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

**МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВОХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии

**МОДУЛЬ 2**

**«ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»**

**методические указания для студентов факультета высшего сестринского образования**

**Оренбург 2016**

**Модуль 2 Инфекция. Иммунитет**

**Раздел Инфекция (2 практических занятия)**

ТЕМА Инфекционный процесс. Микрофлора тела человека и внешней среды.

**ЦЕЛЬ:**

1. Изучить факторы патогенности микроба.
2. Изучить факторы естественной резистентности организма.
3. Овладеть методами бактериологической оценки объектов внешней среды.
4. Овладеть навыком оценки результатов экспериментальной инфекции (биологический метод диагностики).

# ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА

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

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

**Факторы колонизации** обеспечивают способность патогена (патогенного микроорганизма) заселить определенную экологическую нишу в организме хозяина (как правило, у входных ворот инфекции): адгезины, бактериоцины, железосвязывающие белки и др. Адгезины – поверхностные структуры микроорганизмов (пили, белки наружной мембраны, липотейхоевые кислоты), способствующие прикреплению возбудителя к клеткам организма (Рис. 3.5). Бактериоцины – антагонистически активные вещества, подавляющие нормальную микрофлору организма. Железосвязывающие белки обеспечивают усвоение железа патогеном, способствуя его колонизации и инвазии.

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

**Токсины. Эндотоксины** характерны для грамотрицательных микроорганизмов, не специфичны по механизму действия, вызывают общую интоксикацию организма. **Экзотоксины** – это секретируемые токсины белковой природы со специфическим действием на организм. По механизму действия делятся на мембранотоксины (гемолизины (Рис. 3.2), цитотоксины и др.), функциональные блокаторы (холероген и др.), эксфолиатины и эритрогенины. Из экзотоксинов путем их инактивации получают вакцины-анатоксины (столбнячный, дифтерийный и т.д.).

**Ферменты «защиты и агрессии» (факторы альтерации)**

Многим патогенным микроорганизмам свойственно образование ферментов, способствующих проникновению, распространению микроба вглубь тканей и противостоянию защитным факторам макроорганизма (фибринолизин, гиалуронидаза, лецитиназа, плазмокоагулаза; протеазы, разрушающие иммуноглобулины, и другие факторы).

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

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

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

г) Летициназа (лецитовителлаза) – фермент, расщепляющий липопротеид оболочек клеток. Выявляется в виде помутнения или образования радужных венчиков вокруг колоний на специальной желточной среде (Рис. 3.4). В данном феномене участвует и фермент липаза, ответственный за формирование поверхностной радужной пленки. Эти два фермента обеспечивают выживание микроорганизмов на коже, в очагах нагноения.

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

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

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

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

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

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

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

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

**Функция системы комлемента:**

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

Известны два основных пути активации комплемента: **классический** (активируется комплексом антиген-антитело – IgG, IgM); **альтернативный** (индуцируется ЛПС, антигенами вирусов, грибов, простейших, иммунными комплексами с IgA, IgE и т.д.).

**С3 компонент комплемента** играет центральную роль в обоих путях активации комплемента.

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

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

**Для воздуха санитарно-показательными микробами являются золотистый стафилококк и гемолитический стрептококк,** нахождение которых в воздухе любого помещения свидетельствует о санитарном неблагополучии, и тем более недопустимо их нахождение в воздухе операционных, послеоперационных палат, родильных залов, палат новорожденных и др.

Для исследования микрофлоры воздуха используют различные методы: седиментационный (метод Коха), фильтрационный (воздух продувают через воду) и аспирационные методы, основанные на принципе ударного действия воздушной среды с использованием специальных приборов (аппарат Короткова и др.).

**Санитарно-микробиологический анализ почвы** включает определение **бактерий группы кишечной палочки (БГКП), общей численности сапрофитных почвенных микроорганизмов, титра Cl.perfringens, термофильных сапрофитных бактерий (растущих при 60±20С), энтерококков.** К бактериям группы кишечной палочки относятся бактерии семейства Enterobacteriaceae: родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella; это грамотрицательные, не образующие спор и не обладающие оксидазной активностью палочки, ферметирующие лактозу и глюкозу до кислоты и газа при 370 С в течение 24 ч. Эти бактерии выделяются в окружающую среду только с испражнениями человека и теплокровных животных.

**Санитарно-микробиологическое состояние воды** оценивается по:

1. микробному числу – количество мезофильныххемоорганотрофных бактерий в 1 мл воды,
2. коли-титру – наименьшему объему воды (мл), в котором обнаруживаются бактерии группы кишечной палочки (БГКП);
3. коли-индексу – количеству БГКП в 1 л воды.

Показателями свежего фекального загрязнения являются лактозоположительные кишечные палочки (сохраняют способность ферментировать лактозу при 44,50С) и цитратотрицательные бактерии (не растущие на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии цитрат). Дополнительным критерием оценки санитарного состояния воды является определение у выделенных энтеробактерий персистентных свойств. Надежным критерием свежести фекального загрязнения воды является обнаружение энтеробактерий с **антилизоцимной, антикомплементарной и «антиинтерфероновой» активностью.**

Вопросы для подготовки:

1. Определение понятий: «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционное заболевание».
2. Движущие силы инфекционного процесса.
3. Роль микроба в инфекционном процессе. Патогенность и вирулентность. Факторы колонизации, вирулентности и персистенции.
4. Микрофлора внешней среды и тела человека, ее роль в происхождении патогенных микробов.
5. Роль макроорганизма в инфекционном процессе (понятие о восприимчивости, инфекционной чувствительности)
6. Причины и условия, влияющие на восприимчивость и инфекционную чувствительность макроорганизма.
7. Факторы естественной резистентности организма человека.
8. Роль нормальной микрофлоры тела человека в норме и при патологии.
9. Роль внешней среды как движущей силы инфекционного процесса. Коли-титр, коли-индекс.
10. Роль социальных факторов в возникновении и развитии инфекционного процесса.
11. Этапы в развитии инфекционного заболевания.
12. Пути распространения микробов и токсинов в организме.
13. Формы инфекционного процесса по длительности, происхождению, по выраженности клинических проявлений, по числу возбудителей.

