**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВОХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии

**МОДУЛЬ 3**

**«ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ. ВИРУСОЛОГИЯ»**

методические рекомендации

для студентов 2-го курса факультета ВСО

Оренбург 2016

**Модуль №3 «Частная бактериология. Вирусология»**

**(8 практических занятий)**

**РАЗДЕЛ «ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ»**

**Практическое занятие №1.**

**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 (BacilleCalmette-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 бактерионосительствотоксигенной 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 возможныреконвалесцентноебактерионосительство 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 Mycobacteriumbovis. 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 анатоксинныйэритроцитарныйдиагностикум**

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.

**Практическое занятие 2.**

**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), стрептолизиныS 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 Enterococcusfaecalis 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 кровяномагаре, 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 бессывороточныйагар, 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 эритроцитарнымидиагностикумамисерогрупп 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-пептонногоагара 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-  лениеманнита | 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 стафилококковыйбактерионоситель 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.

**Стафилококковыйантифагин (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.

**Антистафилококковыйиммуноглобулин**

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.

**Практическое занятие № 3.**

**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 Vibriocholerae 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 природноочаговыйсапроноз, 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 неблагополучныйводоисточник (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. ГафиевX .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 кишечныхифекций.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель…

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

**Практическое занятие № 4.**

* 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-востьк 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 № 5.**

**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.**Жидкиеэритроцитарныеантительные 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 антительногодиагностикума 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-дуемыйматериал | Микроскопия исследуемого материала (рис.) | Диагностикумы антительныеэритроцитарные | 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.

**РАЗДЕЛ «ВИРУСОЛОГИЯ» (3 практических занятия)**

**ЗАНЯТИЕ 1. Тема: Общая вирусология. Респираторные вирусные инфекции**

ЦЕЛЬ:

1.Изучить морфофизиологические свойства вирусов.

1. Выяснить особенности патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях.
2. Изучить принципы лабораторной диагностики, профилактики и терапии вирусных инфекций.
3. Изучить морфо-физиологические свойства возбудителей гриппа, аденовирусных и риновирусных инфекций.
4. Изучить эпидемиологию, патогенез и иммунитет при респираторных вирусных инфекциях.
5. Овладеть основными методами лабораторной диагностики ОРВИ.
6. Научиться практически решать вопросы специфической профилактики и терапии респираторных вирусных инфекций.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА.

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.

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

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

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, иммунный БЛОТ и др.);

б) для специфической профилактики и терапии (вакцины и сыворотки при вирусных инфекциях).

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.

ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ:

1. Изучить схему-таблицу «Особенности взаимодействия вируса и клетки».
2. Изучить схему-таблицу «Механизмы противовирусного иммунитета».
3. Изучить схему-таблицу «Принципы практического использования системы антиген-антитело при диагностике вирусных инфекций».
4. Изучить таблицу «Методы культивирования вирусов» и «Методы заражения куриного эмбриона».
5. Решить практические задачи:

а) вирусологическая диагностика инфекционного заболевания. Воспроизведение экспериментальной инфекции на курином эмбрионе (Работа 1).

б) серологическая диагностика вирусных инфекций. Постановка и учет РЗГА (Работа 2).

в) изучить специфические препараты для лабораторной диагностики, лечения и профилактики вирусных инфекций (Работа 3).

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**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 |

