типов вакцин. Для специфической терапии используется противодифтерийная антитоксическая сыворотка, сила которой измеряется в антитоксических единицах (АЕ). IАЕ – минимальное количество сыворотки, нейтрализующее 100 Dlm (минимальных летальных доз) токсина для морской свинки.

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Туберкулез /Под ред. Хоменко А.М. – М., Медицина, 1996. – 493с.

2. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии // Журнал микробиология, - 1999. - №2.- С.92-96.

3. Маянский А.Н. Микробиология для врачей (очерки патогенетической микробиологии). Нижний Новгород, - Из-во НГМА, 1999. – 300с.

4. Маянский А.Н. Микобактерии: туберкулез и микобактериозы. Нижний Новгород, - Из-во НГМА, 2000. – 80с.

5. Костюкова Н.Н. Возбудитель дифтерии и условно-патогенные коринебактерии (лекция)// Журн. Клин. лаб. диагностика. – 2001. - № 6. – С.25-36.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1.** Оценить результаты бактериологической диагностики дифтерии и освоить принцип специфической терапии болезни.

**Задача 1.** В инфекционную больницу поступила девочка двух лет с высокой температурой, жалобами на боли в горле. На слизистой зева с трудом снимающиеся серовато-белые налеты. Лечащий врач поставил диагноз дифтерии зева, ввел немедленно 5000 АЕ противодифтерийной сыворотки и направил в лабораторию материал для исследования. Оцените результат бактериологического исследования. Оформите протокол. Сделайте вывод.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Иследуемый материал | Элективная среда | Характе-ристика колоний | Идентификация чистой культуры | | | | | | Что такое IАЕ сыворотки? | |
| Морфология | Ферментация | | Проба на уреазу | Проба на цисти-назу | Проба на токси-генность |
| глюко-зы | Крахмала |
| Рисунок | | | | | | | | | Рису-нок | Дать определение |

**Вывод:** (ответить на вопросы: 1. Подтвердился ли клинический диагноз дифтерии? Почему? 2. Правильной ли была тактика лечащего врача? Почему?

**Работа 2.** Приобрести навыки оценки результатов бактериоскопического метода диагностики туберкулеза легких.

**Задача** В стационаре находятся двое больных А. и С. с жалобами на кашель с мокротой, температуру. При рентгеноскопии легких обнаружены очаги затемнения. У врача возникло подозрение на туберкулез легких, так как у обоих больных оказалась положительной проба Манту. Простая микроскопия мокроты не дала положительных результатов, поэтому было проведено обогащение мокроты и применена люминесцентная микроскопия.

Промикроскопируйте мокроту после обогащения и посмотрите препарат (после соответствующей окраски флуорохромом) в люминесцентный микроскоп. Оцените результаты. Оформите протокол исследования. Сделайте вывод.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Обследуемые | Исследуемый материал | Результат микроскопии мокроты после обогащения | Результат люминесцентной микроскопии мокроты |
| Больной А  Больной Б |  |  |  |

**Вывод:** (ответить на вопросы: 1. Подтвердился ли диагноз туберкулеза легких у обследованных больных? Почему? 2. Назовите этапы обогащения мокроты, в чем преимущество метода по сравнению с обычной микроскопией? 3. В чем преимущество метода люминесцентной микроскопии?

А н н о т а ц и и

к препаратам по теме: «Микробиология дифтерии, туберкулеза».

1. **Лечебно-профилактические препараты**

**1.1. Вакцины**

**Адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКДС)**

Представляет гомогенную взвесь, состоящую из убитых коклюшных палочек, дифтерийного и столбнячного анатоксинов, адсорбированных на гидроокиси алюминия. Применяется для плановой иммунизации одновременно против коклюша, дифтерии и столбняка. Прививают детей с 3-х месячного возраста.

**Адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС)**

Состоит из смеси дифтерийного и столбнячного анатоксинов, адсорбированных на гидроокиси алюминия. Применяется для плановой иммунизации против дифтерии и столбняка детей, переболевших коклюшем или привитых против коклюша.

Адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М). Применяют для плановых ревакцинаций детей и взрослых. Уменьшение количества антигенов рассчитано на предупреждение аллергических реакций.

**Анатоксин дифтерийный (АД)**

Применяется для иммунизации детей и взрослых по эпидпоказаниям.

**АД-М-анатоксин**

Дифтерийный анатоксин с уменьшенным содержанием антигена. применяют для плановых ревакцинаций детей и взрослых.

**Коклюшная вакцина**

Представляет собой взвесь убитых коклюшных бактерий. Прививают детей по эпидпоказаниям.

**Вакцина БЦЖ (бактерии Кальметта-Жерена)**

Содержит высущенные живые бактерии вакцинного штамма Mycobacterium bovis. Применяется для плановой профилактики туберкулеза. Вводится на 5-7-ой день жизни с последующей ревакцинацией.

**Вакцина БЦЖ-М**

Содержит высущенные живые бактерии вакцинного штамма M.bovis с уменьшенным в 2 раза содержанием антигена. Применяется для профилактики туберкулеза детям, имеющим медицинские отводы по введению БЦЖ.

* 1. **Сыворотки и гамма-глобулины**

**Противодифтерийная антитоксическая сыворотка**

Содержит антитела против экзотоксина дифтерийных палочек. Применяется для лечения дифтерии. Вводится по Безредке (дробно) в дозе от 5000 до 50 000 антитоксических единиц (АЕ).

**Коклюшный гамма-глобулин (донорский)**

Содержит антитела против палочки коклюша. Применяется для лечения коклюша и для экстренной профилактики болезни у контактных.

1. **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ**
   1. **Аллергены**

**АТК – старый жидкий туберкулин Коха**

Сгущенный фильтрат убитой бульонной культуры микобактерий туберкулеза. Применяется для выявления аллергии у больных туберкулезом или инфицированных микобактериями туберкулеза (проба Манту).

**Очищенный туберкулин в стандартном разведении (ППД-Л)**

Очищенный белок туберкулезной палочки. Применяется для выявления аллергии к возбудителю туберкулеза (проба Манту).

* 1. **Диагностикумы**

**Дифтерийный анатоксинный эритроцитарный диагностикум**

Содержит антигены дифтерийного анатоксина, адсорбированные на эритроцитах. Применяется в серологическом методе диагностики для выявления антител-антитоксинов путем постановки реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Цель исследования – оценка состояния антитоксического иммунитета в коллективе.

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

Задача:

В семье заболела дочь-студентка, предполагаемый диагноз “Туберкулез легких”. Проведено лабораторное обследование на туберкулез всех членов семьи, результаты представлены в таблице.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Виды исследований |  | Отец | Мать | Дочь | Сын | Какие методы диагностики были использованы?  (Ответы) |
| Проба Манту | + | - | - | - | Аллергический |
| Обнаружение антител к M.tuberculosis | + | + | - | - | Серологический |
| Обнаружение M.tuberculosis в мокроте  (окраска по Цилю-Нильсену) | - | - | + | - | Микроскопический |
| Выделение чистой культуры M.tuberculosis | - | - | + | + | Бактериологический |
| Вопросы | Кто болен туберкулезом? | - | - | + | + |  |
| У кого скрытая форма инфекции? | + | + | - | - |
| Кто был раньше всех инфицирован? | + | - | - | - |
| У кого бессимптомная форма болезни? | - | - | - | + |

**Практическое занятие №4.**

**2. Тема: Микробиология кокковых инфекций.**

**3. Цель:** Выяснить особенности этиологии стафилококковых инфекций, овладеть умением оценки результатов лабораторной диагностики кокковых инфекций, научиться решать практические задачи по специфической профилактике и терапии кокковых инфекций

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Этиология стафилококковых инфекций: классификация и свойства возбудителей. Характеристика токсинов и ферментов патогенности, факторов персистенции.
2. Эпидемиология и патогенез стафилококковых инфекций.
3. Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии и стафилококкового бактерионосительства.
4. Методы санации стафилококковых бактерионосителей.
5. Стрептококки. Таксономия. Характеристика токсинов и ферментов патогенности.
6. Патогенез стрептококковых инфекций
7. Лабораторная диагностика стрептококковых инфекций.
8. Патогенные нейссерии: менингококки и гонококки. Таксономия. Биологические свойства. Патогенез менингококковой инфекции, острой и хронической гонореи.
9. Лабораторная диагностика нейссериальных инфекций.
10. Специфическая терапия и профилактика кокковых инфекций

**5. Основные понятия темы:**

**Гнойно-воспалительные заболевания** относятся к числу наиболее распространенных. Способностью вызывать гнойные и серозно-гнойные воспаления у человека и животных характеризуются многие патогенные и условно-патогенные бактерии, но большинство острых и хронических нагноений вызывают кокки (в 70-80% случаев). Грамположительные кокки относятся к семейству Micrococcaceae (роды Staphylococcus и Streptococcus), грамотрицательные - к семейству Neisseriaceae (род Neisseria).

**Стафилококки** являются наиболее частыми возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей (абсцессы, мастит, раневые и послеоперационные инфекции) – инфекций кожи (фолликулиты, фурункулы, карбункулы, пузырчатка новорожденных, буллезное импетиго и скарлатиноподобная сыпь); поражают внутренние органы (синусит, тонзиллит, пневмонии, пиелонефрит и т.д.); вызывают бактериемию и сепсис; пищевые токсикоинфекции и синдром токсического шока.

Стафилококки - грамположительные кокки, в чистой культуре располагаются скоплениями в виде виноградных гроздей. Широко распространены в природе, факультативные анаэробы. Растут на простых питательных средах, элективный компонент - 10% NaCl. Род Staphylococcus насчитывает 32 вида, которые по продукции фермента плазмокоагулазы подразделяются на 2 группы: коагулазоположительные стафилококки (КПС) и коагулазоотрицательные стафилококки (КОС).Из группы КПС основной патогенный вид для человека - S.aureus. В группе КОС –условно-патогенные виды, среди них наиболее распространены S.epidermidis, S.saprophyticus, S.cohnii, S.xylosus, S. haemolyticus, S.hominis, S.warneri, S.simulans, S.capitis, S.sciuri и др.

Стафилококки характеризуются многочисленными факторами колонизации, персистенции и патогенности.

Факторы колонизации: белки-адгезины, феромоны, бактериоцины, лизоцим, тейхоевая кислота и др. Факторы персистенции: капсула, белок А, секреторные факторы (антилизоцимный, антиинтерфероновый и др.), способность образовывать L-формы, антигенная мимикрия (сходство стафилококкового антигена с группоспецифическим фактором А эритроцитов человека).

Среди факторов патогенности большой набор ферментов «защиты и агрессии» (гиалуронидаза, фибринолизин, дезоксирибонуклеаза, микробный лизоцим, лецитовителлаза, нейраминидаза, β-лактамаза) и токсинов (гемолизины, лейкоцидины, экзотоксин С, эксфолиативные токсины А и В, энтеротоксины типов А-Е).

Схема лабораторной диагностики стафилококковых инфекций представлена на рис. 5.2. Основным принципом диагностики стафилококковых инфекций является обнаружение возбудителя, а методом - бактериологический. Выбор исследуемого материала определяется патогенезом болезни и возможным местом локализации возбудителя: кровь при подозрении на сепсис, мокрота при пневмонии, гной при абсцессе и т.п. Материал засевают на кровяной агар для выявления гемолитической активности и на желточно-солевой агар (ЖСА), на котором лучше выявляется пигмент, определяется лецитовителлазная активность, а высокая концентрация NaCl обеспечивает преимущественный рост стафилококков. Для идентификации вида используют коммерческие микротест-системы («Стафи-тест»). Для определения возбудителя видовая идентификация не всегда достаточна (в случае условно-патогенных видов КОС), поэтому определяют факторы патогенности и персистенции. С целью выбора лечебного препарата определяется антибиотикограмма, а с эпидемиологической целью проводится фаготипирование с помощью диагностических стафилококковых бактериофагов (набор «Ч»).

Из серологических реакций для диагностики гнойно-септических заболеваний применяют РПГА и ИФА, в частности, для определения антител к тейхоевой кислоте или к видоспецифическим антигенам.

Для профилактики внутрибольничных инфекций важное значение имеет диагностика и санация резидентных стафилококковых бактерионосителей. Используют цитоскопический и бактериологический методы диагностики. В качестве исследуемого материала берут тампоном клетки эпителия слизистой оболочки переднего отдела носа, которые подращивают в среде 199 для накопления внутриклеточно паразитирующего стафилококка. Цитоскопическим методом подсчитывают процент эпителиоцитов, инфицированных патогеном . При бактериологическом исследовании важное значение имеет определение показателя микробной обсемененности (ПМО) слизистой оболочки носа и секретируемых факторов персистенции, в частности, антилизоцимной активности (АЛА) выделенной чистой культуры стафилококка. При резидентном стафилококковом бактерионосительстве ПМО должен быть выше 1. 103 КОЕ/тампон, а возбудитель должен характеризоваться АЛА.

Санацию резидентных бактерионосителей проводят местно препаратами, подавляющими в субингибиторных концентрациях антилизоцимную активность (АЛА) возбудителя.

**Стрептококки** вызывают различные нагноительные процессы – абсцессы, флегмоны, отиты, перитониты, плевриты и др., рожистое воспаление (воспаление лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки); гнойные осложнения ран; ангины; сепсис; ревматизм; пневмонии; скарлатину; кариес зубов.

Стрептококки – грамположительные, сферические или овальные (иногда ланцетовидной формы) микроорганизмы, при росте в жидкой среде образуют пары или цепочки (рис. 5.3.). Факультативные анаэробы, нуждаются для роста в богатых питательных средах. В зависимости от способности гемолизировать эритроциты стрептококки разделяются на β- (полный гемолиз – рис 5.4.), α1 – (частичный гемолиз), α - (частичный гемолиз и позеленение среды), γ - гемолитические (отсутствие гемолиза). Стрептококки классифицируют по группоспецифическим полисахаридным антигенам, локализующимся в клеточной стенке: выделяют 20 групп стрептококков, обозначенных буквами алфавита от А до S. Род Streptococcus насчитывает 29 видов бактерий, среди которых есть представители нормальной микрофлоры тела человека и возбудители тяжелых инфекционных эпидемических заболеваний. Наибольшее значение в этиологии стрептококковых инфекций имеют пиогенные стрептококки (S.pyogenes), стрептококки группы В (S. аgalactiae), бета-гемолитические стрептококки групп С и G, стрептококки группы D (энтерококки) и пневмококки (S. рneumoniae).

Факторы адгезии и колонизации: белок М, липотейхоевая кислота, липопротеиназа, лектин, фибронектинсвязывающие белки, бактериоцины-стрептоцины; у стрептококков групп А и С – капсула, образованная гиалуроновой кислотой.

Факторы персистенции: способность образовывать L-формы, антигенная мимикрия (сходство антигенов полисахарида стрептококка группы А с антигенами эпителиоцитов тимуса и кожи при ревматизме и роже), комплекс «пептидогликан-полисахарид» клеточной стенки стрептококков группы А обеспечивает устойчивость к лизоциму и лизосомальным ферментам, угнетает синтез интерлейкина-2.

Факторы патогенности – ферменты «защиты и агрессии»: гиалуронидаза; дезоксирибонуклеаза (стрептодорназа); лизоцим (мурамидаза); фибринолизин (стрептокиназа), а также ряд токсинов: экзотоксин (эритрогенный токсин), стрептолизины S и О, лейкоцидин, цитотоксины. Стрептококковый пептидогликан по биологическим и токсическим свойствам напоминает эндотоксин грамотрицательных бактерий.

У других таксоном стрептококков обнаружены различные факторы патогенности: у Str.intermedius и Str.constellatus обнаружена гиалуронидазная активность, штаммы Enterococcus faecalis продуцируют цитолизин; пневмококки продуцируют нейраминидазу, экзопротеазу. У стрептококков, колонизирующих полость рта и вызывающих поражение зубов, факторы адгезии рассматриваются как главный фактор вирулентности. У штаммов Str.agalactiae ( группа В) выявляются САМР-фактор, (этот фермент в синергизме со сфингомиелиназой стафилококка лизирует эритроциты барана) и полисахаридная капсула.

Особое положение занимает вид Str. рneumoniaе, играющий важную роль в патологии человека. Он является основным возбудителем острых и хронических воспалительных заболеваний легких, менингитов, средних отитов и синуситов. От остальных стрептококков пневмококки отличаются морфологией (грамположительный ланцетовидный диплококк), антигенной специфичностью, ферментацией инулина, высокой чувствительностью к оптохину и желчи. Главным фактором патогенности пневмококков является капсула полисахаридной природы.

Схема лабораторной диагностики стрептококковых инфекций представлена на рис. 5.5. Основным методом диагностики стрептококковых заболеваний является бактериологический. Материалом для исследования служат кровь, гной, слизь из зева, налет с миндалин, отделяемое ран. Исследуемый материал засевают на элективные питательные среды (5% кровяной, сывороточный и сахарный агары, сахарный бульон). Чашки с посевами культивируют в условиях повышенной концентрации двуокиси углерода и изучают вид гемолиза на кровяном агаре, а затем биохимические и антигенные свойства чистой культуры. Антигенная дифференциация стрептококков основана на обнаружении полисахаридного антигена клеточной стенки с помощью различных иммунологических реакций (преципитации с групповыми и агглютинации с типовыми сыворотками). Для обнаружения пиогенного стрептококка непосредственно в полученном от больного клиническом материале используются реакция коагглютинации и метод флуоресцирующих антител.