**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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

Общая вирусология

**Морфология и физиология вирусов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Место вирусов в системе живых организмов  Уровень морфологической организации  Структурные компоненты вириона  Основная структурная особенность вирионов, отличающая их от всех остальных живых существ  Структура капсида  Группы вирусов по расположению капсомеров (типы симметрии)  Основные формы вирусов  Основные методы изучения морфологии вирусов  Возможные способы определения размеров вирусов  Биологическое свойство, сближающее вирусы с риккетсиями  Принципиальное отличие характера внутриклеточного паразитизма вирусов от риккетсий  Вирусы (за редким исключением) не видны в световом микроскопе, так как  Способ размножения вирусов  Ферменты, присущие отдельным вирусам (по функциональной активности)  Внутриклеточные включения при вирусных инфекциях  Роль нуклеиновых кислот вируса  Роль капсида и суперкапсида |  | Царство Vira  Доклеточная (молекулярная) форма жизни   1. ДНК или РНК 2. Капсид 3. Суперкапсид (у отдельных вирионов)   Наличие только одной нуклеиновой кислоты  Белковая оболочка, состоящая из повторяющихся белковых субъединиц – капсомеров   1. Спиральный 2. Кубический 3. Комбинированный 4. Сферическая 5. Палочковидная 6. Сперматозоидная 7. Кубоидальная 8. Электронная микроскопия 9. Рентгеноструктурный анализ 10. Фильтрование через мелкопористые фильтры 11. Ультрацентрифугирование 12. Фотографирование в электронном микроскопе   Облигатный внутриклеточный паразитизм  Генные паразиты  Размеры вирусов меньше разрешающей способности микроскопа  Дисъюнктивный (раздельный синтез нуклеиновой кислоты и капсида с последующей сборкой)   1. Способствующие проникновению в клетку (нейраминидаза, лизоцим) 2. Обратная транскриптаза 3. ДНК-полимераза 4. РНК-полимераза   Скопления вирусов, окруженные реактивными изменениями клетки   1. Носители наследственной информации 2. Инфекционность – обеспечение репродукции вирусных структур      1. Защитная 2. Антигенность 3. Формообразование |
| **Иммунитет при вирусных инфекциях** | | |
| Иммунитет при вирусных инфекциях (определение)  Механизмы защиты организма от вирусов  Специфические гуморальные механизмы нейтрализации вируса  Неспецифические гуморальные механизмы защиты от вируса  Неспецифические клеточные механизмы защиты при вирусных инфекциях  Свойства интерферона  Механизм действия интерферона  Патофизиологические механизмы защиты при вирусных инфекциях |  | Способ защиты генетического гомеостаза организма   1. Гуморальные 2. Клеточные 3. Патофизиологические 4. Иммуноглобулины G и М-сывороточные 5. Иммуноглобулины А-секреторные 6. Ингибиторы 7. Лизоцим, комплемент 8. Интерферон 9. Фагоцитоз инфицированных клеток 10. Резистентность клеток в связи с утратой рецепторов 11. Регенерация устойчивых к вирусам клонов клеток 12. Белок с молекулярной массой 30000 13. Неспецифичен по отношению к вирусам 14. Обладает тканевой, видовой специфичностью 15. Нарушение трансляции вирусной иРНК 16. Прекращение синтеза вирусного белка 17. Барьеры (кожа, слизистые) 18. Повышение температуры, ацидоз, гипоксия 19. Секреция и экскреция 20. Отторжение части цитоплазмы с вирусом   5. Внутриклеточные включения и их эвакуация |
| **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ** | | |
| В лабораторной диагностике вирусных инфекций реализуют принципы  Для культивирования вирусов используют  Вирулентный вирус в культуре клеток вызывает  Вирулентный вирус в курином эмбрионе вызывает  При введении экспериментальному животному вирус вызывает  В основе идентификации вируса лежит принцип  Вирус + специфическая иммунная сыворотка + культура клеток  Ингредиенты реакции задержки гемагглютинации для идентификации вируса  Ингредиенты цветной пробы для идентификации вирусов  Для выявления антител при вирусных инфекциях используют принцип  Ингредиенты реакции задержки гемагглютинации для обнаружения антител  Ингредиенты реакции нейтрализации на животном для поиска антител  Для экспресс-диагностики используют специальные реакции  Для поиска антител к отдельным белкам вируса используют специальную реакцию  Ингредиенты реакции иммунного блота для поиска антител  Ингредиенты иммуноферментного анализа для поиска антител  Для поиска нуклеиновой кислоты вируса в исследуемом материале используют |  | 1. Поиск антигена (возбудителя) 2. Поиск специфических изменений (антител) 3. Культуру клеток 4. Куриный эмбрион 5. Экспериментальное животное   Цитопатическое действие (ЦПД)  Гибель эмбриона   1. Развитие клинических симптомов 2. Гибель животного   Нейтрализации вируса специфической иммунной диагностической сывороткой  Задержка цитопатического действия   1. Исследуемый вирус 2. Специфическая иммунная сыворотка 3. Эритроциты 4. Вирус (исследуемый) 5. Иммунная сыворотка 6. Культура клеток в среде 199   Нейтрализации (связывание антителами антигенов вируса)   1. Исследуемая сыворотка 2. Вирусный диагностикум 3. Эритроциты 4. Сыворотка больного 5. Вирусный диагностикум 6. Экспериментальное животное 7. Иммунно-ферментные анализ 8. Радиоиммунный анализ 9. Встречный иммуноэлектрофорез   Иммунный блот   1. «Стрип» с нанесенными антигенами 2. Сыворотка больного 3. Антиглобулиновая сыворотка, меченная ферментом 4. Субстрат на фермент, индикатор 5. Тест-планшет (твердая фаза) с нанесенным антигеном 6. Сыворотка больного 7. Антиглобулиновая сыворотка, меченная ферментом 8. Субстракт на фермент, индикатор   Методы молекулярной гибридизации |

###### ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ:

1. Изучить схему лабораторной диагностики гриппа.