Серологическая диагностика стрептококковых инфекций чаще всего ограничивается определением титра антител к экстрацеллюлярным продуктам стрептококка – стрептолизину-О и ферменту гиалуронидазе (вспомогательный метод диагностики ревматизма и оценка активности ревматического процесса), наиболее чувствительной реакцией является постановка ИФА для определения антител к группоспецифическому антигену стрептококка группы А.

Дополнительные методы исследования: определение у стрептококков группы А рецепторов к сывороточным белкам (фибриногену,Ig, фибронектину); исследование гидрофобности и адгезии; количественное определение М-белка в клеточной стенке; определение липотейхоевой кислоты; методы генной диагностики (ПЦР, молекулярная гибридизация и др.); выявление антигенов стрептококка в крови.

Лабораторная диагностика пневмококков основана на их выделении и идентификации. Материалом для исследования служат мокрота и гной. Экспресс-диагностика: реакция набухания капсулы по Найфельду (в присутствии гомологичной сыворотки капсула пневмококков резко набухает). При бактериологическом методе исследования первичный посев материала производят только на кровяной агар, у выделенной чистой культуры устанавливают видовую принадлежность, определяют серовариант, иногда определяют вирулентность пневмококка в опыте на белых мышах .

Для определения уровня антипневмококковых антител в сыворотке крови больного используют непрямой вариант метода флюоресцирующих антител (МФА) и ИФА.

**Менингококковые инфекции** относятся к категории «неуправляемых» в связи с широкой циркуляцией возбудителя среди населения. Клинические проявления менингококковой инфекции: первично-локализованные формы (бактерионосительство, назофарингит), генерализованные формы: менингококцемия, менингит, менингоэнцефалит. Для менингококкового менингита характерно эпидемическое распространение, в связи с чем он носит название эпидемического цереброспинального менингита в отличие от менингита, вызываемого стрептококками, пневмококками, туберкулезной палочкой и другими бактериальными видами.

Менингококк – грамотрицательный диплококк, имеет характерную форму, напоминающую кофейные зерна, аэроб, имеет полисахаридную капсулу, на обычных питательных средах не растет.

На основании структуры капсульного полисахаридного антигена менингококки классифицируются на 14 серологических групп (А, В, С, D, Y, Z, X, N, W135, 29E, H, I, K, L), а по белковым антигенам наружной мембраны клеточной стенки – на 20 серотипов. Менингококки характеризуются большим набором факторов колонизации, персистенции и патогенности. Адгезия осуществляется за счет фимбрий (пилей), колонизации микроорганизма способствуют: бактериоцины, оксидаза, нейраминидаза, экстрацеллюлярная протеаза. Менингококки продуцируют также сидерофор (менингобактин), отнимающий у лактоферрина слюны железо, необходимое для построения оксидаз. Инвазия микроорганизма осуществляется с помощью ферментов гиалуронидазы и фибринолизина, в внутриклеточное паразитирование и персистенция определяются наличием капсулы и антилизоцимной активности. Важнейшими факторами патогенности менингококков являются эндотоксин, гемолизины и способность образовывать токсические субстанции.

Менингококки высоко требовательны к культивированию: при росте необходима повышенная влажность и 5-10% содержания СО2  в воздухе; чувствительны к отклонениям температуры; растут только на средах, содержащих животный белок; склонны к аутолизу, поэтому культуры необходимо часто пересевать.

Лабораторная диагностика менингококковой инфекции осуществляется бактериологическим методом путем выделения и идентификации возбудителя, серологическим – выявление антител в сыворотке крови.

Прямая микроскопия окрашенных по Граму мазков из осадка спинномозговой жидкости (жидкость мутная) в известной части случаев позволяет установить наличие менингококков и подтвердить диагноз. Характерна локализация менингококков в лейкоцитах (незавершенный фагоцитоз).

При бактериологическом методе исследуемый материал (спинномозговая жидкость, кровь, носоглоточная слизь) засевают на «шоколадный» и сывороточный агары. Идентификация вида N.meningitilis основана на изучении комплекса морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических признаков. Отношение к окраске по Граму у нейссерий выражено недостаточно четко, поэтому они окрашиваются метиленовой синью или по Граму в модификации Калины. Менингококки обладают ферментативной активностью в отношении глюкозы и мальтозы (с образованием кислоты без газа), оксидазо- и каталазоположительны. Принадлежность к серогруппам определяют с помощью реакции агглютинации на стекле, а также реакции микропреципитации.

При исследовании на менингококк носоглоточной слизи используют сывороточный агар с добавлением в него антибиотиков (ристомицин или линкомицин), подавляющих рост грамположительных кокков. Материал может быть засеян на месте его взятия или погружен в пробирку с транспортной средой. Через сутки просматривают выросшие колонии визуально и под лупой-микроскопом МБС. Колонии, подозрительные на менингококки, отсевают на скошенный сывороточный и бессывороточный агар, через сутки учитывают наличие или отсутствие роста и для дальнейшего исследования оставляют только непигментированные культуры, дающие нежный влажный рост. После микроскопии дальнейшую идентификацию культур проводят по выше описанным тестам.

При подозрении на менингококцемию в качестве экспресс-метода диагностики рекомендуется приготовление мазка «толстой капли» из крови. В мазке, имеющем голубой фон, хорошо видны окрашенные в темно-синий цвет лейкоциты и между ними множество мелких, темно-синих, располагающихся кучками, попарно и по одному, кокков.

При экспресс-диагностике менингококкового менингита ведется поиск антигена в спинномозговой жидкости с помощью метода встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ), ИФА, реакции латекс- и коагглютинации. Индикация менингококков группы В и С в спинномозговой жидкости, крови и сыворотке проводится ПЦР с геном сиалилтрансферазы. В последние годы для идентификации N.meningitides применяют метод анализа нуклеиновых кислот.

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) с менингококковыми эритроцитарными диагностикумами серогрупп А, В и С для обнаружения антител в сыворотке крови больного проводят в следующих случаях: 1) как дополнительный метод диагностики менингококковой инфекции (сыворотка крови больных обязательно должна быть исследована в динамике); 2) для ретроспективного выявления локализованных форм менингококковой инфекции в очагах заболевания; 3) при проведении иммуно-эпидемиологических исследований среди населения с целью определения серонегативных контингентов; 4) при оценке иммунологической эффективности противоменингококковой вакцинации.

**Гонококки** вызывают гонорею (венерическое заболевание, протекающее как специфический уретрит в острой или хронической форме), бленнорею (заболевание глаз у новорожденных детей), и, в редких случаях, воспаление слизистых глотки и прямой кишки (экстрагенитальные формы гонореи).

Гонококки – грамотрицательные диплококки, состоящие из двух бобовидных кокков, располагающихся вогнутыми сторонами друг к другу, по морфологии не отличаются от менингококков. Гонококки имеют нежную капсулу, строгие аэробы, но при первичных посевах лучше вырастают при некотором повышении содержания СО2, чрезвычайно требовательны к питательной среде, при выделении из организма растут только на средах с добавлением человеческого белка. Важным свойством гонококков является наличие цитохромоксидазы. Среди гонококков существуют различные антигенные популяции, что подтверждается отсутствием у людей иммунитета к повторному заражению. Основными факторами патогенности являются пили, с помощью которых гонококки осуществляют адгезию и колонизацию эпителиальных клеток слизистой оболочки мочеполовых путей, а также освобождающийся при разрушении гонококков эндотоксин (липополисахарид); факторами персистенции – антилизоцимная и антикомплементарная активности. Фагоцитоз гонококков носит незавершенный характер.

Схема лабораторной диагностики гонореи представлена на рис. 5.10. Основным принципом диагностики заболевания является обнаружение возбудителя, методы – бактериоскопический и бактериологический.

Материалом для исследования является: гнойное отделяемое уретры, влагалища, шейки матки и других органов, пораженных гонококком. В острых случаях гонореи диагноз устанавливают путем микроскопии мазков, окрашенных метиленовым синим (краситель наилучшим образом контрастирует гонококк, позволяя четко определить его форму, размер и характер взаимодействия с клетками организма – характерно расположение гонококков внутри лейкоцитов и по Граму (для окончательной видовой идентификации обнаруженных кокков). Для обнаружения гонококков в мазке применяют также метод прямой и непрямой иммунофлуоресценции.

При хронической гонорее на фоне лекарственной терапии используют бактериологический метод. Материал засевают на питательные среды, приготовленные на основе мясо-пептонного агара из мяса кроликов или бычьих сердец с добавлением сыворотки крови, дрожжевого гидролизата, казеина и инкубируют в атмосфере, содержащей 10-12% углекислого газа. Выделенные чистые культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам (оксидазоположительные, ферментируют глюкозу). В конце исследования определяют факторы персистенции (антилизоцимная и антикомплементарная активности), а также чувствительность культуры гонококка к пенициллину.

В настоящее время для диагностики гонореи используют ПЦР и РИФ.

При хроническом течении заболевания и в сомнительных случаях ставят реакцию связывания комплемента (реакция Борде-Жангу) с сывороткой крови больного.

**6. Рекомендуемая литература**:

1 Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Карташова О.Л. Биология патогенных кокков. – М., 2002.

2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. – Москва, «Медицина», 1999.

3. Дерябин Д.Г. Стафилококки. Экология и патогенность. – Екатеринбург, 2000.

4. Экология микроорганизмов человека. Под ред. академика РАМН О.В. Бухарина – Екатеринбург, 2006.

5. Бухарин О.В., Валышев А.В. Биология и экология энтерококков. - Екатеринбург, 2012.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Провести бактериологическое исследование для установления этиологии послеоперационного осложнения и выявления резидентного стафилококкового бактерионосителя.

**Задача.** В послеоперационной палате хирургического отделения у 2-х больных развились гнойные осложнения, возможно стафилококковой этиологии. Для выявления источника госпитальной инфекции был обследован медперсонал на стафилококковое носительство. Учтите результаты бактериологического исследования материала от 3-х лиц: больного, медицинской сестры и санитарки. Оформите протокол исследования и сделайте соответствующие выводы.

**Методика.** Расчет показателя микробной обсемененности (ПМО): число колоний стафилококка, выросших на среде, умножается на 50. ПМО=1х103 и более микробных клеток на тампон свидетельствует о высокой степени микробной обсемененности.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Обсле- дуемое  лицо | Исследуемый материал | Среда для посева | Изучение колоний | |  | Идентификация чистой культуры | | | | | | |
| ПМО (КОЕ на тампон) | лецитовителлазная  активность | Микроскопия | пигмент | анаэробное расцеп-  ление маннита | плазмокоагулаза | г е м о л и з и н | А Л А | антибиотикограмма | ф а г о в а р |
| Больной |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Медицинс-кая сестра |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Санитарка |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Подтвердилась ли стафилококковая этиология послеоперационного осложнения? Почему? 2. Выявлен ли резидентный стафилококковый бактерионоситель? Кто? Почему? 3.Явился ли стафилококковый бактерионоситель источником госпитальной инфекции? Почему?

**Работа 2**

**Цель:** Выбрать препарат для санации стафилококкового бактерионосителя.

**Методика:**

Отбор препаратов для санации резидентных стафилококковых бактерионосителей:

а) определяется МПК исследуемых препаратов по отношению к культуре стафилококка, выделенной от бактерионосителя;

б) исследуется действие субингибиторных концентраций препаратов (1/2 МПК) на антилизоцимную активность (АЛА) стафилококка, выделенного от бактерионосителя. Эффективным считается тот препарат, который подавляет АЛА стафилококка;

в) оценивается результат и оформляется протокол исследования.

Протокол исследования :

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №№  пп | Название препарата | МПК (разведение препарата) | 1/2  МПК | Подавление АЛА |
| 1  2  3  4 | Витамин А  Хлорофиллипт  Фурацилин  Риванол |  |  |  |

Вывод**:** (ответить на вопросы: Какой из препаратов будет наиболее эффективен при санации стафилококкового бактерионосителя? Почему?).

**Работа 3**

**Цель:** Провести бактериоскопический метод диагностики менингита.

**Задача.** В клинику поступил больной без сознания, с высокой температурой, ригидностью затылочных мышц. Возникло подозрение на эпидемический цереброспинальный менингит. Для подтверждения диагноза сделана спинномозговая пункция. Получена спинномозговая жидкость, мутная. Приготовлен микропрепарат из осадка спинномозговой жидкости, окрашен по Граму. Изучите препарат, зарисуйте и решите вопрос о подтверждении диагноза.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Исследуемый материал** | **Метод диагностики** | **Рисунок**  с обозначения |
|  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Подтвержден ли диагноз менингококкового менингита? Почему? 2. Какие особенности взаимодействия менингококков с лейкоцитами?).

**А Н Н О Т А Ц И И**

к препаратам по теме: «Микробиология стафилококковых инфекций».

**I. Лечебно-профилактические препараты**

* 1. **Вакцины**

**Стафилококковый анатоксин**

Представляет собой обезвреженный формалином экзотоксин стафилококка. Применяется для специфической терапии хронических форм стафилококковой инфекции, а также для профилактики заболеваний стафилококковой этиологии по эпидпоказаниям.

**Стафилококковый антифагин (химическая вакцина)**

Комплекс растворимых термостабильных антигенов стафилококка. Применяется для лечения больных с хроническими гнойничковыми поражениями кожи стафилококковой этиологии.

**1.2. Сыворотки и гамма-глобулины**

**Гипериммунная антистафилококковая плазма**

Получается из крови людей доноров, иммунизированных адсорбированным стафилококковым анатоксином.

Необходимый титр антитоксических антител в плазме 15 МЕ в 1 мл.

Плазма применяется для лечения больных стафилококковым сепсисом и другими стафилококковыми заболеваниями.

**Антистафилококковый** **иммуноглобулин**

Содержит антитела к стафилококковому экзотоксину. Готовится из крови иммунизированных доноров (если титр антитоксических антител выше 15МЕ в 1 мл). Показания к применению те же, что и антистафилококковой плазмы.

**1.3. Бактериофаги**

**Бактериофаг стафилококковый**

Содержит фильтрат фаголизата патогенных штаммов стафилококка. Используют для лечения и экстренной профилактики стафилококковых заболеваний.

**II. диагностические препараты**

**2.1. Бактериофаги**

**стафилококковый бактериофаг типовой диагностический**

Содержит фильтрат фаголизата эталонных штаммов золотистых стафилококков. Применяется для внутривидовой дифференциации и эпидемиологического маркирования штаммов стафилококка.

Письменные задания

для самостоятельной работы во внеучебное время

Решить ситуационную задачу. Результаты оформить в таблице.

**Задача 1.** У больного А. в различных участках кожи возникли множественные очаги гнойного характера. Врач клинически поставил диагноз «Фурункулёз» и направил больного на обследование. Было проведено бактериоскопическое, бактериологическое и серологическое исследование для выяснения этиологии заболевания. Дайте диагностическую оценку результатам исследования, заполнив таблицу.

|  |  |
| --- | --- |
| Метод исследования | Диагностическая ценность |
| Бактериоскопический |  |
| Бактериологический |  |
| Серологический |  |

**Практическое занятие № 5**

**2.Тема: Микробиология кишечных инфекций**

**3. Цель:** Изучить принципы лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики кишечных инфекций.

**4. Вопросы для рассмотрения:**

1. Эшерихиозы. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика. Специфическая терапия и профилактика.

2. Шигеллезы. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика. Специфическая терапия и профилактика.

3. Сальмонеллезы.Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика. Специфическая терапия и профилактика.

4. Холера. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика. Специфическая терапия и профилактика.

1. Основные понятия темы.

**Актуальность и практическая значимость темы**: обратить внимание студентов на то, что эпидемиологическая ситуация по кишечным инфекциям остается напряженной. Необходимо отметить высокий уровень заболеваемости кишечными инфекциями в РФ. Пояснить причину широкой распространённо­сти инфекций, представить данные о мерах профилактики и лечения острых кишечных инфекций. Подчеркнуть значимость неспецифических мер профилактики (соблюдение общих санитарно-гигиенических норм, обеспечение нормального централизованного водоснабжения и правильной организации предприятий пищевой промышленности).

* **Классификация шигелл и эпидемиология дизентерии**

Целесообразно совместить разбор классификации шигелл с особенностью эпидемиологии возбудителей. Напомнить студентам о теории соответствия Солодовникова об эпидемиологических особенностях шигеллезов. Подчеркнуть наличие общего фекально-орального механизма передачи шигелл.

**- Патогенез дизентерии**

Отметить, что выделение эндотоксина происходит при разрушении бактерий в желудке и тонком кишечнике, вызывая интоксикацию в первые дни заболевания. Подчеркнуть внутриклеточное паразитирование шигелл и формирование ГЗТ. Разобрать факторы колонизации, вирулентности и персистенции возбудителей дизентерии, продукцию экзотоксинов (в зависимости от вида шигелл и клинической картины). Отдельно разобрать патогенез формирования хронической дизентерии, ключевыми моментами которой являются: внутриклеточный паразитизм, антигенная мимикрия, низкая иммуногенность антигенов, секреция факторов персистенции шигеллами, сенсибилизация (ГЗТ), дисбиоз кишечника.

**- Лабораторная диагностика дизентерии**

- **Методы специфического лечения и профилактики дизентерии**

Обратить внимание студентов на то, что дизентерийная спиртовая вакцина и дизентерийный иммуноген являются лечебными вакцинами при хронической дизентерии, тогда как при остром процессе преимущественно применяются антибиотики (неспецифическая терапия). В качестве специфической профилактики используют дизентерийный бактериофаг, который назначают контактным лицам, имеющим опасность заражения.