2. Изучить схему антигенной структуры вируса гриппа.

3. Решить практические задачи:

а) серологическая диагностика гриппа (Работа 1);

б) вирусологическое исследование при аденовирусных инфекциях (Работа 2);

в) изучить препараты для специфической диагностики и профилактики гриппа, риновирусных и аденовирусных инфекций, вирусных энцефалитов (Работа 3).

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ

РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

**РЕСПИРАТОРНЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ**

**Г Р И П П**

Возбудитель гриппа относят Ортомиксовирусы

к семейству

Основные структурные 1. Однонитевая РНК

компоненты вириона 2. Капсид

3. Наружная липидно-углеводно-

протеиновая оболочка

Новые антигенные варианты Различаются по антигенной структуре

вируса гриппа гемагглютинина и нейраминидазы

(отличительные признаки)

Основные варианты вирусов 1. Вирус гриппа А (А1, А2)

гриппа по антигенной 2. Вирус гриппа В (В1, В2)

структуре 3. Вирус гриппа С

4. Вирус гриппа Д

Примеры антигенных формул Н2N2 (А1 Сингапур)

разных штаммов Н3N2 (А1 Гонконг)

вируса гриппа

Циркуляция вируса среди При снижении или отсутствии кол-

людей осуществляется лективного иммунитета у населения

Новые антигенные варианты 1. Селекции устойчивых штаммов в

вируса гриппа появляются условиях формирования коллектив-

в результате ного иммунитета

2. Генетических рекомбинаций между

птичьими и человеческими виру-

сами в организме птиц

Культивирование вируса 1. На курином эмбрионе

гриппа осуществляют (среды) 2. В культуре клеток

Устойчивость во внешней Быстро погибает под влиянием различ

среде вируса гриппа ных факторов: t0, кислот, щелочей,

УФЛ и др.

Восприимчивые к вирусу 1. Человек

гриппа организмы 2. Птицы

3. Дикие и домашние животные

Клинически выраженная 1. В естественных условиях только

картина заболевания у человека

возможна 2. В эксперименте у африканских

хорьков

Источник инфекции при 1. Больные люди

гриппе 2. Вирусоносители

Путь передачи гриппа Воздушно-капельный

Основные этапы патогенеза 1. Заражение через носоглотку

гриппа 2. Первичная репродукция вируса в

эпителии дыхательных путей

3. Вирусемия

4. Общетоксический синдром

5. Повреждение лимфоцитов. Вторич-

ный иммунодефицит

Принципы лабораторной 1. Обнаружение возбудителя

диагностики гриппа 2. Выявление специфических измене-

ний в организме

Методы лабораторной 1. Иммуно-люминесцентная микро-

диагностики гриппа скопия

2. Вирусологический

3. Серологический

Для выделения вируса 1. Исследуемый материал

гриппа необходимы 2. Куриный эмбрион или культура

ингредиенты клеток в среде 199

Ингредиенты для идентифи- 1. Выделенный вирус

кации вируса гриппа 2. Специфическая иммунная сыво-

в РЗГА ротка

3. Эритроциты

Ингредиенты для определе- 1. Сыворотка больного

ния антител в РЗГА 2. Вирусный диагностикум

3. Эритроциты

Для подтверждения диагноза Выявить нарастание титра антител

гриппа с помощью сероло- не менее чем в 4 раза

гического метода необходимо

Для идентификации вируса 1. Реакцию задержки гемагглю-

гриппа и определения антител тинации

используют реакции 2. РЗЦПД

иммунитета 3. РСК

Основные механизмы имму- 1. Антитела-антигемагглютинины,

нитета при гриппе антинейраминидазные

2. Иммуноглобулины А

3. Интерферон

4. Термолабильные ингибиторы

5. Натуральные Т-киллеры,макрофаги

Активный иммунитет при 1. Живые вакцины разных типов

гриппе создают 2. Химические вакцины (рекомби-

нантные)

3. Инактивированная вакцина

Пассивный иммунитет при 1. Противогриппозной сывороткой

гриппе создается 2. Гамма-глобулином противогрип-

позным

Препараты для неспецифи- Интерфероногены (дибазол, витамин

ческой профилактики гриппа В12 и др.)

**АДЕНОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ**

### Возбудитель аденовирусной Аденовирусов

инфекции относят к семейству

Морфология возбудителя 1. Двунитевая ДНК

аденовирусной инфекции 2. Капсид из 252 капсомеров

3. Кубический тип симметрии

4. Средняя величина 70-90 нм

Антигенная структура 1. А-антиген – групповой

аденовирусов 2. С-антиген – типоспецифический

3. В-антиген – подавляет активность

интерферона

Источники и пути пере- 1. Больной человек

дачи аденовирусов 2. Вирусоноситель

3. Воздушно-капельный

4. Контактно-бытовой

Клиническая картина Многообразна в зависимости от лока-

аденовирусной инфекции лизации пораженной ткани:

а) ОРЗ

б) пневмония

в) кератоконъюнктивит

г) контагиозный ринит

д) гастроэнтероколиты

Принципы лабораторной 1. Обнаружение возбудителя

диагностики аденовирус- 2. Выявление специфических

ной инфекции изменений

Ингредиенты для выделе- 1. Исследуемый материал

ния аденовируса в культуре 2. Перевиваемые культуры клеток в

клеток и результат реакции среде 199

3. Цитопатическое действие

Ингредиенты для идентифи- 1. Выделенный вирус

кации аденовирусов в куль- 2. Специфические иммунные диагнос-

туре клеток и результат тические сыворотки

3. Культура клеток в среде 199

4. Задержка цитопатического действия

Ингредиенты РЗГА для 1. Сыворотки больного, взятые дваж-

выявления динамики анти- ды с интервалом не менее 7 дней

тел при аденовирусной 2. Диагностикум

инфекции 3. Эритроциты

Специфическая профилак- Инактивированная вакцина из наибо-

тика аденовирусной лее часто встречающихся серотипов

инфекции (3, 4, 7), применяемая по эпидпока-

заниям

**РИНОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ**

### Возбудитель риновирусных Пикорнавирусов

инфекций относят к семейству

Морфология возбудителя 1. Сферическая форма до 20 нм

2. Кубический тип симметрии

3. РНК

4. Неоднородны по антигенной

структуре

Источники и пути передачи 1. Больной человек, носитель

риновирусов 2. Воздушно-капельный путь

Патогенез риновирусной 1. Вирусы локализуются в эпителии

инфекции, тропизм ткани слизистой носа

2. У детей – в слизистой носа и

бронхов

3. Цитопатическое действие на эпите-

лиоциты верхних дыхательных путей

Принципы лабораторной 1. Обнаружение возбудителя

диагностики риновирусной 2. Обнаружение специфических изме-

инфекции нений в организме

Методы лабораторной диаг- 1. Вирусологический

ностики риновирусной 2. Серологический

инфекции 3. Экспресс-диагностика (РИФ)

Реакция нейтрализации для 1. Сыворотка крови больного

выявления антител при рино- 2. Диагностикум (вирус)

вирусной инфекции 3. Культура клетки в среде 199

(ингредиенты) 4. Феномен задержки цитопатического

действия

Иммунитет (по длительности) После заболевания до 1 года

**ЗАНЯТИЕ 2**

**Тема: Микробиология кишечных вирусных инфекций и гепатитов**

ЦЕЛЬ:

1. Изучить морфологические особенности возбудителей полиомиелита, энтеровирусных инфекций Коксаки и ЕСНО, вирусных гепатитов А, Е.

2. Изучить эпидемиологию, патогенез, иммунитет при кишечных вирусных инфекциях и вирусных гепатитах А, Е.

3. Овладеть основными методами диагностики полиомиелита, инфекций Коксаки и ЕСНО, энтеральных вирусных гепатитов.

4. Научиться практически решать вопросы специфической профилактики и терапии вирусных кишечных инфекций.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА

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. Определение этиологической значимости затрудняется феноменом персистенции, свойственным отдельным вирусам этой группы, т.е. обнаружение вирусов или их антигенов у практически здоровых людей.

Лабораторная диагностика осуществляется в 2-х направлениях:

а) поиск возбудителя (или его антигенов);

б) поиск специфических реакций организма на возбудитель.

В качестве особенностей лабораторной диагностики следует подчеркнуть применение специальных методов исследования для поиска отдельных фракций вируса – антигенов и антител к ним.

В процессе практической работы студент знакомится с мероприятиями специфической и неспецифической профилактики, изучает соответствующие лечебно-профилактические препараты. Схемы лабораторной диагностики полиомиелита, инфекций Коксаки, ЕСНО и энтеральных вирусных гепатитов А, Е представлены на рисунках 6.3.1, 6.3.2, 6.3.3.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. Полиомиелит (Морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика).

2. Энтеровирусные инфекции Коксаки и ЕСНО (Морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфи ческая терапия и профилактика).