**Классификация сальмонелл и их антигенная структура**

Целесообразно совместить разбор классификации сальмонелл с особенностью эпидемиологии возбудителей. Подчеркнуть многообразие антигенной структуры сальмонелл (65 серогрупп, внутри которых сальмонеллы делятся на серовары). Напомнить, что представители разных подвидов могут иметь общие (идентичные) групповые антигены.

**- Патогенез брюшного тифа**

Выделить основные фазы, обратить внимание на последовательность и длительность течения отдельных фаз, их соответствие определенным периодам инфекционного заболевания и активности клинических проявлений. Подчеркнуть особенности формирования и клинического течения («мнимое выздоровление») аллергически-выделительной фазы, указав опасность развития осложнений и формирования бактерионосительства.

- **Методы лабораторной диагностики брюшного тифа и паратифов**

При разборе данного вопроса необходимо провести сравнительную оценку диагностической ценности разных методов исследования, указать особенности их использования при проведении диагностики брюшного тифа и паратифов. Отметить, что на основании клинической картины дифференцировать брюшной тиф и паратифы невозможно, поэтому реакция Видаля всегда проводится параллельно с тремя видовыми диагностикумами, а при подозрении на другую сальмонеллезную инфекцию – с дополнительными диагностикумами. Подчеркнуть необходимость комплексного обследования больного в связи с относительной ценностью большинства методов диагностики на разных сроках заболевания. При серологическом методе диагностики вспомнить об анамнестических и групповых реакциях при учете результата агглютинации (реакция Видаля). Напомнить необходимость использования различных способов для повышения диагностической ценности при дифференциации заболевания и анамнестических реакций (метод «парных сывороток», определение титра антител классов М и G и их смену в динамике развития заболевания). Учитывая высокую летальность при брюшном тифе можно рекомендовать использование РИФ для экспресс-диагностики заболевания. Разобрать со студентами принципы и методы диагностики брюшнотифозного бактерионосительства и объяснить необходимость использования дополнительных методов обследования и забора материала для исследования. Выделить использования РПГА (как более чувствительной реакции) при поиске Vi-антител в сыворотке обследуемого. Отметить реакцию фаготипирования для установления источника инфекции.

**- Этиология и эпидемиология пищевых токсикоинфекций (ПТИ) – сальмонеллезов**

Подчеркнуть, что пищевые токсикоинфекции – полиэтиологичное заболевание, возникающее после употребления в пищу продуктов, инфицированных возбудителями и их токсинами. Расшифровать сам термин «пищевая токсикоинфекция» («пищевая» - отражает путь и условия передачи инфекции). Отметить особенности клинической картины ПТИ сальмонеллезной этиологии (тяжелое течение, эпидемические вспышки). Обратить внимание на наименование сероваров сальмонелл, отражающих эпидемическую особенность сальмонеллезных ПТИ (зооантропонозы). Выделить условия, способствующие широкому распространению ПТИ: нарушение правил производства, транспортировки и хранения пищевых продуктов, несвоевременное выявление носителей среди работников сферы обслуживания (пунктов общественного питания, предприятий по переработке сельхозпродукции и пищевой промышленности). Следует отметить особенности эпидемиологиии сальмонеллезов в последние годы (преобладание S.enteritidis), роль птицы и птицепродуктов в передаче инфекции, рост внутрибольничных сальмонеллезных ПТИ, увеличение заболеваемости детей до 14 лет.

**- Патогенез пищевых токсикоинфекций**

Выделить, что в основе патогенеза ПТИ лежит действие микробных токсинов, накопившихся в продуктах при размножении и гибели бактерий. Охарактеризовать клинические проявления заболевания: краткий инкубационный период, краткость течения, развитие гастроэнтерита. Подчеркнуть наличие первичной и вторичной интоксикации, внутриклеточное паразитирование и персистирование сальмонелл, способствующее формированию реконвалесцентного бактерионосительства.

**- Лабораторная диагностики сальмонеллезных пищевых токсикоинфекций**

Выделить сходство и различия в диагностике сальмонеллезных ПТИ и брюшного тифа, паратифов. Общность подхода в плане выбора принципов и методов диагностики данных заболеваний, необходимость исследования пищевых продуктов при ПТИ. Подчеркнуть относительную ценность лабораторных методов диагностики при кратковременном течение заболевания, ретроспективность серологического исследования, необходимость проведения его в динамике, длительность и позднее подтверждение диагноза при бактериологическом методе исследования. Обратить внимание студентов на эпидемиологическую важность проведения данных исследований в целях контроля за распространением эпидемической вспышки и поиска источника инфицирования. Отметить высокую ценность используемых методов диагностики при генерализации процесса и тифоидной форме сальмонеллеза.

- **Специфическая профилактика и терапия брюшного тифа, паратифов, пищевых токсикоинфекций сальмонеллезной этиологии.**

Напомнить студентам о понятиях «экстренная» профилактика и профилактика «по эпидпоказаниям». Определить их различия. Отметить, что для экстренной профилактики используются бактериофаги, а для профилактики по эпидпоказаниям для брюшного тифа – вакцины (убитые, химические). Обратить внимание студентов на то, что бактериофаги можно использовать не только для экстренной профилактики заболевания, но и для его лечения. В качестве препарата для лечения сальмонелезных ПТИ (у детей, при тяжелый формах заболевания) возможно использование лактоглобулина.

**Классификация вибрионов.**

Отметить, что при современной классификации все вибрионы объединяются в семейство Vibrionaceae, включающее патогенные и непатогенные для человека виды. Медицинское значение имеют представители рода Vibrio. Обратить внимание, что только токсигенные варианты холерных вибрионов вида Vibrio cholerae способны вызывать холеру.

- **Особенности эпидемиологии холеры.**

Обратить внимание студентов на то, что у холерных вибрионов в процессе паразитического приспособления сохранились некоторые черты сапрофитизма, которые дают им возможность существования во внешней среде. Отметить существование резервуаров холеры в природных водоемах на определенных территориях. Этому способствует устойчивость вибрионов к факторам окружающей среды и образование симбиотических связей с представителями фито- и зоопланктона. Таким образом, холеру можно рассматривать как природноочаговый сапроноз, первично связанный с природными экосистемами. Холера является высококонтагиозным заболеванием и при наличии больного или носителя существует высокая вероятность фекально-орального механизма передачи заболевания контактно-бытовым или пищевым путем. При проведении противоэпидемических мероприятий обязательно не только выявлять неблагополучный водоисточник (обеззараживание, гиперхлорирование воды), но и изолировать больных и контактных, выявлять, изолировать и санировать носителей.

**- Патогенез холеры.**

Обратить внимание студентов на основные этапы патогенеза холеры. Сделать вывод о том, что в основе патогенеза холеры - действие экзотоксина-холерогена возбудителя. Подчеркнуть, что все характерные клинические симптомы определяются обезвоживанием организма (гиповолемия, нарушение водно-электролитного баланса).

- Методы лабораторной диагностики холеры.

Используются таблицы «Лабораторная диагностика холеры», «Определение биовара холерного вибриона»

- **Профилактика холеры**

Обратить внимание студентов на то, что индивидуальная резистентность связана с общей сопротивляемостью организма и кислотностью желудочного сока. В связи с этим одна из профилактических мер при контакте с больным холерой - прием пищи или ацидин-пепсина перед посещением больного. Подчеркнуть важность неспецифических мер профилактики (соблюдение личной гигиены и т.д.). Отметить, что у переболевших формируется антибактериальный и антитоксический иммунитет. В настоящее время не удается достигнуть эффективной профилактики при вакцинации. Вакцины быстро формируют иммунитет, но он нестоек. Для экстренной профилактики используют бактериофаг, антибиотики тетрациклинового ряда и фторхинолоны. Следует отметить рост антибиотикорезистентности холерного вибриона. Необходимо перечислить ряд мер неспецифической профилактики, направленных на разрыв эпидемиологической цепочки.

**3.Цель:** Определить особенности этиологии, епилдемиологии и патогенеза кишечных инфекций – эшерихиозов, с альмонеллезов, шигеллезов, холеры. Овладеть умением оценки результатов лабораторной диагностики кишечных инфекций, научиться решать практические задачи по специфической профилактике и терапии.

**6. Рекомендуемая литература**

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. - М.: Медицинское информационное агентство, 2006.

2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т.: учебник по дисциплине «Микробиология, вирусология и иммунология» для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060101.65 «Лечебное дело», 060103.65 «Педиатрия», 060104 «Медико-профилактическое дело» / под ред. акад. РАМН В.В. Зверева, проф. М.Н. Бойченко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – Т. 1. - 448с.; – Т.2.

3. Бухарин О.В. Медицинская микробиология (компендиум) / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009.

4. Гафиев X .К., Нестеренко В.Е., Лукьянов Н.Б. с соавт. Вспышки брюшного тифа в республике Таджикистан // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2003. № 2. С.9-11.

1. Лобзин Ю.В. и соавт. Узловые вопросы патогенеза брюшного тифа // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2006. № 1. С.55-61.
2. Онищенко Г.Г. Актуальные вопросы санитарно-эпидемиологической безопасности питания населения //Здравоохранение Российской Федерации, 2005. № 1. С.3-13.
3. Онищенко Г.Г. Инфекционные болезни - важнейший фактор биоопасности // Эпиде­миология и инфекционные болезни, 2003. № 3. С.4-16.
4. Чайникова И.Н., Смолягин А.И., Иванова А.С. с соавт. Эффективность использо­вания полиоксидония для санации сальмонеллезных бактерионосителей // Иммунология, 2004. т.25. № 6. С.339-343.
5. **Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1.**

**Задача.**  Больной перенес брюшной тиф. Перед выпиской из стационара он был обследован для выявления бактерионосительства: возбудитель обнаружен в испражнениях, из мочи и желчи микроорганизмы не выделены. Проведен серологический метод диагностики: поставлена реакция Vi – гемагглютинации. Оформите протокол и ответьте на вопросы.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

**Цель:** провести исследования для диагностики брюшнотифозного бактерионосительства.

**Серологический метод**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Диагностикум | Разведение сыворотки больного | | | |
| Vi - эритроцитарный брюшнотифозный | 1/20 | 1/40 | 1/80 | Контроль |
|  |  |  |  |

**Вывод:** (Ответить на вопросы: Подтверждается ли диагноз брюшнотифозного носительства? Почему? Ответ поясните).

**Работа 2.**

**Цель:** Провести ускоренную диагностику холерного вибрионосительства. Изучить препараты для профилактики холеры.

Задача: В сельской местности зарегистрировано три случая заболевания холерой. Проведена ускоренная диагностика населения на вибрионосительство. Какие специфические и неспецифические препараты надо применять для профилактики холеры у лиц, бывших в контакте с больным, у людей, живущих в этом районе? Оформить протокол.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель…

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Метод диагностики | Среда для посева | Результат посева |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав | Показания к применению | Характер действия |
|  |  |  |  |

**Вывод (**Ответить на вопросы: 1. Подтвержден ли диагноз холерного вибрионосительства? 2. Какой метод диагностики проведен? 3. Обоснование положительного результат исследования? 4. Какие специфические и неспецифические препараты используются для профилактики холеры в данной местности?)

**Работа 3.**

**Цель:** Изучить препараты для специфической терапии и профилактики кишечных ифекций.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель…

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав | Способ получения | Практическое использование | Механизм действия |
|  |  |  |  |  |

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

Заполните таблицу по специфическим препаратам для диагностики кишечных инфекций.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав | Практическое использование (метод диагностики) | Результат поиска |
|  |  |  |  |

**Практическое занятие № 6**

**2.Тема:Дисбиозы основных экологических ниш организма человека.**

**3. Цель:** Овладеть методами бактериологической диагностики, профилактики и терапии дисбиозов.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Понятия «микробиоценоз», «биотоп», «экологическая ниша».
2. Микрофлора кожи и слизистых оболочек как гомеостатическое звено. Понятие «аутохтонная» и «аллохтонная» микрофлора.
3. Основные представители нормальной микрофлоры кожи, ротовой полости, дыхательных путей, мочевыводящих путей, половых путей.
4. Микрофлора кишечника. Функции нормальной микрофлоры. Понятие «колонизационная резистентность».
5. Основные представители кишечной микрофлоры и их количественное содержание.
6. Дисбиоз кишечника. Определение и классификация. Микробиологические критерии дисбиоза.
7. Методы лабораторной диагностики дисбиоза кишечника: классический (бактериологический) и экспресс-методы (скрининговые).
8. Принципы коррекции дисбиоза кишечника. Основные группы препаратов и их механизм действия.

**5. Основные понятия темы:**

Жизнедеятельность организма человека, нормальное функционирование его систем неотделимы от микроорганизмов, которые заселяют кожу, слизистые оболочки и многие органы, имеющие сообщения с внешней средой (пищеварительный тракт, дыхательные и мочеполовые пути). Количественный и качественный состав микрофлоры различных биотопов человека чрезвычайно разнообразен, что отражает значительную роль микробного звена в выполнении целого ряда гомеостатических функций, а также определяет участие отдельных представителей условно-патогенной флоры в развитии патологических процессов.

Одной из основных функций нормальной микрофлоры является участие в метаболических процессах. Микроорганизмы-симбионты синтезируют витамины, гормоноподобные соединения и другие биологически активные вещества. При расщеплении полисахаридов и белков до структурных мономеров (соответственно моносахаридов, аминокислот и пептидов) под действием сахаролитических и протеолитических ферментов бактерий образуются газообразные продукты (Н2, СО2, СН4, Н2S), органические кислоты (лактат, сукцинат и др.), этанол, жирные кислоты с короткой цепью (ацетат, пропионат, бутират). Кроме того, при катаболизме белковых соединений дополнительно образуются NH3, амины, фенольные и индольные соединения.

Другой важнейшей функцией микрофлоры является участие в создании и поддержании колонизационной резистентности – способности микрофлоры во взаимодействии с иммунными механизмами и факторами естественной резистентности хозяина противостоять заселению различных биотопов потенциально патогенными микроорганизмами. К факторам колонизационной резистентности можно отнести продукцию микроорганизмами перекиси водорода, бактериоцинов и микроцинов, мурамидаз, других веществ (например, рейтерина – антибиотика из лактобацилл).

Нарушения питания (вскармливания), неблагоприятная экологическая обстановка, широкое, и нередко необоснованное, применение антибиотиков и химиопрепаратов приводят к развитию дисбиотических состояний – количественных или (и) качественных изменений микрофлоры под действием экзогенных и эндогенных факторов.

Диагностику дисбиотических нарушений осуществляют с помощью бактериологического метода. Готовят серийные десятичные разведения исследуемого материала с последующим посевом полученной взвеси на селективные, элективные и дифференциально-диагностические среды. При невысокой исходной микробной обсеменености исследуемого материала можно использовать метод секторных посевов.

Для коррекции дисбиотических состояний используются бактерийные биопрепараты и продукты питания на основе микроорганизмов (пробиотики, эубиотики), а также пищевые/фармацевтические ингредиенты олигосахаридной природы (пребиотики). Для лечения заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, дополнительно применяют антибиотики (с учетом видовой и индивидуальной чувствительности, влияния субингибиторных концентраций на биологические свойства бактерий) и бактериофаги.

**6. Рекомендуемая литература**

1. Блохина И.Н., Дорофейчук В.Г. Дисбактериозы. Л.: Медицина, 1979.
2. Бондаренко В.М., Учайкин В.Ф., Мурашова А.О., Бевз Н.И., Абрамов Н.А. Дисбактериоз. Современные возможности профилактики и лечения. М., 1994.
3. Воеводин Д. А., Розанова Г. Н., Стенина М. А. Дисбактериоз и иммунопатологический процесс //Журн.микробиол., 2005. № 2. С. 89-92.
4. Красноголовец В.Н. Дисбактериоз кишечника. М.: Медицина, 1989.
5. Митрохин С. Д. Дисбактериоз: современные представления. Диагностика. Возможности лечения //Антибиотики и химиотерапия, 2004. № 7. С. 22-33.
6. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбактериозы кишечника. М.: Медицина, 1984.
7. Украинцев С.Е., Нетребенко О.К. Грудное молоко: пребиотик, пробиотик или синбиотик? //Педиатрия, 2008. № 1, С.95-96.
8. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология. В 3-х т. М.: Грант, 2001.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть навыком бактериологической диагностики дисбактериоза кишечника.

**Задача.** В бактериологическую лабораторию поступили 3 образца фекалий от больных с предварительным диагнозом "Дисбиоз кишечника". Проведите лабораторное исследование для подтверждения данного диагноза и оцените его результат.

**Методика (метод серийных разведений)**

1. Из пробирки с надписью "Испражнения. Разведение 10-1" 0.1 мл суспензии фекалий перенести стерильной пипеткой в пробирку с 9.9 мл изотонического раствора хлорида натрия и тщательно перемешать. Получается разведение испражнений 10-3.

2. Подобным образом готовятся разведения 10-5, 10-7 и 10-9.

3. Из пробирок с разведениями фекалий 10-7 и 10-9 1.0 мл суспензии посеять глубоким уколом в полужидкую среду на основе пептона Бактофок. Пробирки инкубировать в термостате при 370 С в течение 96 ч.