3. Энтеральные вирусные гепатиты (Морфология возбудителей, особенности эпидемиологии, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая терапия и профилактика).

4. Вирусные гепатиты В, С, D, G (этиология, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, профилактика).

ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ:

1. Заслушать и обсудить рефераты, подготовленные студентами по темам:

а) вирусные гепатиты А, Е;

2. Изучить схемы лабораторной диагностики полиомиелита, инфекции Коксаки и ЕСНО, энтеральных вирусных гепатитов.

3. Решить практические задачи по разделам:

а) вирусологическая диагностика полиомиелита (выделение и идентификация вируса в реакции бляшкообразования (Работа 1));

б) серологическая диагностика инфекций Коксаки и ЕСНО (Работа 2);

в) специфическая профилактика кишечных вирусных инфекций (Работа 4).

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

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:** 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.

Диагностикумы гепатита В. Содержат антигены вируса гепатита В: НВSAg, HBCAg, HBeAg. Используются для определения антител к структурам вируса.

Диагностические сыворотки к антигенам вируса гепатита В: НВSAg, HBeAg. Содержат специфические антитела, используются для обнаружения НВSAg и НВeAg в сыворотке крови обследуемых.

**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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

**П О Л И О М И Е Л И Т**

### Возбудитель полиомиелита Пикорнавирусов

относят к семейству

Основные структурные 1. Мелкие размеры

компоненты вируса 2. Однонитевая РНК

полиомиелита 3. Капсид

Антигенные варианты 1. Серотипы I, II, III

вируса полиомиелита 2. Не вызывают перекрестного иммунитета

Источники заражения 1. Больной человек

полиомиелитом 2. Вирусоноситель

Пути заражения 1. Пищевой

полиомиелитом 2. Реже – воздушно-капельный

Основные этапы патогенеза 1. Лимфатические узлы глоточного

полиомиелита кольца или тонкой кишки

2. Вирусемия

3. Двигательные нейроны спинного и

головного мозга

4. Параличи

Персистенция вируса полио- В эпителии кишечника

миелита осуществляется вирусоносителей

Принципы лабораторной 1. Обнаружение возбудителя

диагностики полиомиелита 2. Обнаружение специфических

изменений в организме

Методы лабораторной 1. Вирусологическое исследование

диагностики полиомиелита 2. Серологическое исследование

Материал для вирусологичес- Испражнения, слизь носоглотки,

кого исследования полиомиелита мозговая ткань трупа

Ингредиенты цветной пробы Исследуемый материал + культура

для выделения вируса клеток в среде 199

полиомиелита

Ингредиенты цветной пробы Выделенный вирус + специфическая

для идентификации вируса сыворотка + культура клеток в

полиомиелита среде 199

Результат цветной пробы Цитопатический эффект, цвет среды

при выделении вируса не изменился

полиомиелита

Результат положительной Задержка цитопатического эффекта,

цветной пробы при идентифи- цвет среды изменился

кации вируса полиомиелита

Иммунитет (по длительности Стойкий, на протяжении всей жизни

и напряженности)

Активный иммунитет при поли- Живой вакцины

омиелите создается с помощью

Состав живой вакцины Вирусы полиомиелита 3-х типов

против полиомиелита (авирулентные штаммы)

Пассивный иммунитет при С помощью человеческого гамма-

полиомиелите создается глобулина (донорского)

**ЭНТЕРОВИРУСНЫЕ *КОКСАКИ* И *ЕСНО* ИНФЕКЦИИ**

### Вирусы Коксаки и ЕСНО Пикорнавирусов

относят к семейству

Особенности антигенной 1. Различают две изолированные по

структуры вирусов антигенам группы А и В

Коксаки 2. Группа А включает 24 серотипа

3. Группа В включает 6 серотипов

Основной механизм подачи Фекально-оральный

инфекции

Тропизм к тканям вирусов 1. Нейротропность

Коксаки и ЕСНО 2. Поражение мышечной ткани

3. Поражение тканей верхних

дыхательных путей и др.

Клинические проявления Полиморфизм клинической картины:

инфекции Коксаки а) острые респираторные заболевания;

б) полиомиелитоподобные заболевания

в) кишечные инфекции и др.

Клинические проявления Полиморфизм клинической картины:

инфекции ЕСНО а) серозный менингит;

б) полиомиелитоподобные заболевания

в) острые респираторные заболевания;

г) кишечные инфекции и др.