4. Из пробирки с разведением фекалий 10-7 0.1 мл суспензии посеять на чашки Петри со средой Эндо (для выделения бактерий дизентерийной и кишечно-тифозной группы) и 5% кровяным агаром (для изоляции многих видов микроорганизмов и выявления бактерий с гемолитической активностью). Из пробирки с разведением фекалий 10-5 0.1 мл суспензии посеять на чашку Петри с желточно-солевым агаром (для выделения стафилококков и учета продукции лецитиназы). Капли суспензии тщательно растереть шпателем. Чашки инкубировать в термостате при 370 С в течение 18-24 ч.

5. Произвести учет результатов посевов: подсчитать количество колоний каждого типа на всех чашках, дать полную характеристику колоний (размеры, форма, цвет, прозрачность, характер поверхности и краев и т. д.). По одной колонии каждого типа пересеять на скошенный 1.5% мясо-пептонный агар. Пробирки инкубировать в термостате при 370 С в течение 18-24 ч.

6. Произвести идентификацию чистых культур: изготовить микропрепарат и окрасить его по Граму; определить биохимические свойства энтеробактерий (с помощью ЭНТЕРОтеста) и стафилококков (с помощью СТАФИтеста). Установить вид выделенных микроорганизмов.

7. Подсчитать количество микроорганизмов каждого вида в 1 г фекалий. Для этого количество колоний на чашке Петри умножают на 10 (поскольку на питательные среды засевалось по 0.1 мл суспензии) и на показатель разведения (105 или 107). Пример: на среде Эндо выросло 17 колоний кишечной палочки. Содержание ее в 1 г фекалий составляет 17х10х107, то есть 1.7х109 КОЕ/г.

8. Содержание бифидобактерий определяется по наличию типичных для них клеток с характерным расположением в соответствующем разведении. Бифидобактерии - грамположительные (окрашивание часто неравномерное), чрезвычайно вариабельные по форме палочки; обычно несколько изогнутые, булавовидные и часто разветвленные. Расположение клеток одиночное, парами, V-образное, иногда цепочками, палисадом или розетками; иногда встречаются раздутые кокковидные формы.

Протокол исследования**:**

Цель:

**I этап. Выделение чистой культуры**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Разведение фекалий | Посевная доза, мл | Питательная среда | Характеристика колоний | Число колоний |
|  | 10-7 | 0,1 | Эндо | Лак+ (А) |  |
| Лак- (Б) |  |
|  | 10-7 | 0,1 | Кровяной агар | Гем+ (В) |  |
| Гем- (Г) |  |
| 10-5 | 0,1 | Желточно-солевой агар | Лец+ (Д) |  |
| Лец- (Е) |  |
| 10-7 | 1,0 | Бактофок | Наличие роста |  |
| 10-9 | 1,0 | » | » |  |

**II этап. Идентификация чистой культуры**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штамм | Морфология (рис.) | Биохимические свойства  (ЭНТЕРО-тест) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Вид микроорганизма | Количество, КОЕ/г |
| 1 | 2 | | 3 | 4 | | 5 | | 6 | 7 | | 8 | 9 | | 10 | | 11 | | 12 |
| А |  |  |  | |  |  | |  | |  |  | |  |  | |  | |  | |  |  |  |
| Б |  |  |  | |  |  | |  | |  |  | |  |  | |  | |  | |  |  |  |
| В |  |  |  | |  |  | |  | |  |  | |  |  | |  | |  | |  |  |  |
| Г |  |  |  | |  |  | |  | |  |  | |  |  | |  | |  | |  |  |  |
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Штамм | Морфология (рис.) | Биохимические свойства  (СТАФИ-тест) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Вид микроорганизма | Количество, КОЕ/г |
| 1 | | 2 | | | 3 | | 4 | | | 5 | | | 6 | | 7 | | 8 | |
| Д |  |  | |  | | |  | |  | | |  | | |  | |  | |  | |  |  |
| Е |  |  | |  | | |  | |  | | |  | | |  | |  | |  | |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Есть ли дисбиотические нарушения кишечника у данного больного? Почему? (Сформулируйте развернутое заключение о состоянии микробиоценоза толстой кишки). 2. Какая степень дисбактериоза кишечника выявлена у данного больного? 3. Какой основной показатель используется для определения степени дисбактериоза?).

**Работа 2**

**Цель:** Изучить бактерийные биологические препараты для коррекции дисбиотических состояний кишечника.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №  п/п | Название препарата | Состав препарата (вид(ы) микроорганизмов) | Показания к применению |
|  |  |  |  |

**Методика:** Рассмотреть ампулы с препаратами, изучитьаннотации .

А н н о т а ц и я

к препаратам по теме «Микробиология дисбиозов»

Колибактерин. В состав препарата входят кишечные палочки штамма

М-17.

Лактобактерин. Содержит антагонистически активные культуры лактобацилл (Lactobacillus fermentum или Lactobacillus plantarum).

Бифидумбактерин. Лиофильно высушенная культура бактерий вида Bifidobacterium bifidum.

Бификол. Комплексный препарат, состоящий из совместно выращенных культур Escherichia coli М-17 и Bifidobacterium bifidum 1.

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

В тетради для практических занятий составить и заполнить таблицу

Препараты, используемые для коррекции дисбиозов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Группа  препаратов | Определение | Примеры |
| Пробиотики |  |  |
| Пребиотики |  |  |
| Синбиотики |  |  |

**Практическое занятие № 7**

* 1. **Тема: Микробиология УПМ-инфекций**

**3. Цель:** Определить особенности этиологии, эпидемиологии, лабораторной диагностики и терапии эндогенных и госпитальных инфекций.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Основные группы условно-патогенных бактерий (УПМ) – возбудителей заболеваний человека.
2. Факторы вирулентности и персистенции УПМ.
3. Условия возникновения и патогенез эндогенных УПМ-инфекций.
4. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных УПМ.
5. Лечение и профилактика заболеваний, вызванных УПМ.
6. Понятие о госпитальной инфекции. Эпидемиология госпитальных инфекций Основные клинические формы ВБИ.
7. Характеристика госпитальных штаммов. Критерии идентификации госпитальных штаммов.
8. Терапия и профилактика ВБИ.

**5.Основные понятия темы:**

Поскольку нормальная микрофлора не является оптимальной, а состоит из условно-патогенных микроорганизмов, многие ее представители способны вызывать у иммунокомпромитированного хозяина эндогенные инфекции. Развитию инфекционно-воспалительных процессов способствуют факторы вирулентности (токсины, ферменты защиты и агрессии) и персистенции условно-патогенных бактерий.

В лабораторной диагностике инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, используют микроскопический, бактериологический и серологический методы Для определения этиологической значимости выделенной культуры определяют показатель микробной обсемененности, факторы вирулентности и персистенции, ставят серологическую реакцию с аутоштаммом.

Госпитальные (внутрибольничные, нозокомиальные ) инфекции возникают в условиях лечебно-профилактического учреждения среди пациентов или медперсонала в результате пребывания в нем. Чаще всего госпитальные инфекции регистрируются в стациионарах хирургического профиля, акушерских и гинекологических отделениях, неонатологических отделениях, отделениях и палатах реанимации.

- Этиологический фактор ВБИ – госпитальные штаммы стафилококков, стрептококков, энтеробактерий, псевдомонад, грибов рода Candida, клостридиальных и неклостридиальных анаэробов. Характерными признаками госпитальных штаммов являются множественная устойчивость к антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам, УФЛ, высокая вирулентность, малая инфицируюшая доза.

- Эпидемиология и патогенез ВБИ. Оособенности эпидемиологии ВБИ, связаны с преимущественно артифициальным путем передачи и основным источником инфекции – медперсоналом. Ведущую роль в возникновении ВБИ играет несоблюдение противоэпидемического режима ЛПУ, нарушение правил асептики и антисептики. Основными клиническими проявлениями ВБИ являются е гнойно-воспалительные заболевания различной локализации и острые кишечные инфекции.

- Лабораторная диагностика ВБИ. Для постановки диагноза с применением лабораторной диагностики необходимо идентифицировать госпитальный штамм по основным критериям – антибиотикограмма, факторы вирулентности, ПМО и найти источник ВБИ по эпидемическим маркерам - антибиотикограмма, серотипирование, фаготипирование, генный профиль.

- Терапия и профилактика ВБИ. Трудность этиотропной терапии ВБИ, связана с полирезистентностью госпитальных штаммов. Для профилактики ВБИ необходимо строгое соблюдение правил асептики и антисептики, эпидрежима ЛПУ, недопущение к работе бактерионосителей в составе медперсонала.

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Акимкин В. Г. Система профилактики внутрибольничных инфекций в России. Служба госпитальных эпидемиологов: итоги и перспективы развития. Эпидемиология и инфекционные болезни, 2005. № 1. С. 4-8.
2. Внутрибольничные инфекции: Пер. с англ. /Под ред. Р.П. Венцела. М.: Медицина, 1990.
3. Концепция профилактики внутрибольничных инфекций //Эпидемиология и инфекционные болезни, 2000. № 5. С.4-9.
4. Покровский В.И., Семина Н.А. Внутрибольничные инфекции: проблемы и пути решения //Эпидемиология и инфекционные болезни, 2000. № 5. С.12-15.
5. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2000. № 3. С.82-93.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть навыком бактериологической диагностики инфекций мочевых путей.

**Задача.** В бактериологическую лабораторию поступили 3 образца мочи от пациентов с предварительным диагнозом «Инфекция мочевых путей». Проведите лабораторное исследование для подтверждения возможного диагноза ИМП и оцените его результат.

**Методика (метод секторных посевов Gould)**

1. Бактериологической петлей диаметром 3 мм произвести посев (30-40 штрихов) исследуемого материала (мочи) на 1-й сектор чашек Петри с питательными средами (Эндо и 5% кровяным агаром). После этого петлю прожечь и произвести 4 штриховых посева из 1-го сектора по 2-й, аналогичным образом из 2-го сектора в 3-й, и из 3-го в 4-й (см. рисунок), прожигая петлю после пересева с каждого сектора. Чашки инкубировать в термостате при 370С в течение 18-24 часов.

2. Подсчитать число колоний, выросших в разных секторах. Количество бактерий в 1 мл жидкости определить по таблице.

1

2 2 2

33

Схема посева жидкости по методу Gould

1-4 соответственно 1-4-й секторы

Расчетная таблица для определения количества бактерий в 1 мл жидкости\*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Количество бактерий, выросших на секторе | | | | Количество бактерий в 1 мл жидкости |
| 1-м | 2-м | 3-м | 4-м |
| 1-6  8-20  21-30  31-60  70-80  100-150  Очень большое количество  То же  » »  » »  » »  » » | Нет роста  » »  » »  » »  » »  5-10  20-30  40-60  100-140  Очень большое количество  То же  » » | Нет роста  » »  » »  » »  » »  » »  » »  » »  10-20  30-40  60-80  80-140 | Нет роста  » »  » »  » »  » »  » »  » »  » »  » »  Единичные  От единичных до 25 | 1 000  1 000  5 000  10 000  50 000  100 000  500 000  1 000 000  5 000 000  10 000 000  50 000 000  100 000 000 |

\*Таблица взята из статьи Ю. М. Фельдман с соавт. "Количественное определение бактерий в клинических материалах" //Лаб. дело.- 1984.- №10.- С. 616-619.

Протокол исследования**:**

Цель:

**I этап. Выделение чистой культуры**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Метод диагностики | Питательная среда | Характеристика колоний | Число колоний и их типов по секторам | | | | Степень бактериурии, КОЕ/мл |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
|  |  | Эндо | Лак+ (А) |  |  |  |  |  |
| Лак- (Б) |  |  |  |  |  |
| Кровяной агар | Гем+ (В) |  |  |  |  |  |
| Гем- (Г) |  |  |  |  |  |

**II этап. Идентификация чистой культуры**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штамм | Морфология (рис.) | Биохимические свойства  (ЭНТЕРО-тест или СТАФИ-тест) | | | | | | | | | | | | АЛА,  мкг/мл | Вид  микроорганизма |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| А |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Б |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| В |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Г |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Есть ли бактериурия у данного пациента? 2. На основании каких критериев подтверждается этиологическая значимость выделенного микроорганизма?).

**Работа 1**. Идентификация госпитальных штаммов сальмонелл.

Цель: Определить диагностические критерии госпитальных штаммов для постановки диагноза ВБИ.

Задача.

В реанимационном отделении у больного, находящегося на аппарате искусственной вентиляции легких, возникла ангина. С миндалин больного (штамм № 1) и с контура дыхательной аппаратуры (штамм № 2) были выделены бактерии серотипа S. typhimurium.

Установите госпитальную принадлежность штаммов сальмонелл. Докажите, что ангина у больного является случаем ВБИ.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуе-мый штамм | Устойчи-вость к АБ | Устойчивость к дезинфектантам | Устойчи-вость к УФЛ | АЛА | Серовар | Фаготип |
| Штамм №1 |  |  |  |  |  |  |
| Штамм №2 |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (Ответить на вопросы: 1.По каким критериям доказан госпитальный характер штаммов сальмонелл? 2. На основании чего поставлен диагноз ВБИ? 3. Кто предположительно может являться источником данной ВБИ?

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

Особенности эпидемиологии ВБИ

В тетради для практических занятий заполнить таблицу по особенностям эпидемиологии ВБИ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Источники ВБИ | Характеристика госпитального штамма | Факторы передачи ВБИ | Пути передачи ВБИ |
| 1.  2. | 1.  2.  3.  4.  5. | 1.  2.  3. | 1.  2.  3.  4. |

**Практическое занятие № 8**

**2. Тема: Микробиология анаэробных инфекций**

3. Цель: Выяснить особенности этиологии, патогенеза клостридиальных (столбняк, ботулизм, газовая гангрена) и неклостридиальных инфекций, овладеть умением оценки результатов лабораторной диагностики столбняка, ботулизма, газовой инфекции и некслостридиальной анаэробной инфекции, научиться решать практические задачи по специфической профилактике, терапии столбняка, ботулизма, газовой гангрены и неклостридиальной анаэробной инфекции.

4**. Вопросы для рассмотрения:**

1. Своеобразие условий заражения возбудителями столбняка, ботулизма, газовой гангрены.
2. Патогенез столбняка, ботулизма, газовой гангрены. Факто­ры вирулентности возбудителей.
3. Методы лабораторной диагностики клостридиозов.
4. Особенности иммунитета при столбняке, ботулизме, газо­вой гангрене.
5. Специфическая профилактика и лечение столбняка, боту­лизма, газовой гангрены.
6. Значение неспорообразующих анаэробов в патологии чело­века.
7. Методы лабораторной диагностики и терапии неклостридиальных анаэробных инфекций.

**5. Основные понятия темы.**

Морфологические и биологические свойства клостридиальных и неклостридиальных анаэробных микроорганизмов. Способы создания анаэробных условий для получения чистой культуры. Биологическая специфика анаэробов (тип дыхания, некропаразитизм, токсигенность, ассоциация с аэробами, полимикробный характер инфекции и т.д.), причины устойчивости и широкого распространения в природе.

Этиология неклостридиальных анаэробных инфекций, таксономические группы, составляющих нормальную микрофлору человека, условия, снижающие уровень кислорода и окислительно-восстановительный потенциал в тканях, приводящие к возникновению гнойно-воспалительные заболевания различной локализации.

Лабораторная диагностика анаэробных инфекций. Методы обнаружения и идентификации экзотоксинов возбудителя в реакции нейтрализации на мышах (биологическая проба).

Специфическая терапия и профилактика анаэробных инфекций.

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. СПб., 1998.
2. Методы общей бактериологии: пер. с англ. /под ред. Ф.Герхардта и др. - М. Мир, 1984.
3. Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах). Под редакцией Й.Ленгелера, Г.Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.
4. Б.Нолтинг. Новейшие методы исследования биосистем. М.: Техносфера, 2005

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**РАБОТА 1**

**Цель:** Изучить особенности бактериологического и биологи­ческого методов диагностики пищевого ботулизма и определить диагностическую ценность этих методов.

**Задача.** В инфекционную больницу поступил больной с по­дозрением на пищевой ботулизм. Для экстренной диагностики с целью обнаружения в крови больного токсина был использован биологический метод. Для изучения причины возникновения ин­токсикации было проведено бактериологическое исследование остатков рыбных консервов, которые употреблялись пострадав­шим в пищу. Изучите морфологию чистой культуры, выделенной из пищевых продуктов. Учтите результат биологической пробы. Дайте диагностическую оценку методов.

**Методика биологической пробы на мышах**

Берут не менее 5 мышей. Одну из них внутримышечно заражают только исследуемым материалом (кровь, фильтрат пищевых продуктов) в объеме 0,5-1 мл, остальных четырех – смесью исследуемого материала с 200 АЕ антитоксической сыворотки соответствующего типа – А, В, С и Е. Смесь выдерживают при комнатной температуре 40 минут для нейтрализации токсина антитоксином (антитоксической сывороткой). При необходимости следует использовать 8 мышей (7 опытных и одна контрольная). При наличии в исследуемом материале ботулинического токсина погибают все мыши, кроме той, которой была введена смесь материала с антитоксической сывороткой, нейтрализовавшей действие соответствующего типа токсина.

Протокол исследования:

Цель:

**Бактериологический метод**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Метод создания анаэробных условий | Среда для посева | Микроскопия чистой культуры (рис.) |
|  |  |  |  |

**Биологическая проба на мышах**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Используемые ингредиенты | Результат | Объяснение результата |
| Опыт |  |  |  |
| Контроль |  |  |  |

Вывод: ответить на вопросы:

1. Подтверждается ли диагноз? Если да, то почему?

2. Какая иммунологическая реакция опре­деляет результат биологической пробы?

3. Достаточно ли представленных данных бактериологического метода, что­бы считать консервы источником заболевания? Ответ объясните.

4. Что необходимо обнаружить в пищевых про­дуктах, чтобы доказать, что они явились источником за­болевания?

**РАБОТА 2**

**Цель:** Ознакомиться с экспрессным методом обнаруже­ния экзотоксинов возбудителей газовой гангрены в исследуемом материале.

**Задача**. В хирургическом отделении у больного развилось осложнение послеоперационной раны. Клинически была заподоз­рена газовая гангрена. При микроскопии раневого экссудата об­наружены крупные грамположительные палочки с закругленными концами. С учетом быстрого прогрессирования анаэробной ин­фекции была проведена экспресс-диагностика для обнаружения экзотоксинов в крови больного. Для этого поставлена РПГА. Изу­чите микропрепарат из раневого отделяемого. Учтите результат РПГА, дайте диагностическую оценку.

**Методика.** Жидкие эритроцитарные антительные диагностикумы представляют собой 1% взвесь формалинизированных и сенсибилизированных антитоксинами эритроцитов барана. В полистероловых пластинах готовят двукратные разведения исследуемой сыворотки в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия в объеме 0,5 мл. В каждую из лунок с разведениями сыворотки прибавляют 0,25 мл антительного диагностикума т.е. эритроцитов с адсорбированными антитоксинами к экзотоксинам соответствующих видов возбудителей газовой гангрены. Обязательными контролями являются: 1. Контроль на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума. Для его постановки в лунки с 0,5 мл физраствора добавляют 0,25 мл диагностикума. 2. Контроль на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана. Для этого к 0,5 мл исследуемой сыворотки добавляют в разведении 1:100 взвесь несенсибилизированных формалинизированных эритроцитов барана. 3. Контроль с положительной сывороткой для РПГА. Реакция учитывается по наличию агглютинированных эритроцитов, покрывающих дно лунки в виде «зонтика». Отрицательный результат учитывается в случае оседания неагглютинированных эритроцитов в виде маленького «колечка» в центре лунки.

Протокол исследования:

Цель**:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микроскопический метод | | РПГА | | | | | | |
| Иссле-дуемый материал | Микроскопия исследуемого материала (рис.) | Диагностикумы антительные эритроцитарные | Разведение сыворотки больного | | | | | |
| цельная | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | К |
|  |  | perfringens |  |  |  |  |  |  |
| novуi |  |  |  |  |  |  |
| histolyticum |  |  |  |  |  |  |
| septicum |  |  |  |  |  |  |

Вывод**:** ответить на вопросы:

1. Подтверждается ли диагноз? Если да, то каким методом и почему?

2. Является ли данная инфекция моно- или полимикробной? Ответ объясните, используя данные микроскопии и РПГА.

3. Какими эксп­ресс-методами можно обнаружить экзотоксины в клини­ческом материале?

**РАБОТА 3**

**Цель:** Изучить препараты для специфической профилактики, терапии и диагностики анаэробных инфекций.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав | Показания к применению | Характер действия в организме | Единица измерения силы антитоксических сывороток |
|  |  |  |  |  |

Аннотация к препаратам по теме: «Микробиология анаэробных инфекций»

**I.** **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ**

**1.1.СЫВОРОТКИ**

Противостолбнячные, противоботулинические и противогангеноз**-** ные антитоксические сыворотки**.** Используются для диагностики заболевания с целью обнаружения экзотоксинов возбудителей в исследуемом материале в реакциях нейтрализации на мышах (биопроба).

**II. Лечебно-профилактические препараты**

**2.1. ВАКЦИНЫ**

Анатоксин столбнячный адсорбированный (АС-анатоксин)**.**

Приготовлен из экзотоксина путем обработки его формалином и высокой температурой. Очищен от балластных белков и сорбирован на гидроокиси алюминия. Используется для активной профилактики столбняка плановой, экстренной и по эпидпоказаниям.

Секста- (пента,-тетра,-три-) анатоксин**.** Смесь очищенных анатоксинов, адсорбированых на гидрокиси алюминия. Секстаанатоксин состоит из смеси анатоксинов клостридий ботулизма типов А, В, Е, столбняка, пефингенс типа А и эдематиенс. Пентаанатоксин включает в себя те же компоненты, кроме столбнячного анатоксина. Тетраанатоксин является смесью ботулинических анатоксинов типов А, В, Е и столбнячного анатоксина. Трианатоксин состоит из смеси адсорбированных ботулинических анатоксинов типов А, В, Е. Применяется для профилактики ботулизма, столбняка и газовой инфекции по эпидпоказаниям в возрасте от 16 до 60 лет. Длительность иммунитета – 5 лет.

**2.2. СЫВОРОТКИ, ИММУНОГЛОБУЛИНЫ**

Противостолбнячная лошадиная сыворотка (ПСС). Готовится из сыворотки лошадей, иммунизированных столбнячным анатоксином. Очищается и концентрируется. Действующим началом препарата является столбнячный антитоксин, способный нейтрализовать действие столбнячного токсина. Сила сыворотки измеряется в антитоксических единицах (АЕ). Применяется для экстренной профилактики и лечения столбняка (при отсутствии ПСЧИ).

Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный (ПСЧИ).

Содержит гамма-глобулиновую фракцию крови людей-доноров, ревакцинированных очищенным сорбированным столбнячным анатоксином. Назначение препарата – пассивная экстренная профилактики столбняка у непривитых детей и взрослых.

Сыворотки противоботулинические типов А, В, Е лошадиныеочищенные**.** Содержат белковую фракцию сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных ботулиническими анатоксинами или токсинами соответствующего типа. Очищены и концентрированы. Применяются для лечения и экстренной профилактики ботулизма. Для лечения заболеваний, вызванных неизвестным типом токсина (возбудителя) ботулизма, используется смесь моновалентных сывороток. При известном типе токсина (возбудителя) используют моновалентную сыворотку соответствующего типа.

Противогангренозная поливалентная лошадиная сыворотка**.** Содержит антитела против экзотоксинов трех основных возбудителей газовой инфекции (Cl.perfringens типа А, Cl. novyi (oedematiens), Cl. septicum). Получают из сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных соответствующими анатоксинами. Используют для экстренной профилактики и лечения газовой гангрены.

задания для самостоятельной работы во внеучебное время

В тетради для практических занятий перепишите задачи и решите их, отвечая на поставленные вопросы.

**Задача 1.**

В хирургическое отделение поступили больные А и Б с глубокими ранами нижних конечностей. Произведена первичная хирургическая обработка ран. У обоих больных при микроскопическом исследовании в содержимом ран обнаружены грамположительные палочки, похожие на клостридиум перфрингенс. Вскоре у больного А появились признаки газовой инфекции. Какой специфический препарат следует ввести больным? Будет ли разница в его дозировке? Почему?

**Задача 2.**

В инфекционную больницу поступила семья из трех человек. У больных отмечалось двоение в глазах, рвота, адинамия. Накануне заболевания они ели консервированные грибы. Было проведено лабораторное исследование, поставлен диагноз «Ботулизм». Какие методы лабораторной диагностики были использованы? Какой исследуемый материал был взят для лабораторной диагностики? Какова морфология возбудителей ботулизма? С чем связан патогенез ботулизма? Какие препараты можно использовать для специфической терапии ботулизма?

**Практическое занятие № 9.**

**2. Тема: Микробиология зоонозных инфекций (бруцеллез, туляремия, чума, сибирская язва).**

**3. Цель:** Определить особенности этиологии, эпидемиологии и патогенеза зоонозных инфекций. Овладеть методами бактериологической диагностики, специфической профилактики и терапии зоонозных инфекций.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Своеобразие резервуара и источников заражения при зоонозных инфекциях. Природно-очаговые заболевания.
2. Виды бруцелл и их патогенность.
3. Фазы патогенеза, принципы и методы лабораторной диагностики бруцеллеза.
4. Иммунитет и аллергия при бруцеллезе, реакция Бюрне.
5. Специфическая профилактика и лечение хронического бруцеллеза.
6. Патогенез и клинические формы туляремии.
7. Принципы и методы лабораторной диагностики туляремии.
8. Специфическая профилактика туляремии.
9. Клинические формы чумы. Принципы и методы лабораторной диагностики чумы. Специфическая профилактика и лечение чумы.
10. Особенности циркуляции палочки сибирской язвы в природе как спорообразующего микроба.
11. Патогенез сибирской язвы. Факторы патогенности возбудителя. Клинические формы.
12. Принципы и методы лабораторной диагностики сибирской язвы.
13. Специфическая профилактика и лечение сибирской язвы.

5. Основные понятия темы.

**Зоонозы** – группа инфекционных заболеваний человека, при которых источником и резервуаром инфекции являются инфицированные животные, преимущественно млекопитающие, и членистоногие.

Выделяют две группы зоонозов:

1. Передаваемые от домашних и синантропных животных (бруцеллез, сибирская язва, лептоспирозы и т.д.)
2. Передаваемые от диких животных –природно-очаговые зоонозы (чума, туляремия и т.д.)

Возбудителями зоонозных инфекций могут являться различные представители микроорганизмов – бактерии, простейшие, вирусы, грибы. Они способны поражать различные виды животных, что придает высокую стабильность природным очагам, которые практически невозможно уничтожить. У возбудителей зоонозов отсутствует органный тропизм, поэтому они могут поражать любые органы, ткани и передаваться различными механизмами и путями. Возбудители зоонозов по степени опасности относятся к 1-й и 2-й группам, поэтому микробиологическую диагностику проводят только в режимных лабораториях (особенно все исследования, связанные с чистыми культурами возбудителя).

**Чума**

Источником возбудителя чумы служат грызуны и зайцеобразные разных видов. Естественная зараженность чумой зарегистрирована почти у 250 видов животных. В каждом конкретном природном очаге существует характерный для данной территории паразитоценоз, включающий основных и второстепенных носителей (млекопитающих) и их эктопаразитов – переносчиков. Больной человек может быть источником инфекции при легочной форме чумы, при контакте с гнойным содержимым чумного бубона. Восприимчивость человека к чуме абсолютная во всех возрастных группах.

Предварительный диагноз чумы ставится путем микроскопии исследуемого материала (кровь, мокрота, отечная жидкость, пунктат бубонов) с последующей окраской микропрепарата по Граму или метиленовым синим. Обнаружение морфологически характерных овоидных биполярных палочек позволяет поставить предварительный диагноз. Окончательным подтверждением заболевания служит выделение и идентификация культуры возбудителя и постановка биологической пробы.

Экспрессная диагностика чумы. Для быстрого обнаружения чумного микроба в исследуемом материале от человека, животных или объектов внешней среды используется ПЦР (в том числе и для обнаружения некультивируемых форм), ИФА с моно- и поликлональными антителами, РПГА, РИФ, метод фаговой «дорожки» (внесение бактериофага в исследуемый материал в момент посева его на агар с генцианфиолетовым позволяет под микроскопом через 3-4 часа увидеть «стерильные пятна»).

**Бруцеллез**

Основными возбудителями бруцеллеза у человека являются следующие виды бруцелл: B.melitensis (3 биовара), B.abortus (9 биоваров), B.suis (4 биовара). Все бруцеллы являются мелкими грамотрицательными неподвижными палочками, спор и капсул не образуют. По типу дыхания относятся к микроаэрофилам.

Бруцеллы обладают выраженной инвазивной активностью и способностью к внутриклеточному паразитизму, что обуславливает патогенез заболевания. В развитии инфекционного процесса участвует гиалуронидаза, белок наружной мембраны и эндотоксин. Бруцеллы способны выживать и размножаться в фагоцитах за счет ингибирования слияния фагосом с лизосомами, подавления активности миелопероксидазы и продукции Н2О2. Это способствует диссеминации бактерий, длительной персистенции их в организме.

Заболевание характеризуется хроническим течением со сменой обострений и ремиссий, развитием гранулем в опорно-двигательной, нервной и моче-половой системах, сенсибилизацией организма с развитием ГЗТ.

Микробиологическая диагностика бруцеллеза проводится серологическим, бактериологическим, биологическим и аллергическим (проба Бюрне) методами исследования.

Выделение возбудителя и его идентификация является безусловным подтверждением диагноза. Следует учитывать, что при выделении от больного бруцеллы растут медленно, поэтому посевы в жидкой питательной среде следует выдерживать при 370 С в термостате и в атмосфере 5 % СО2 до 30 суток.

В связи со сложностью проведения и длительностью получения результатов основным методом диагностики при бруцеллезе является серологический.

Серологическая диагностика бруцеллеза осуществляется комплексом серологических реакций, который включает:

* 1. РА Хеддельсона (качественный метод)
  2. Развернутую РА Райта (диагностический титр 1:100)
  3. РПГА (диагностический титр 1:100)
  4. Реакцию Кумбса (для выявления неполных антител)
  5. ИФА (для выявления IgM – при остром бруцеллезе, и IgG – при подострой и хронической формах)
  6. Опсоно-фагоцитарную реакцию (ОФР)

Кожная аллергическая проба (реакция Бюрне).Сущность аллергической пробы заключается в способности зараженного бруцеллезом организма (а также вакцинированного против бруцеллеза) специфически отвечать местной реакцией (отек, краснота, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллина (фильтрат бульонной культуры бруцелл)). Эта реакция специфична, появляется у больных через 3-4 недели после начала заболевания и может сохраняться годами после исчезновения клинических симптомов.

Серологические реакции и кожная аллергическая реакция могут варьировать в своем проявлении на разных этапах развития бруцеллезной инфекции у человека. Кроме того, эти реакции могут быть положительными у лиц, вакцинированных против бруцеллеза. Поэтому диагностическая оценка серо-аллергических проб должна быть комплексной с учетом динамики нарастания титров агглютининов, данных клиники и эпидемиологии.

В настоящее время наиболее чувствительными и специфичными в диагностике бруцеллеза являются ПЦР (для обнаружения генома бруцелл в исследуемом материале), РПГА с использованием эритроцитарных диагностикумов с моноклональными антителами к антигенам бруцелл (для обнаружения свободно циркулирующих в крови или связанных с антителами бруцеллезных антигенов); ИФА, латекс-агглютинация для обнаружения антигенов бруцелл; ИФА для обнаружения противобруцеллезных IgM (острый бруцеллез) и IgG (хронический бруцеллез), реакция Кумбса (хронический бруцеллез).

**Туляремия**

Туляремия - зоонозная, природно-очаговая бактериальная острая инфекция с разнообразными механизмами передачи возбудителя. Возбудитель – Francisella tularensis, мелкие полиморфные коккоподобные палочки, неподвижные, образуют небольшую капсулу, факультативные анаэробы, на простых питательных средах не растут.

Основным методом лабораторной диагностики туляремии является серологический метод, а ранним методом диагностики - аллергический метод, так как аллергическая проба с тулярином становится положительной с 3-5-го дня заболевания. Выделить чистую культуру посевом исследуемого материала на питательные среды не удается, поэтому для выделения чистой культуры используют биологический метод на белых мышах или морских свинках.

**Сибирская язва**

Возбудитель – Bacillus anthracis, грамположительная, крупная (6-10 мкм), неподвижная палочка, образует споры, расположенные центрально. В организме человека и животных, на питательных средах с кровью или сывороткой образует капсулу. В мазке из чистой культуры бациллы располагаются короткими цепочками (стрептобациллы). Сибиреязвенные бациллы имеют видовой капсульный и групповой соматический антигены. Термоустойчивость соматического антигена используется в реакции термопреципитации по Асколи для обнаружения сибиреязвенных антигенов в различных материалах (трупы, кожа, шерсть животных). При этом искомый антиген извлекают из исследуемого материала экстракцией при кипячении. В лабораторной диагностике используются экспрессные методы (РИФ, ИФА), бактериоскопический (обнаружение капсулы подтверждает диагноз), бактериологический и биологический методы, а также аллергическая проба с антраксином.

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Коготкова О.И. и др. Свойства живой сибиреязвенной антибиотикоустойчивой вакцины СТИ-ПР в процессе длительного хранения. Журн. Микробиол., 2007. - № 1. – С. 34-37.

2. Арутюнов Ю. И., Москвитина Э. А., Мишанькин Б. Н. Уроки эпиде-миии чумы в Индии. Эпидемиология и инфекционные болезни, 2004. № 6. С. 12-18.

3. Арутюнов Ю. И., Мишанькин Б. Н., Ломов Ю. М., Кокушкин А. М. Некоторые особенности эпидемических проявлений чумы. Эпидемиология и инфекционные болезни, 2005. № 1. С. 8-10.

4. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. М., 1984

5. Вертиев Ю.В. Бактериальные токсины: биологическая сущность и происхождение. Журн. микробиол. - 1996, № 3. – С.43-46

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Изучить особенности лабораторной диагностики бруцеллеза и диагностическую ценность разных методов диагностики.

**Задача.** Студентка сельскохозяйственного института возвратилась из района, неблагополучного по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных, где она проходила производственную практику. Обратилась к врачу с жалобами на лихорадку, боли в суставах, головные и мышечные боли. Учитывая эпиданамнез, была госпитализирована в инфекционную больницу с подозрением на бруцеллез. Было проведено комплексное бактериологическое, серологическое и аллергологическое исследование. Реакция Бюрне на 2-ой неделе заболевания оказалась сомнительной. Учтите результаты проведенных исследований. Поставьте реакцию Хеддельсона на стекле. Дайте диагностическую оценку полученных результатов. Оформите протокол исследования.