Принципы лабораторной 1. Обнаружение возбудителя

диагностики энтеровирусных 2. Определение специфических

инфекций изменений в организме

Методы лабораторной 1. Вирусологический

диагностики энтеровирусных 2. Серологический

инфекций 3. Биопроба (Коксаки)

Материал для выделения 1. Испражнения

вирусов 2. Смывы и мазки из зева

3. Кровь

4. Спинномозговая жидкость

В вирусологическом исследо- 1. Исследуемый материал(кал,спинно-

вании при подозрении на мозговая жидкость,смыв с носоглотки

заболевание, вызванное 2. Культура клеток в среде 199

вирусом Коксаки, исполь- 3.Специфические иммунные сыворот-

зуются ингредиенты: ки(типоспецифические для иденти-

фикации в реакции нейтрализации)

Ингредиенты РСК для опре- 1. Сыворотки больного, взятые с

деления нарастания титра интервалом не менее 7-10 дней

антител к вирусам ЕСНО 2. Вирусный диагностикум

(поливалентный)

3. Комплемент

4. Гемосистема

Ингредиенты и результат 1. Исследуемый материал, содержа-

биологической пробы для щий вирус

выделения вирусов Коксаки 2. Мыши-сосунки

3. Вялые параличи со смертельным

исходом

Ингредиенты биологической 1. Специфические типовые сыворотки

пробы для идентификации 2. Выделенный вирус

вируса Коксаки 3. Мыши-сосунки

4. При соответствии антител сыво-

ротки и антигенов вируса – живот-

ные не погибают

Вирусы Коксаки А вызывают Вялые параличи у мышей-сосунков

заболевание у лабораторных со смертельным исходом

животных (клиника)

Отличия вирусов ЕСНО от Не вызывают заболевания у экспери-

Коксаки в эксперименте на ментальных животных(вирусы ЕСНО)

животных

Иммунитет при инфекции 1. Напряженный

Коксаки и ЕСНО 2. Пожизненный

3. Типоспецифический

Специфическая профилактика Не разработана

Энтеровирус тип 70 относят Пикорнавирусов

к семейству

Энтеровирус тип 70 может Острый эпидемический геморраги-

вызвать заболевание(название) ческий конъюнктивит

Тропизм к тканям вируса 1. Эпителий конъюнктивы и роговицы

типа 70 2. Двигательные нейроны спинного мозга человека

Клиническая картина 1. Поражение конъюнктивы, кератит

заболевания, вызванного 2. Осложнения со стороны ЦНС

энтеровирусом тип 70 (слабость конечностей, парезы и па-

раличи лицевого и языкоглоточного

нервов)

Этапы вирусологического 1. Выделение вируса в культурах поче

метода лабораторной диагнос- чных клеток и фибробластов человека

тики энтеровирусной инфекции 2. Идентификация вирусов в реакции

тип 70 нейтрализации

Специфическая профилактика Не разработана

энтеровирусной инфекции тип 70

Энтеровирус тип 71 относят Пикорнавирусов

к семейству

Энтеровирус тип 71 вызывает Асептический менингит и энцефалит

Этапы лабораторной диагнос- 1. Обнаружение вируса в биопробе на

тики энтеровирусной новорожденных мышах

инфекции тип 71 2. Идентификация в реакции нейтра- лизации

Специфическая профилактика Инактивированная вакцина

энтеровирусной инфекции тип 71

**ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ «А»**

### Вирус инфекционного гепатита Пикорнавирусов

А относят к семейству

Морфология вируса 1. Сферический икосаэдр, 27-30 нм

гепатита А 2. Однонитевая РНК

3. Капсид состоит из 32 капсомеров

Антигенная структура 1. Один серотип

вируса гепатита А 2. Не имеет общих антигенов с вирусом гепатита В

Источники и механизм зараже- 1. Больной человек и вирусоноситель

ния вирусом гепатита А 2. Фекально-оральный механизм

Патогенез вирусного гепатита 1. Инкубационный период 3-6 недель

А (основные этапы) 2. Репродукция в эпителиоцитах

тонкой кишки

3. Вирусемия

4. Поражение гепатоцитов

5. Повторное поступление с желчью

в просвет кишечника

6. Выделение с фекалиями

Принципы лабораторной 1. Выявление возбудителя (антигенов)

диагностики гепатита А 2. Выявление специфических

изменений

Методы обнаружения 1. Иммунная электронная микроскопия

возбудителя 2. Вирусологический

Метод обнаружения специфи- Серологический метод с использова-

ческих изменений при нием ИФА, РИА и др.

гепатите А

Ингредиенты иммунофер- 1. Тест-пластинка (твердая фаза) с

ментного анализа для выяв- нанесенной сывороткой анти-вирус

ления возбудителя (анти- гепатита А

гена) вируса гепатита А 2. Фильтрат испражнений

3. Анти-сыворотка к вирусу гепатита

А, меченная ферментом

4. Субстрат на фермент

Ингредиенты радиоиммун- 1. Тест-пластинка (твердая фаза) с

ного метода для выявления соответствующим антигеном

антител при гепатите А 2. Сыворотка крови больного

3. Антиглобулиновая сыворотка,

меченная радиоизотопом

4. Измерение радиоактивности

Специфическая профилактика Вакцина культуральная из убитого

гепатита А вируса гепатита А

**ЗАНЯТИЕ 3**

**Тема: Микробиология медленных вирусных инфекций**

ЦЕЛЬ:

1. Изучить этиологию, эпидемиологию, патогенез медленных вирусных инфекций, парентеральных гепатитов.

2. Овладеть основными методами диагностики ВИЧ-инфекции, бешенства, гепатита В.

3. Научиться практически решать вопросы специфической профилактики

ВИЧ-инфекции, бешенства, гепатита В.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА

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. К парентеральным гепатитам относятся вирусные гепатиты В, D, С и G. Заражение данными гепатитами происходит при взятии и переливании крови, хирургических операциях, инъекциях и других манипуляциях.

Лабораторная диагностика вирусных гепатитов и 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, 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.

Следует подчеркнуть, что диагностика проводится в несколько этапов с использованием различных тест-систем, характеризующихся разной степенью специфичности.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. «Медленные инфекции» - определение понятия.

2. ВИЧ-инфекция (Морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).

3. Бешенство (Морфология возбудителя, эпидемиология, патогенез, иммунитет, лабораторная диагностика, специфическая профилактика).

4. Подострый склерозирующий панэнцефалит (Морфология возбудителя, патогенез, лабораторная диагностика).

5. Болезни, вызываемые прионами (Куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба и др.). Особенности возбудителей, патогенеза, лабораторной диагностики.

ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ: 1.

2. Изучить схемы лабораторной диагностики бешенства, ВИЧ-инфекции,.

3. Решить практические задачи по разделам:

а) серологическая диагностика ВИЧ-инфекции: оценка результатов ИФА (Работа 1);

б) серологическая диагностика ВИЧ-инфекции: оценка результатов иммуноблоттинга (Работа 2);

г) лабораторная диагностика и профилактика бешенства (Работа 4).

1. Изучить препараты для специфической диагностики и профилактики

ВИЧ-инфекции, гепатита В, бешенства (Работа 5).

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**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 (рис. 6.5.1).

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

а) микроскопия препарата

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Материал для исследования | Метод исследования | Результат (рис.) |

б) характеристика профилактических препаратов при бешенстве

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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, гепатите В и 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.

Вакцина против гепатита В рекомбинантная дрожжевая. Представляет из себя НВSAg, выделенный из штамма-продуцента Saccharomyces cerevisiae. Применяется для плановой профилактики гепатита В у детей и взрослых из группы риска.

1. **Диагностические препараты**

Антирабическая флюоресцирующая сыворотка – содержит антитела к вирусу бешенства, обработанные флюорохромом. Применяется для поиска возбудителя методом иммунной флюоресценции.

Диагностикумы гепатита В. Содержат антигены вируса гепатита В: НВSAg, HBCAg, HBeAg. Используются для определения антител к структурам вируса.

Диагностические сыворотки к антигенам вируса гепатита В: НВSAg, HBeAg. Содержат специфические антитела, используются для обнаружения НВSAg и НВeAg в сыворотке крови обследуемых.

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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

**ВИЧ – ИНФЕКЦИЯ**

Возбудитель ВИЧ-инфекции Ретровирусов

относят к семейству

Основные структурные 1. Сферическая форма 100-120 нм

компоненты ВИЧ 2. РНК

3. Сердцевина вириона, образованная

белками р18 и р24

4. Внешняя оболочка

5. Гликопротеиновые «шипы» внеш-

ней оболочки gр41, gр120

6. Обратная транскриптаза

Антигенная структура 1. Антигены белков сердцевины

ВИЧ 2. Антигены оболочечных глико-

протеинов

3.Антигенные варианты ВИЧ-1,ВИЧ-2

Основными аккумуляторами 1. Кровь

ВИЧ в организме человека 2. Сперма

являются 3. Влагалищное отделяемое

Основные пути передачи 1. Половой

ВИЧ-инфекции 2. Парэнтеральный

3. Трансплацентарный

Основное звено патогенеза 1. Поражение клеток, несущих

ВИЧ-инфекции СД4-рецепторы

2. Нарушение соотношения Т-хелпе-

ров и Т-супрессоров (за счет пора-

жения Т-хелперов)