**Методика бактериологического метода**

Исследуемый материал (кровь в объеме 10 мл, суставная жидкость, костный мозг, коньюнктивальный секрет, моча и др.) засевают в 2-3 флакона с жидкой питательной средой (соевый бульон, бульон Мартена, эритрит-бульон, МПБ с 1 % глюкозы и глицерина). В одном из флаконов создают повышенную концентрацию СО2 -10 % (помещают в эксикатор со свечой для стимуляции роста B. abortus). Флаконы инкубируют в термостате при 370С в течение 30 дней и делают высевы на плотные среды (триптозный, 5 % кровяной, печеночный агар и др.). Колонии на плотной питательной среде имеют круглую форму, размеры от 1 до 5 мм в диаметре, серовато-белые в отраженном свете, блестящие и прозрачные – в проходящем, имеют янтарный оттенок.

Для дифференциации видов бруцелл используют показатели: способность некоторых биоваров вырабатывать сероводород (В. abortus), продукция уреазы и чувствительность к бактериостатическому действию красителей (основного фуксина и тионина).

**Методика реакции агглютинации Хеддельсона**

На обезжиренное стекло, расчерченное на 5 квадратов, микропипеткой наносят 4 дозы исследуемой неразведенной сыворотки в объеме 0,04; 0,02; 0,01; 0,02 мл. В первые три капли прибавляют неразведенный единый бруцеллезный диагностикум (убитые и окрашенные метиленовым синим бруцеллы) в количестве 0,03 мл. Четвертая капля – контроль, к ней добавляют 0,03 мл физиологического раствора. Второй контроль – контроль антигена (0,03 мл диагностикума с 0,03 мл физиологического раствора). Различные дозы сыворотки берут не для определения агглютинационного титра, а для создания и выявления наиболее оптимальных соотношений антител с антигеном. Затем осторожно сыворотку смешивают с диагностикумом стеклянной палочкой, начиная от минимальной дозы сыворотки к максимальной. В течение 2 минут стекло с ингредиентами осторожно подогревают над пламенем спиртовки на вытянутых руках. Учет реакции производят в течение 9 минут. В положительных случаях агглютинация отмечается в дозах сыворотки 0,02-0,01 мл. При сомнительном результате агглютинация появляется только в дозе 0,04 мл сыворотки. В этом случае реакцию повторяют через 7-10 дней. Реакция Хеддельсона может быть положительной с 1-ой недели острой формы бруцеллеза (на фоне бактериемии). Используется как качественный метод диагностики (скрининговый).

Реакцию Райта ставят по типу реакции Видаля в разведениях сыворотки от 1:50 до 1:800. В качестве антигена используют тот же единый бруцеллезный диагностикум, что и для реакции Хеддельсона, но предварительно разводят его стерильным физиологическим раствором в 10 раз по объему. Предварительный учет реакции производят после выдерживания пробирок при 370С 4-6 часов, окончательный учет – после дополнительного выдерживания при 370С или при комнатной температуре в течение 18-20 часов.

Диагностическим считают титр сыворотки в реакции агглютинации с единым бруцеллезным диагностикумом не менее чем 1:200.

При сомнительных результатах реакции Райта (титр агглютинации 1:50), при отрицательных результатах, не соответствующих клинико-эпидемиологическим данным, а также при предшествующей вакцинации больного против бруцеллеза реакцию Райта ставят повторно, с интервалом между взятием крови 7-10 дней. Положительным результатом считают нарастание титра антител. Следует помнить, что для реакции Райта характерны проагглютинационные зоны (отсутствие агглютинации в первых разведениях и четкая агглютинация в более высоких разведениях). Наибольшую диагностическую ценность реакция Райта имеет при острой форме бруцеллеза, так как со снижением антигенемии уровень антител снижается.

Протокол исследования

Цель**:**

**Бактериологический метод**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Материал от больного | Среда для посева | Идентификация чистой культуры | | | | Вид бруцелл |
| Морфология  (рис) | Рост на средах с | | Выделение сероводорода |
| фуксином | тионином |

**Серологический метод**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Материал от больного | Название реакции | Результаты реакции |

**Аллергический метод**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название реакции | Название диагностического препарата | Классификационная группа препаратов | Результат реакции |

Вывод**:** (ответить на вопросы: 1. Какой из используемых методов диагностики подтверждает диагноз бруцеллеза и почему? 2. Чем можно объяснить сомнительный результат аллергической пробы у обследуемого? 3. У каких групп лиц может быть положительная реакция Бюрне?).

**Работа 2**

**Цель:** Определить диагностическую ценность биологического метода при сибирской язве.

**Задача.** В клинику поступил больной с предварительным диагнозом «Сибирская язва, кожная форма». В отделяемом карбункула микроскопическим методом обнаружены грамположительные палочки, расположенные единично, попарно или короткими цепочками, напоминающими бамбуковую трость, капсулу обнаружить не удалось. На чашке с МПА при посеве отделяемого карбункула выросли колонии, край которых напоминает львиную гриву. Для подтверждения диагноза была поставлена биологическая проба. Учтите результаты биологической пробы, изучив микропрепарат из ткани погибшего лабораторного животного. Оформите протокол.

**Методика.** Исследуемый материал вводится подкожно белым мышам или морским свинкам. При наличии в исследуемом материале B. anthracis животные погибают на 2-4 сутки при явлениях сепсиса (во внутренних органах отмечается гиперемия). В месте введения материала обнаруживается студенистый отек (инфильтрат). Из внутренних органов готовят мазки-отпечатки, делают посевы. В мазках-отпечатках обнаруживаются короткие цепочки из палочек, окруженных капсулой.

Протокол исследования:

Цель**:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Материал от больного | Метод диагностики | Объект для оценки результатов исследования | Результат микроскопиии препарата(рис.) | Обнаруженный фактор вирулентности |

Вывод:(ответить на вопросы: 1. Подтверждается ли диагноз сибирской язвы? Если да, то каким методом и почему? 2. С каким микробом-двойником следует дифференцировать возбудителя сибирской язвы?).

**Работа 3**

**Цель:** Определить морфологические особенности Y. pestis.

Провести микроскопию демонстрационного микропрепарата «Палочка чумы в органе» и зарисовать его в тетради.

ПИСЬМЕННОЕ ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

1. В тетради для практических занятий решить задачу.

Задача.

В населенном пункте, неблагополучном по бруцеллезу у овец, в семье, состоящей из 4-х человек, заболела дочь – студентка во время зимних каникул острым заболеванием с высокой температурой, предполагаемый диагноз «Бруцеллез». Проведено лабораторное обследование на бруцеллез всех членов семьи, результаты которого представлены в таблице.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | | Отец | Мать | Дочь | Сын | Какие методы  диагностики  были использованы? |
| Виды исследований | | Выделение гемокультуры | - | - | + | + |  |
| Реакция Райта | - | 1:100 | - | 1:400 |  |
| Реакция Бюрне | + | + | - | + |  |
| Вопросы | | Кто болен острой формой бруцеллеза? |  |  |  |  |  |
| У кого скрытая форма инфекции или бруцеллез в прошлом? |  |  |  |  |  |
| У кого бессимптомная форма болезни? |  |  |  |  |  |

2. Выписать специфические препараты для профилактики, лечения и диагностики бруцеллеза, чумы, туляремии и сибирской язвы (Практикум под ред. О.В. Бухарина – Задание 4, с. 204).

**Практическое занятие № 10**

**2. Тема: Рубежный контроль «Частная бактериология».**

**3. Цель**: Осуществление контроля знаний по разделу модуля 3. «Частная бактериология».

**4. Вопросы для подготовки.**

1. Стафилококки. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики. Специфическая профилактика и терапия.
2. Стрептококки. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики стрептококковых заболеваний.
3. Характеристика возбудителя гонореи. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии.
4. Характеристика возбудителя менингококковой инфекции. Принципы лабораторной диагностики менингококкового менингита.
5. Эшерихии. Характеристика. Роль кишечной палочки в норме и при патологии. Лабораторная диагностика эшерихиозов.
6. Шигеллы- возбудители дизентерии. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
7. Характеристика возбудителей брюшного тифа и паратифов. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
8. Сальмонеллы – возбудители пищевых токсикоинфекций. Таксономия. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики.
9. Характеристика возбудителей холеры. Биовары холерного вибриона. Принципы лабораторной диагностики. Специфическая терапия и профилактика.
10. Возбудитель ботулизма. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
11. Возбудитель столбняка. Характеристика. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
12. Характеристика возбудителей газовой инфекции. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактки.
13. Характеристика возбудителей бруцеллеза. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
14. Характеристика возбудителя чумы. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
15. Характеристика возбудителя сибирской язвы. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
16. Характеристика возбудителя дифтерии. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической профилактики и лечения.
17. Характеристика возбудителей туберкулеза. Принципы микробиологической диагностики. Туберкулин и его использование. Препараты для специфической профилактики.
18. Риккетсии – возбудители эпидемического сыпного тифа. Болезнь Брилля-Цинссера. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической профилактики.
19. Характеристика возбудителя сифилиса. Принципы лабораторной диагностики сифилиса. Препараты для лечения сифилиса.
20. Дисбиозы. Микробиологическая диагностика. Препараты, применяемые для коррекции микрофлоры.
21. Условно-патогенные энтеробактерии (протеи, клебсиеллы, иерсинии, псевдомонады). Характеристика. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии.
    1. **Макропрепараты:**

- Специфические диагностические препараты

- Специфические лечебно-профилактические препараты.

**Модуль 4. Вирусология**

1. Формируемые компетенции:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Шифр  компетенции | №  компетенции | Элементы компетенции |
| ОК | ОК-1 | - способность и готовность анализировать социально значимые проблемы и процессы, использовать на практике методы гуманитарных, естественнонаучных, медико-биологических и клинических наук в различных видах профессиональной и социальной деятельности **(ОК-1);** |
| ПК | ПК-3 | способность и готовность принимать участие в организации производственной деятельности фармацевтических предприятий и организаций по изготовлению и производству лекарственных средств **(ПК-3);** |
| ПК-4 | способность и готовность к производству лекарственных средств в условиях фармацевтических предприятий и организаций, включая выбор технологического процесса, необходимого технологического оборудования, с соблюдением требований международных стандартов **(ПК-4);** |

Практическое занятие № 1.

**2. Тема: Общая вирусология**.

**3. Цель:** Определить особенности морфобиологии вирусов и основные закономернорсти вирусных инфекций. Овладеть основными методами лабораторной диагностики вирусных инфекций.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Морфология и физиология вирусов.

2. Особенности патогенеза вирусных инфекций и механизмы противовирусного иммунитета.

3. Практическое использование системы «антиген-антитело» в вирусологии:

а) для диагностики (реакции нейтрализации: реакция задержки гемагглютинации, реакция задержки ЦПД; иммуноферментный анализ, иммунноблот и др.);

б) для специфической профилактики и терапии (вакцины и сыворотки при вирусных инфекциях).

4. Натуральная оспа. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая профилактика и терапия.

**5. Основные понятия темы:**

Заболевания, вызываемые вирусами, составляют более 80% всех инфекционных болезней человека. Вирусы являются строгими внутриклеточными паразитами, а уровень паразитизма определяется полным отсутствием систем, ответственных за процессы питания и дыхания. Паразитизм на генетическом уровне определяет своеобразие течения инфекционного процесса. Уникальные биологические свойства вирусов: доклеточный уровень организации, наличие только одной нуклеиновой кислоты, сложные типы симметрии, определяемые взаиморасположением капсомеров, способность к кристаллизации, дисъюнктивный способ размножения, отсутствие систем метаболизма обусловливают не только особенности течения инфекционного процесса, но и отличительные черты механизмов противовирусной защиты, создавая определенные проблемы в разработке вопросов иммуно-профилактики и специфической терапии вирусных инфекций.

В лабораторной диагностике вирусных инфекций на первый план выступает обнаружение возбудителя и выделение его из организма больного. Поиск и обнаружение специфических изменений в организме под воздействием вируса имеет значение больше для постановки диагноза ретроспективно.

Вирусоскопическое исследование имеет ограниченное применение в связи с тем, что размеры большинства вирусов лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа и могут быть исследованы с помощью электронной микроскопии, иммунной электронной микроскопии.

Вирусологическое исследование состоит из 2-х этапов:

1. Выделение вируса.
2. Идентификация вируса.

Общим принципиальным положением при выделении вирусов является их культивирование в живой клетке (культура ткани, куриный эмбрион, организм животного). В основе идентификации вирусов лежит принцип нейтрализации, т.е. взаимодействие вируса со специфической иммунной сывороткой, в результате которого вирус утрачивает способность проявлять свою активность в действии на субстрат (клетки культуры ткани, эритроциты, куриный эмбрион и т.п.).

Поскольку микроскопический метод имеет при вирусных инфекциях ограниченное применение, а вирусологический достаточно сложен и продолжителен, в последнее время все более широкое применение находят экспресс-методы, направленные на обнаружение вирионов, их отдельных антигенов или фрагментов нуклеиновых кислот в исследуемом материале (РПГА, ИФА, РИФ, иммунный блот, молекулярная гибридизация и др.).

В процессе работы необходимо усвоить, что реакции, которые используются для идентификации вирусов, могут быть использованы и для серологической диагностики заболевания. При этом от больного получают сыворотку, в которой осуществляют поиск антител с помощью специфических вирусных диагностикумов. Поскольку накопление антител при вирусных инфекциях происходит значительно медленнее, чем при бактериальных, а титр их, как правило, не достигает высоких цифр, для подтверждения диагноза необходимо определять антитела в динамике, в так называемых парных сыворотках, т.е. сыворотках, взятых от больного дважды, через определенный интервал. Считается, что результаты подтверждают диагноз, если выявлено нарастание титра антител не менее чем в 4 раза. Обнаружение специфических антител возможно также с использованием современных методов: ИФА, радиоиммунного метода, встречного иммуноэлектрофореза и др.

Основные понятия темы: Морфология и физиология вирусов, особенности патогенеза вирусных инфекций и механизмы противовирусного иммунитета, практическое использование системы «антиген-антитело» в вирусологии, специфическая профилактика и терапия (вакцины и сыворотки при вирусных инфекциях)

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. Нижний Новгород, 1999. (Очерки патогенетической микробиологии).
2. .Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. М.: Вузовская книги, 2000. – 376с.
3. Носик Н.Н., Стаханова В.М. Лабораторная диагностика вирусных инфекций //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000, № 2.- С.70-77.
4. Воробьев А.В., Подкуйко В.Н., Максимов В.А. Пероральная вакцинация против оспы (к вопросу о возврате оспопрививания) //Вестник Рос.акад.мед.наук. 2003, № 1. – С.5-9.
5. Маренникова С.С. и соавт. Вакцинация против оспы сегодня и в свете прошлых лет //Журн.микробиол., 2003, № 6. – С.73-80.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть вирусологической диагностикой инфекционного заболевания.

**Задача.** В инфекционной клинике находится больной с предварительным диагнозом «Натуральная оспа». Содержимым пустул больного произведено заражение куриного эмбриона. Эмбрион погиб. После вскрытия необходимо исследовать материал из зараженного куриного эмбриона на наличие вируса путем постановки реакции гемагглютинации, а также идентифицировать его в реакции задержки гемагглютинации.

**Методика работы.**

**Методика 1.** Культивирование вируса в курином эмбрионе (возраст 10-12 дней). Тупой конец куриного яйца (над воздушным мешком) протирают слабым раствором йода, после чего в скорлупе делают отверстие острым зондом. Затем с помощью туберкулинового шприца осуществляют заражение эмбриона. После извлечения иглы место отверстия протирают йодом и запечатывают расплавленным парафином (Рис.6.1.2.). Зараженные эмбрионы инкубируют при 370 С в течение 48-72 часов. Затем их вскрывают и хорионаллантоисная оболочка исследуется с целью обнаружения макроскопических изменений в форме белых резко ограниченных точечных образований. Для обнаружения вируса в курином эмбрионе используют реакцию гемагглютинации (рис. 6.1.3.), а для идентификации – реакцию задержки гемагглютинации.

**Методика 2.**Реакция гемагглютинации для обнаружения вируса.

1. Ставится на стекле, стерильной пипеткой вносят ингредиенты по схеме:

Схема опыта

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ингредиенты | Опыт | Контроль |
| Хорионаллантоисная жидкость, содержащая вирус | 1 капля | - |
| Эритроциты | 1 капля | 1 капля |
| Физиологический раствор | - | 1 капля |

После обнаружения вируса осуществляют его идентификацию.

**Методика 3.**Идентификация вируса в реакции задержки гемагглютинации

1. Ставится на стекле, стерильной пипеткой вносят ингредиенты по схеме:

Схема опыта

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ингредиенты | Опыт | Контроль |
| Вирус, содержащийся в хорионаллантоисной жидкости | 2 капля | 2 капли |
| Специфическая иммунная сыворотка | 2 капли | - |
| Эритроциты | 2 капля | 2 капля |
| Физиологический раствор | - | 2 капля |

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Объект заражения | Результат экспериментальной инфекции | | | | |
| Состояние эмбриона | Результат РГА | Результат реакции задержки гемагглютинации | | |
| опыт | контроль | опыт | Контроль | |
| Сыворотка оспенная | Физ.раствор | |

Вывод: (объясните и зарисуйте схематически механизм РГА и РЗГА). Можно ли на основании проведенного исследования поставить диагноз?

**Работа 2**

**Цель:** Овладеть методикой серологического исследования при вирусных инфекциях.

**Задача.** С целью выявления наличия противокоревого иммунитета среди детей школьного возраста было проведено обследование по выявлению антител в сыворотке крови. Учтите результаты обследования детей с помощью реакции задержки гемагглютинации с диагностикумом вируса кори, сделайте вывод.

**Методика работы.**

Схема постановки реакции задержки гемагглютинации для обнаружения в сыворотке обследуемого вируснейтрализующих антител.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | | 2 | | | 3 | 4 | | | 5К | | | |
| Физиологический раствор | 0,25 | | 0,25 | | | 0,25 | 0,25 | | | 0,25 | | | |
| Сыворотка больного 1/20 |  | | 0,25 | | | 0,25 | 0,25 | | | 0,25 | | | |
| Вирусный диагностикум | 0,25 | | 0,25 | | | 0,25 | 0,25 | | | 0,25 | | | |
| Термостат – 30 минут | | | | | | | | | | | | | |
| Эритроциты | 0,5 | | 0,5 | | 0,5 | | | 0,5 | | | 0,5 | | |
| При комнатной температуре – 30 минут | | | | | | | | | | | |
| Разведение сыворотки | 1:40 | 1:80 | | 1:160 | | | | | 1:320 | | | | - |

Результат отмечается знаком «+» – при задержке гемагглютинации и знаком «-» - при агглютинации эритроцитов.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Разведение сыворотки | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | К |
| Ребенок А.  Ребенок Б. | | | | | |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Можно ли по результатам обследования сделать заключение о наличии противокоревого иммунитета у детей? 2. У кого из детей иммунитет более напряженный?).

**Работа 3**

**Цель:** Изучить препараты для специфической диагностики, лечения и профилактики вирусных инфекций.

**Методика работы.**

Изучите аннотации, рассмотрите препараты, заполните протоколы.

**Протокол № 1.**

Препараты для специфической профилактики и

терапии вирусных инфекций

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав препарата | Показания к применению | Какой вид иммунитета (по происхождению) создается в организме |

**Протокол № 2**

Препараты для лабораторной диагностики вирусных инфекций

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Состав препарата | Показания к применению | В каком методе лабораторного исследования используется и на каком этапе |

А н н о т а ц и и

к диагностическим и лечебно-профилактическим препаратам

**I. Диагностические препараты**

Противооспенная сыворотка – содержит антитела к вирусу натуральной оспы, используется для идентификации вируса в реакциях нейтрализации.

Оспенный диагностикум – содержит антигены вируса натуральной оспы, используется в серологическом методе диагностики.

**II. Лечебно-профилактические препараты**

Сухая оспенная вакцина – содержит очищенный, высущенный живой вирус вакцины. Применяется для профилактики натуральной оспы. С 1982 года обязательная вакцинация не проводится.

Противооспенный донорский иммуноглобулин – содержит антитела, полученные из крови донора, взятой через 3-6 недель после ревакцинации оспенной вакциной. Иммуноглобулин вводят лицам, находящимся в контакте с больными натуральной оспой, а также применяют для лечения и профилактики поствакцинальных осложнений.

ПИСЬМЕННОЕ ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

Зарисуйте в тетради схематическое изображение простого и сложного вирусов, обозначьте в рисунках структурные компоненты.

**Практическое занятие № 2.**

2**. Тема: Микробиология респираторных вирусных инфекций.**

3. Цель: Овладеть основными методами лабораторной диагностики респираторных вирусных инфекций и научиться практически решать вопросы специфической профилактики и терапии ОРВИ

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Грипп. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.

2. Аденовирусные инфекции. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.

3. Риновирусные инфекции. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.

4. Ветряная оспа, опоясывающий герпес. Этиология, Эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.

1. **Основные понятия темы:**

В лабораторной диагностике респираторных вирусных инфекций используются два принципа: а) обнаружение возбудителя; б) выявление специфических изменений в сыворотке крови больного.

Методы лабораторной диагностики этих инфекций можно условно разделить на ранние и ретроспективные.

Первые включают методы выделения и идентификации вирусов, т.е. вирусологическое исследование. Ретроспективная диагностика включает различные методы выявления специфических изменений в сыворотке крови переболевших. При этом следует учитывать необходимость установления нарастания титра антител не менее чем в 4 раза, которое выявляется у больных в парных сыворотках, т.е. сыворотках, взятых в начале и конце заболевания.

Сложность диагностики, как в процессе идентификации возбудителя, так и при выявлении антител определяется многообразием антигенной структуры возбудителей.

**Морфофизиологические особенности и таксономия вирусов, вызывающих ОРВИ.** При разборе вопроса остановиться на многообразии вирусов, вызывающих острые респираторные инфекции.

**- Грипп. Этиология, эпидемиология, патогенез.**

Обратить внимание студентов на значение различных серологических вариантов в возникновении эпидемии гриппа. Установить роль иммунитета коллектива, как одного из факторов, способствующих появлению новых вариантов. Разобрать понятия: «антигенный шифт» и «антигенный дрейф». Используется таблица «Антигенное строение вируса гриппа».

**- Грипп. Лабораторная диагностика, профилактика и терапия.**

При разборе вопроса используются таблицы «Лабораторная диагностика гриппа» и «Использование системы антиген-антитело в вирусологических исследованиях». Обращается внимание, что в лабораторной диагностике респираторных вирусных инфекций используются два принципа: а) обнаружение возбудителя – основной принцип; б) выявления специфических изменений в сыворотке крови больного (имеет ретроспективное значение). Отметить, что лабораторные исследования при гриппе используют в настоящее время, в основном, для решения вопросов эпидемиологии. Необходимо также указать на сложности специфической профилактики, связанные с изменениями антигенной структуры гриппа. Подчеркнуть важность разработки направления неспецифической стимуляции защитных сил организма в предэпидемический и эпидемический периоды.

**- Арбовирусные инфекции (определение понятия, классификация).**

При разборе данного вопроса, дается определение «Арбовирусные инфекции» и приводятся примеры наиболее опасных и социально значимых в нашей стране арбовирусных инфекций.

**- Клещевой и японский энцефалиты. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.** При анализе данного материала более подробно обращается внимание студентов на клещевой энцефалит, как на заболевание, достаточно часто встречающееся на территории России, при этом необходимо подробно остановиться на диагностике, специфической профилактике и терапии данной инфекции.

**- Геморрагические лихорадки: омская, крымская, желтая, ГЛПС. Этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика и терапия.** При разборе данного вопроса, можно выборочно дать студентам микрорефераты по лабораторной диагностике и специфической профилактике геморрагической лихорадки с почечным синдромом (время сообщения до 3 минут). Отметить, что в Оренбургской области отмечается значительный рост ГЛПС, особенно в районах вблизи поймы рек. Определяется заболевание через рыжих полевок, обитающих в этих местах

Основные понятия темы: Морфология и физиология респираторных вирусов, особенности патогенеза ОРВИ инфекций и механизмы противовирусного иммунитета, практическое использование системы «антиген-антитело» в диагностики ОРВИ, специфическая профилактика и терапия (вакцины и сыворотки при респираторных вирусных инфекциях)

**6. Рекомендуемая литература:**

1. Грипп /Под редакцией Карнухина Г.И. – СПб., 2001.
2. - Атипичная пневмония – новая патология ХХI века //Рос.мед.журнал, 2003, № 5. – С.50-56.
3. Ершов Ф.И. Использование иммуномодуляторов при вирусных инфекциях //Антибиотики и химиотерапия, 2003, № 6. - С.27-32.
4. - Лобзин Ю.В., Львов Н.И. Индукторы интерферона в терапии острых респираторных заболеваний: проблемы и перспективы //Военно-медицинский журнал, 2001, № 11. – С.41-42.
5. Онищенко Г.Г., Нетесов С.В., Агафонов А.П., Сафатов А.С., Буряк Г.А., Генералов В.М., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. Высокопатогенный птичий грипп: угроза новой пандемии и возможности ей противостоять //Вестник Российской АМН, 2006, № 12. – С.36-41.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Освоить серологический метод диагностики гриппа.

**Задача.** В диагностическое отделение инфекционной больницы поступили двое больных с предположительным диагнозом «Грипп». Для подтверждения диагноза врач рекомендовал изучить динамику титра антител к гриппозному диагностикуму. В лаборатории использовали РЗГА. Оцените результаты, оформите протокол.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ф.И.О. | Дни иссле  дования | Разведение сыворотки | | | | | | |
| 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | К |

Больной А. 2 день

12 день

Больной Б. 2 день

12 день

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Правильно ли поступил врач? Почему? 2. У кого из больных подтвердился диагноз гриппа и почему? 3. Как объяснить стабильное количество антител у одного из больных в разные сроки исследования?).

**Работа 2**

**Цель:** Провести вирусологическое исследование при аденовирусных инфекциях.

**Задача.** В глазное отделение поступил больной с симптомами тяжелого кератоконъюнктивита. Было высказано предположение о вирусной природе заболевания, в частности возможности аденовирусной или герпетической инфекции. Отделяемое конъюнктивы было отправлено в вирусологическую лабораторию для выделения и идентификации вируса в культуре клеток. Учтите результаты, сделайте выводы, оформите протокол.

**Методика работы:** См. занятие № 1, методика к работе № 1.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Выделение вируса | Идентификация вируса | |
| Исследуемый материал +  культура клеток | Выделенный вирус + сыворотка к аденовирусу + культура клеток | Исследуемый вирус +  сыворотка к вирусу  герпеса +культура клеток |
| Рис. | Рис. | Рис. |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какой принцип лежит в основе идентификации вируса? 2. Какова этиология заболевания у данного больного? Почему?).

**Работа 3**

**Цель:** Изучить препараты для специфической профилактики и диагностики респираторных вирусных инфекций.

**Методика.**

Изучите аннотации к препаратам, рассмотрите препараты, определите отличия специфических профилактических и диагностических препаратов. Запишите в форме протокола.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название  препарата | Состав  препарата | Показание к  применению | В каком методе ла- бораторного иссле- дования использует- ся и на каком этапе | Какой вид имму-  нитета (по про-  исхождению) соз-  дается в организме |
|  |  |  |  |  |

А Н Н О Т А Ц И И

к диагностическим и лечебно-профилактическим препаратам

**I. Диагностические препараты**

Типоспецифические гирппозные сыворотки А, А1, А2, В, С – применяются для типирования вирусов гриппа по антигенной структуре в РПГА и РСК.

Типоспецифические риновирусные сыворотки – применяются для типирования риновирусов по антигенной структуре.

Типоспецифические аденовирусные сыворотки – применяются для типирования аденовирусов по антигенной структуре.

Сыворотка против вируса ветряной оспы – содержит антитела к вирусу ветряной оспы, используется для идентификации вируса в реакциях нейтрализации.

Сухие типоспецифические диагностикумы: гриппозный, парагриппозный – содержат вирусы гриппа различных типов и парагриппа. Применяются для серологической диагностики соответствующих инфекций.

Сухие диагностикумы: риновирусный, аденовирусный – содержат антигены различных серотипов рино- и аденовирусов. Применяются для выявления антител при серологической диагностике соответствующих инфекций.

**II. Лечебно-профилактические препараты**

Сухая живая гриппозная вакцина - содержит живые вирионы вакцинного штамма вируса гриппа. Применяется для профилактики гриппа в период повышенной заболеваемости. Вводится в жидком виде однократно с помощью пульверизатора или закапывается в нос.

Инактивированная гриппозная вакцина – содержит убитые вирионы вакцинного штамма вируса гриппа. Применяется для создания активного иммунитета по эпидемическим показаниям. Вводится интраназально.

Химическая гриппозная вакцина – содержит антигены вируса гриппа, обладающие иммуногенными свойствами. Применяется для профилактики по эпидемическим показаниям. Вводится на слизистую носа.

Инактивированная аденовирусная вакцина – содержит убитые вирусы наиболее часто встречающихся серотипов (3, 4, 7). Применяется для профилактики заболевания по эпидемическим показаниям.

Сухая вакцина против вируса ветряной оспы – содержит живой, ослабленный вирус, применяется для создания активного иммунитета по эпидемическим показаниям.

Живая коревая вакцина – содержит аттенуированный вирус кори – штамм Ленинград-16 (Л-16). Прививаются все дети в возрасте с 10 месяцев до 8 лет.

Сухая вакцина против герпеса – содержит инактивированный вирус, многократное введение вакцины уменьшает частоту возникновения рецидивов.

Противогриппозный гамма-глобулин – содержит в высоком титре антитела против вирусов гриппа типов А2 и В. Готовится из сыворотки венозной крови людей-доноров, многократно иммунизированных живой гриппозной вакциной типов А2 и В. Применяется для лечения тяжелых форм гриппа, а также для экстренной профилактики.

Иммуноглобулин для серопрофилактики кори – препарат, полученный из крови человека (донорской, плацентарной, абортивной) путем фракционирования. Содержит антитела различной специфичности, в том числе к вирусу кори, возникающие в результате заболевания корью в детском возрасте.

Иммуноглобулин для серопрофилактики ветряной оспы – препарат получен из крови реконвалесцентов. Рекомендуется применение в очагах инфекции. Создает пассивный иммунитет.

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

1. Нарисуйте в виде схемы структуру вируса гриппа.

2. Нарисуйте в виде схемы механизм действия противогриппозного гамма-глобулина.

**Практическое занятие №3.**

**2. Тема: Микробиология энтеровирусных инфекций и вирусных гепатитов.**

**3. Цель:** Выяснить морфологические особенности возбудителей энтеровирусных инфекций. Овладеть основными методами лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. Научиться решать практические задачи по специфической профилактике и терапии кишечных вирусных инфекций.

**4. Вопросы для самоподготовки:**

1. Полиомиелит (морфология возбудителя, особенности эпидемиологии, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика).
2. Энтеровирусные инфекции Коксаки и ЕСНО (морфология возбудителя, особенности эпидемиологии, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика).
3. Парентеральные вирусные гепатиты В,С,Д: морфология возбудителя, особенности эпидемиологии, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика.
4. Энтеральные вирусные гепатиты А,Е - морфология возбудителя, особенности эпидемиологии, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика.

**5.Основные понятия темы**

Определение этиологической значимости данных вирусов затрудняется феноменом персистенции, свойственным отдельным вирусам этой группы. Энтеровирусы относятся к числу малопредсказуемых возбудителей, вирус одного и того же серотипа способен вызвать совершщенно разные клинические синдромы (от тяжелых паралитических заболеваний с высокой летальностью до легких лихорадочных состояний); может вызывать большие эпидемии и единичные заболевания. Напротив, энтеровирусы разных серотипов могут являться причиной одних и тех же синдромов клинических. Существование энтеровирусов десятков серотипов делает практически невозможным создание типоспецифических вакцин. Действие живых энтеровирусных вакцин основано на явлении интерференции вирусов в кишечнике человека, а не на индукции типоспецифического иммунитета.

Сложность лабораторной диагностики вирусных кишечных инфекций состоит в том, что в ряде случаев отсутствуют доступные практическим лабораториям методы выделения вирусов в чистой культуре; некоторые вирусы представлены многочисленными вариантами, дифференцируемыми по антигенной структуре и ряду других свойств, что требует длительного времени для идентификации. Лабораторная диагностика осуществляется в двух направлениях: а) поиск возбудителя (или его антигенов); б) поиск специфических реакций организма на возбудитель. В качестве особенности лабораторной диагностики следует подчеркнуть применение специальных методов исследования для поиска отдельных фракций вируса – антигенов и антител к ним.

Разработаны специфические **диагностические** препараты, к ним относят: **диагностикум полиомиелитный, диагностикумы Коксаки и ECHO и диагностикумы ротавирусные**. Данные препараты в составе содержат вирусные антигены для выявления антител у человека серологическим методом. **Типоспецифические полиомиелитные сыворотки I, II, III типов** содержат антитела против одного из указанных типов вирусов полиомиелита. Применяются для типирования вирусов полиомиелита.

**Лечебно-профилактические** препараты: **Полиомиелитная живая вакцина** содержит живой ослабленный вирус полиомиелита I, II, III типов. Применяется для создания активного иммунитета против полиомиелита. Выпускается в жидком виде для перорального применения. Вакцинация проводится всем детям в 3- месячном возрасте, ревакцинация – в 2-3 года, в 7-8 и 15-16 лет. **Иммуноглобулин нормальный человеческий** – препарат, полученный из крови человека (донорской, плацентарной, абортивной) путем фракционирования. Содержит антитела различной специфичностью против вирусов полиомиелита. Применяется для экстренной профилактики и лечения полиомиелита.

6. Рекомендуемая литература:

1. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. – Л., 1987.

2. Ющук Н.Д. Климова Е.А. Острые вирусные гепатиты //Русский медицинский журнал, 2000, № 8. – С.672-678.

3. Абдурахманов Д.Т. Клинико-биологическое значение мутаций генома вируса гепатита А //Клиническая медицина. 2001, № 12. – С.9-11.

4. Сейбиль В.Б., Малышкина Л.П. Энтеровирусы ХХ и ХХI века //Журнал микробиол., 2005, № 4. – С.83-89.

5.Шаханина И.Л., Осипова Л.А. Экономические потери от инфекционной заболеваемости в России: величины и тенденции //Эпидемиология и инфекционные болезни, 2005, № 4. – С.19-21.