Многообразие клинических Вторичными патологическими про-

проявлений СПИД цессами (инфекции, опухоли), возни-

обусловлено кающими на основе иммунодефицита

Лабораторная диагностика 1. Обнаружение антител в сыворотке

ВИЧ-инфекции включает крови обследуемого

2. Обнаружение антигенов ВИЧ в

крови обследуемого

Диагноз ВИЧ-инфекции Троекратного положительного резуль-

ставится на основании тата тестового метода и однократного

положительного результата одного

из экспертных методов

Основной тестовой реакцией ИФА для обнаружения антител

диагностики ВИЧ-инфекции к ВИЧ

является

К экспертным (подтверж- 1. Иммунный блот (для обнаружения

дающим) реакциям антител к антигенам ВИЧ)

диагностики ВИЧ-инфекции 2. Молекулярная гибридизация

относятся 3. ПЦР - полимеразная цепная реакция

К препаратам этиотропной 1. Изидотимидин

терапии ВИЧ-инфекции 2. Рибовирин

относятся

Специфическая профилактика Разрабатываются генноинженерные

ВИЧ-инфекции и другие типы вакцин

**Б Е Ш Е Н С Т В О**

Вирус бешенства относят Рабдовирусов

к семейству

По типу нуклеиновой РНК – содержащим вирусам

кислоты вирус бешенства

относится к

Особенности эпидемио- 1. Сохранение вируса в организме

логии бешенства плотоядных животных (волки,

собаки, лисы, летучие мыши-

вампиры и др.)

2. Передача возбудителя через укус

больного животного или ослю-

нение раны

Длительность инкубаци- От 10 дней до 7 месяцев, описаны

онного периода при единичные случаи до 2 и даже 3 лет

бешенстве

Наиболее опасная локали- Лицо, голова, кисти рук

зация укусов

Патогенез бешенства 1. Распространение вируса по эндо-

и периневральным пространствам

2. Поражение головного и спинного

мозга

3. Поступление вируса из ЦНС в

слюнные железы с последующим

выделением

4. Образование в клетках головного

мозга телец Бабеша-Негри

Тельца Бабеша-Негри Колонии вирусов, окруженные

представляют собой реактивными изменениями клетки

Принцип лабораторной Обнаружение возбудителя

диагностики бешенства

Методы для обнаружения 1. Метод микроскопический (в том

возбудителя числе иммунная флюоресценция)

2. Постановка биологической пробы

Обнаружение телец Микроскопическое исследование

Бабеша-Негри мазков-отпечатков срезов мозга (ткань

аммонова рога)

Специфическая профи- Антирабическая вакцина

лактика бешенства

**Медленные инфекции**

**ПОДОСТРЫЙ СКЛЕРОЗИРУЮЩИЙ ПАНЭНЦЕФАЛИТ**

Возбудитель ПСПЭ Вирус кори: аттенуированный или

дефектный вариант

Патогенез ПСПЭ 1. Локализация возбудителя в мозго-

вой ткани

2. Длительное персистирование

вируса после заболевания

3. Разрастание волокнистой глии в

белом веществе мозговых полушарий

Лабораторная Обнаружение вируса кори

диагностика

**БОЛЕЗНЬ КРЕЙТЦФЕЛЬДА-ЯКОБА**

Возбудитель (прион) 1. Частицы первого типа диаметром

68-85 нм

2. Частицы второго типа диаметром

48-60 нм

3. Устойчив во внешней среде и при

нагревании до 700С

Эпидемиология Спорадические заболевания

Клиника Полиморфная неврологическая

симптоматика

**К У Р У**

Возбудитель (прион) 1. Под электронным микроскопом

увидеть не удается

2. Размеры от 220 нм до 100 нм

3. Устойчив во внешней среде

4. Термоустойчив

Эпидемиология 1. Эндемичность

2. Наблюдается в труднодоступных

районах Новой Гвинеи

3. Основной путь передачи – ритуаль-

ное людоедство

К л и н и к а 1. Инкубационный период от 5 до

10 лет

2. Неврологические расстройства:

а) двигательная атаксия;

б) дрожание туловища, конечностей,

головы;

в) повышенная возбудимость, непод-

вижность

3. Летальный исход через 6-9 месяцев

болезни

Патогенез Накопление вируса в ткани головного

мозга

Лабораторная Воспроизведение клинической

диагностика картины на животных (биопроба)