6. Ткаченко В.К. и соавт. Результаты Российского многоцентрового исследований иммуногенности, реактогенности и безопасности новой комбинированной вакцины против гепатитов А и В (Твинрикс) //Журнал микробиол., 2006, № 6. – С. 30-35.

7. Профилактика инфекционных заболеваний. Кишечные инфекции. Метод.указ. МУ 3.1.1.2130-06 //Справочник заведующего КДЛ, 2007, № 6. – С.46-56 и № 7. – С.45-61.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Выделение и идентификация вируса полиомиелита.

**Задача.** В вирусологическую лабораторию поступил материал (испражнения) от больного К., 12 лет, с предположительным диагнозом «Полиомиелит». Для выделения чистой культуры вируса был произведен посев на культуру клеток в среде 199. После выделения чистой культуры была осуществлена идентификация вируса в реакции нейтрализации бляшкообразования, Оцените результаты, запишите протокол, сделайте выводы.

*Методики работы*

**Методика I. Выделение вируса (реакция бляшкообразования).**

В однослойную культуру клеток вносят исследуемый материал. Покачивая, равномерно распределяют материал по поверхности клеточного слоя и помещают в термостат при температуре 370С на 1,5 часа для адсорбции. Питательный покровный агар наносят на культуру клеток, находящихся в горизонтальном положении. Через 1 час после затвердения агара помещают в термостат при 36-370С. Учет производят со 2-4 дня по 7-10 день по образованию бляшек – участков разрушенных вирусом клеток (Рис. 6.3.4).

**Методика 2. Идентификация вируса в реакции подавления**

**бляшкообразования.**

1. Смешивают равные объемы разведения вируса и соответствующих разведений иммунной сыворотки.

2. Инкубируют смесь в течение 30 минут при комнатной температуре.

3. Смесь и контроль (вирус без сыворотки) вводят в однослойную культуру клеток, затем покрывают агаром (см.выше).

4. Учет производят по сравнению числа бляшек в опыте и контроле. Реакция считается положительной при снижении числа бляшек в опыте, по сравнению с контролем – принцип нейтрализации.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследу-  емый  материал | **Выделение**  Вируса | | **Идентификация вируса** | | | | | |
| Опыт | Контроль | Разведения  сыворотки  Иммунные  сыворотки к по-  лиовирусам типа: | 1/10 | 1/20 | 1/30 | 1/40 | **К** |
|  |  |  | **I**  II  III |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. По какому признаку обнаружен вирус в культуре ткани, какой серовар? 2. Ингредиенты и механизм реакции бляшкообразования? 3. Можно ли ставить диагноз «Полиомиелит» только по результату вирусологического исследования без соответствующей клиники).

**Работа 2**

Цель: **Определить антитела в сыворотке крови больного для диагностики**

энтеровирусной инфекции Коксаки, ЕСНО.

**Задача.** В лабораторию поступила сыворотка крови больного с подозрением на перенесенную энтеровирусную инфекцию. Для подтверждения диагноза была поставлена цветная проба с соответствующими диагностикумами. Оцените результат, запишите протокол, сделайте выводы.

**Методика работы. Постановка цветной пробы для определения антител в сыворотке крови больного.**

Биологической основой цветной пробы является способность вируса оказывать цитопатическое воздействие на клетки культуры ткани и тормозить их размножение. В результате этого исходный красный цвет жидкой среды, в которой выращиваются клетки, не изменяется. Если же вирус нейтрализуется антителами, клетки ткани размножают ся, и цвет среды изменяется в желтый.

Для обнаружения антител необходим следующий материал:

1. Культура клеток, пригодная для размножения вируса.

2. Вирус полиомиелита (диагностикум).

3.Сыворотка больного, в которой обнаруживаются антитела.

Вирус смешивается с сывороткой больного, взятой в различных разведениях, оставляется на один час при комнатной температуре и затем вносится в пробирки с культурой клеток. Учет результатов пробы производится через 4-9 дней. При наличии пробирок с желтой средой ставится знак «+» (реакция положительна), при наличии красной среды «-» - (реакция отрицательная).

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Разведения сыво-  ротки больного  Диаг-  ностикум | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | **К** |
| Диагностикум ЕСНО  Диагностикум Коксаки |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Объясните механизм изменения цвета среды. 2. Какой диагноз подтверждается и почему?).

**Работа 3**

**Цель:** Оценить результат лабораторной диагностики вирусного гепатита В.

**Задача.** В инфекционную больницу поступил мужчина 20 лет с температурой 380С, жалобами на боли в правом подреберье, иктеричностью склер. Больной является наркоманом, Возникло подозрение на гепатит В. Для подтверждения диагноза был проведен ИФА с целью обнаружения НВSAg и антител к НВСAg. Учтите результат реакции, оформите протокол, сделайте вывод.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Поиск: | Исследуемый  материал | Диагностический  препарат | Результат ИФА |
| НВSAg |  |  |  |
| Антител к НВСAg |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопрос: Подтверждается ли диагноз гепатита В у обследуемого? Почему?).

**Работа 4**

**Цель:** Изучить препараты для специфической диагностики и профилактики вирусных кишечных инфекций.

**Методика работы.** Изучите аннотации препаратов, рассмотрите препараты, сделайте соответствующие записи в протоколе.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название  препарата | Состав  препарата | Показание к  применению | В каком методе исследования и на каком этапе используется | Какой вид имму-  нитета(по проис-  хождению)созда-  ется в организме |
|  |  |  |  |  |

***А Н Н О Т А Ц И И***

**к диагностическим и лечебно-профилактическим препаратам**

**I. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ**

Диагностикум полиомиелитный – содержит вирусы-антигены для выявления антител в сыворотке крови больного.

Диагностикумы Коксаки и ЕСНО – содержит вирусы-антигены для серологического метода.

Диагностикумы ротавирусные – содержат вирусные антигены для выявления антител.

Диагностикумы гепатитов – содержат антигены вирусов гепатита А, Е, используются для определения антител к вирусам или их фрагментам.

Типоспецифические полиомиелитные сыворотки I, II, III типов – содержат антитела против одного из указанных типов вируса полиомиелита. Применяются для типирования вирусов полиомиелита.

Поливалентная и типоспецифические сыворотки Коксаки и ЕСНО – содержат антитела к различным антигенам вирусов. Применяются для типирования вирусов Коксаки и ЕСНО.

Сыворотки к вирусу гепатита А и Е – содержат антитела. Применяются для типирования соответствующих вирусов.

**II. Лечебно-профилактические препараты**

Полиомиелитная живая вакцина - содержит живой ослабленный вирус полиомиелита I, II, III типов. Применяется для создания активного иммунитета против полиомиелита. Выпускается в жидком виде для перорального применения. Вакцинация проводится всем детям в 2-месячном возрасте, ревакцинация – в 2-3 года, в 7-8 и 15-16 лет.

Вакцина против гепатита А культуральная инактивированная (ГЕП-А-ин-ВАК). Содержит суспензию убитых вирусов, предварительно выращенных в культуре клеток. Применяется для профилактики по эпидпоказаниям и у групп повышенного риска.

Иммуноглобулин нормальный человеческий – препарат, полученный из крови человека (донорской, плацентарной, абортивной) путем фракционирования. Содержит антитела различной специфичности против вирусов полиомиелита. Применяется для экстренной профилактики и лечения полиомиелита.

Иммуноглобулин человеческий против гепатита А – содержит антитела к вирусу гепатита А, получен из нормальной плазмы взрослых людей-доноров, создает пассивный иммунитет. Применяется для экстренной профилактики гепатита А.

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

1. Нарисуйте схему патогенеза полиомиелита.

2. Напишите ингредиенты цветной пробы для серологической диагностики полиомиелита.

**Практическое занятие № 4**

**2. Тема: Микробиология медленных вирусных инфекций. Рубежный контроль «Вирусология»**

3. Цель: - Овладеть основными методами лабораторной диагностики медленных вирусных инфекций: бешенства, ВИЧ-инфекции.

4. Вопросы для рассмотрения:

1.Определение понятия «Медленные инфекции».

2. ВИЧ-инфекция (морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).

3. Бешенство (морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, иммунитет, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).

4.1 Вопросы для подготовки к рубежному контролю.

1. Понятие о вирусе. Морфология и структура вириона. Типы взаимодействия вируса с клеткой. Фазы репродукции.
2. Культивирование вирусов.
3. Реакции нейтрализации вирусов: РЗГА, РЗЦПД и др. Механизм, практическое использование.
4. Характеристика вирусов гриппа. Принципы лабораторной диагностики. Профилактика и терапия гриппа.
5. Характеристика вирусов полиомиелита. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической терапии и профилактики.
6. Характеристика вирусов гепатитов А, Е. Принципы лабораторной диагностики. Специфическая профилактика.
7. Характеристика вирусов гепатитов В, С, Д. Принципы лабораторной диагностики. Специфическая профилактика.
8. Характеристика вируса бешенства. Принципы лабораторной диагностики. Препараты для специфической профилактики.
9. Характеристика возбудителя ВИЧ-инфекции. Принципы лабораторной диагностики. Принципы терапии.

**6. Основные понятия темы**

Медленные инфекции характеризуются длительным инкубационным периодом (месяцы, годы), длительным прогрессирующим развитием болезни и, как правило, заканчиваются смертью больного. Типичными примерами медленных инфекций являются ВИЧ-инфекция, прионные болезни (куру и др.), бешенство.

**ВИЧ-инфекция (морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).** При анализе данного вопроса обратить особое внимание на строение ВИЧ. Разобрать материал о действии вируса на клетки иммунной системы и механизмы, приводящие к иммунодефициту. При разборе лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции отметить, что применяются современные высокочувствительные методы: ИФА, радиоиммунный анализ, иммуноблоттинг, молекулярная гибридизация и др.. При этом выявляется не возбудитель, а определяется присутствие в организме вирусного антигена или фрагментов нуклеиновой кислоты вируса, а также антител к антигенам вируса. Отметить, что современные наборы реагентов ИФА позволяют одновременно в пробе крови определять и АГ, и АТ (скрининговое исследование), а далее определяют раздельными тест-системами ИФА наличие АГ или АТ в этих пробах. Используются таблицы: «Строение ВИЧ» и «Лабораторная диагностика СПИДа»

**Бешенство (морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).** Обратить внимание студентов на изменения, которые происходят в структуре природных резервуаров вируса бешенства, связанных с урбанизацией и экологией. Основным резервуаром в Европе являются лисы, реже – волки (в Оренбургской области отмечается таже закономерность). Указать, что диагностика бешенства осуществляется посмертно. Использовать материалы по истории получения антирабической вакцины (подчеркнуть заслуги Л. Пастера). При разборе данного вопроса использовать таблицу «Лабораторная диагностика бешенства».

Лабораторная диагностика медленных инфекций осуществляется в 2-х направлениях:

а) поиск возбудителя – специфических антигенов, нуклеиновых кислот;

б) выявление специфических антител к антигенам вируса.

При этом следует обратить внимание, что в отношении редко встречающихся медленных вирусных инфекций эти принципы не всегда приемлемы, т.к. микробиологическая диагностика не разработана и диагноз подтверждается на основании клинических и эпидемиологических данных.

Лабораторная диагностика бешенства осуществляется с применением классических методов: микроскопического (поиск телец Бабеша-Негри, рис. 6.5.4) и биологической пробы.

В лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции применяются современные высокочувствительные методы: иммуноферментный, радиоиммунный, иммунный БЛОТ, молекулярной гибридизации и другие. При этом возбудитель не выделяется, а определяется присутствие в организме вирусного антигена или фрагментов нуклеиновой кислоты вируса, а также антител к антигенам вируса. Диагностика проводится в несколько этапов с использованием различных тест-систем, характеризующихся разной степенью специфичности.

**7. Самостоятельная работа студентов к занятию.**

**Работа 1**

**Цель:** Овладеть методом оценки результатов серологической диагностики ВИЧ-инфекции (ИФА).

**Задача.** В иммунологическую лабораторию Центра по профилактике СПИДа обратились два человека с просьбой обследовать их на ВИЧ-инфекцию. Было проведено серологическое исследование путем постановки ИФА. Оцените результат исследования, оформите протокол и сделайте вывод.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Диагности-  кумы | С ы в о р о т к и | | | |
| Обследуемого  А. | Обследуемого  Б. | Положительная  контрольная | Отрицательная  контрольная |
| ВИЧ1  ВИЧ2 |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. У кого из обследуемых возникло подозрение на ВИЧ-инфекцию? Почему? 2. Какие дополнительные исследования нужно провести для подтверждения либо исключения ВИЧ-инфекции?).

**Работа 2**

**Цель:** Овладеть методом оценки результатов серологической диагностики ВИЧ-инфекции (иммунный блоттинг).

**Задача.** В результате скринингового исследования для выявления антител к ВИЧ в ИФА у обследуемых № 1, 2 была выявлена положительная реакция. Повторное исследование в реакции ИФА с тест-системами других производственных серий: «Пептоскрин» (на основе синтетических пептидов) «Рекомбинант» (на основе рекомбинантных пептидов) дало также положительные результаты. С целью окончательной постановки диагноза ВИЧ-инфицирования было проведено исследование методом иммунного блоттинга. Оцените результаты. Сделайте вывод.

**Методика 1. Определение антител к ВИЧ методом иммунного**

**Блоттинга.**

1. Стрип с нанесенными на него антигенами ВИЧ погружают в сыворотку обследуемого.

1. Промывают.

3. Обрабатывают антиглобулиновой сывороткой, меченной пероксидазой хрена.

4. Промывают.

5. Добавляют субстрат на фермент (перекись водорода).

6. Добавляют индикатор на атомарный кислород (хромоген).

7. Учитывают результат, сравнивая проявившиеся зоны окрашивания с контрольным стрипом.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Контрольный стрип А:  Белки вируса ВИЧ-1 | Рис. |
| Стрип 1 после инкубации  с сывороткой обследуемого № 1 | Рис. |
| Стрип 2 после инкубации  С сывороткой обследуемого № 2 | Рис. |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. У кого из обследованных подтвержден диагноз ВИЧ-инфекция? На основании каких данных?).

**Работа 3**

**Цель:** Оценить результат микроскопического метода диагностики бешенства и изучить препараты для профилактики бешенства.

**Задача.** На фельдшерский пункт обратился молодой человек по поводу рваной раны правой кисти. Рана была результатом тяжелых укусов, нанесенных собственной охотничьей собакой, которая погибла через 5 дней. Из мозга (аммонов рог) погибшей собаки был приготовлен препарат, окрашенный по Манну. Оцените результат исследования. Укажите, какие препараты можно использовать для профилактики бешенства у укушенного. Оформите протокол и сделайте вывод.

**Методика. Приготовление и окраска препарата из ткани**

**аммонова рога.**

1. Ткань аммонова рога вырезают примерно в размере до 2 мм и используют для приготовления препаратов-отпечатков.

2. Препараты фиксируют в растворе Ценкера с добавлением ледяной уксусной кислоты.

3. Окрашивают смесью эозина с метиленовым синим (или используют другие модификации).

4. Микроскопируют. Тельца Бабеша-Негри представляют четко очерченные сферические, овальные или продолговарые образования диаметром от 2 до 10 мкм, окрашенные в красный цвет. Располагаются внутри нервных клеток, цитоплазма которых и ядро окрашены в серо-голубой цвет

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

а) микроскопия препарата

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Материал для исследования | Метод исследования | Результат (рис.) |

**Работа 4**

**Цель:** Изучить препараты для специфической диагностики и профилактики медленных вирусных инфекций.

**Методика работы.** Изучите аннотации препаратов, рассмотрите препараты, сделайте соответствующие записи в протоколе.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название  препарата | Состав  препа-  рата | Показания  для  применения | В каком методе лабо-  раторного исследо-  вания используется  и на каком этапе | | Какой вид иммуни-  тета (по происхож- дению) создается в  организме | |
|  |  |  |  |  |  |  |

А Н Н О Т А Ц И И

специфических препаратов при ВИЧ-инфекции, бешенстве

**I. Лечебно-профилактические препараты**

Вакцина антирабическая культуральная инактивированная (РАБИВАК). Содержит вакцинный штамм вируса бешенства, инактивированный УФЛ. Применяется для экстренной профилактики лицам, инфицированным вирусом (укушенным и т.п.).

Антирабический гамма-глобулин – представляет собой гамма-глобулиновую фракцию сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных фиксированным вирусом бешенства. Применяется вместе с антирабической вакциной для профилактики бешенства у людей, получивших укусы животных средней тяжести и тяжелые.

1. **Диагностические препараты**

Антирабическая флюоресцирующая сыворотка – содержит антитела к вирусу бешенства, обработанные флюорохромом. Применяется для поиска возбудителя методом иммунной флюоресценции.

Тест-система для выявления антител к ВИЧ в ИФА. Содержит специфический антиген ВИЧ и дополнительные ингредиенты, необходимые для постановки ИФА. Используется на 1-ом этапе серологической диагностики ВИЧ-инфекции.

Тест-система для постановки иммуноблоттинга при диагностике ВИЧ-инфекции. Содержит комплекс разделенных методом электрофореза фракций (антигенов) ВИЧ: gр41, gр120, р24, р31 и др. Используется как подтверждающий тест на заключительном этапе серологической диагностики ВИЧ-инфекции.

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

1. Зарисуйте схему строения вируса иммунодефицита человека и схему патогенеза заболевания (механизм взаимодействия с клеткой).

2. Запишите этапы патогенеза бешенства и механизмы защитного действия вакцины.