17. Экспериментальная инфекция и ее значение в научных исследованиях и практической медицине. Биологический метод диагностики (биологическая проба).

План самостоятельной работы:

1. Оценить результат определения коли-индекса воды (Работа 1).
2. Изучить макропрепараты, демонстрирующие факторы колонизации, вирулентности и персистенции бактерий (Работа 2).
3. Ознакомиться с таблицами «Нормальная микрофлора тела человека» и «Микрофлора кишечника новорожденных» (для педиатрического факультета).
4. Экспериментальная инфекция (биологический метод).
5. демонстрация способов заражения животных;

б) воспроизведение экспериментальной бактериальной инфекции на мышах (Работа 3).

Самостоятельные практические работы

**Работа 1.**

**Цель:** Оценить результат определения фекального загрязнения воды по коли-индексу.

**Задача.** В населенном пункте возникли случаи кишечных заболеваний. В санэпидемстанцию направлена водопроводная вода для определения фекального загрязнения. Дайте оценку качества воды по коли-индексу и пригодность использования ее для питья.

**Методика:**

Коли-индекс воды определяют с использованием мембранных фильтров, задерживающих БГКП. Воду (1 литр) фильтруют через фильтр, который после окончания фильтрации помещают на поверхность среды Эндо. После суточной инкубации (370С) подсчитывают количество БГКП (Рис. 3.1.).

Согласно ГОСТу на питьевую водопроводную воду, ее коли-индекс должен быть не более 3.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

Результат: рисунок с обозначениями.

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какой коли-индекс исследуемой воды? 2. Пригодна ли вода для питья?).

**Работа 2.**

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

**Методика:**

**Гемолизины –** для выявления гемолизинов делают посев чистой культуры на 3-5% кровяной агар и после суточной инкубации при 370С определяют зоны гемолиза вокруг выросших колоний (рис.3.2.).

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

**Лизоцим** (микробный) – для определения лизоцимной активности на поверхность агара с засеянным в него тест-микробом (микрококком) наносится в виде бляшек исследуемая культура. Появление зон лизиса микрококка вокруг культуры свидетельствует о лизоцимной активности микроорганизмов (рис.3.3.).

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

**Лицитиназа**(лецитовителлаза) - выявляется путем посева чистой культуры на чашку с желточно-солевым агаром (ЖСА) штрихом или бляшкой. Чашки инкубируют в термостате при 370С в течение суток. При положительном результате вокруг колоний образуется радужный венчик. Учитывают в отраженном свете (рис.3.4.).

**Адгезины –** оцениваются по способности бактерий прилипать к эритроцитам. Для этого эритроциты человека 1 группы, предварительно отмытые буферным раствором и доведенные до концентрации 106кл/мл, смешивают на предметном стекле с чистой культурой в соотношении 1 : 3 и инкубируют 30 мин. при 37 С. Затем делают мазок, окрашивают синькой Мансона и подсчитывают индекс адгезии (количество микробов, адгезированных на эритроцитах / количество эритроцитов, участвующих в адгезии) (рис. 3.5.).

**Персистентные свойства микроорганизмов – антилизоцимная активность** (АЛА) – для определения АЛА в плотную питательную среду добавляют определенное количество лизоцима, на поверхность засевают в виде бляшек исследуемые бактерии, а через сутки, после обработки хлороформом, наносят 2-й слой агара с микрококком. Учет проводят по росту микрококка вокруг культур, инактивировавших лизоцим (рис.3.6.).

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Факторы вирулентности | | | | | | | |
|  | адгезины | гемолизин | плазмокоагулаза | гиалуронидаза | лизоцим | лецитиназа | антилизоцимная активность |
| Рисунок с обозначениями  Назначение факторов (вывод) |  |  |  |  |  |  |  |

**Работа 3.**

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

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

**Методика:**

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

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

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшнным (рис.3.8.), внутривенным, пероральным или эндоназальным. Во всех случаях, за исключением перорального и эндоназального способов, заражение осуществляется с помощью шприца. Вскрытие трупов животных производится стерильными инструментами, соблюдая правила асептики. При вскрытии производят осмотр органов, осуществляют посев тканей и органов на питательные среды для бактериологического исследования, готовят мазки-отпечатки для обнаружения микроорганизмов, для изучения их вирулентных свойств (обнаружение каспулы). Для оценки степени вирулентности микробов определяют LD50 (доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных), а затем выделяют чистую культуру и изучают ее вирулентные свойства.

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

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

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

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

* на специальную доску, покрытую ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, помещают труп мышки вверх брюшком и фиксируют за лапки металлическими булавками;
* вскрытие трупа производят стерильными инструментами;
* проводят отсепаровку кожи от подлежащей ткани, вскрывают грудную полость, делают посев крови из сердца на кровяной агар и готовят мазок на предметном стекле;
* вскрывают брюшную полость, осматривают органы брюшной полости, проводят посев ткани печени и селезенки (при необходимости других органов и тканей) на кровяной агар и готовят мазки-отпечатки из этих органов на предметном стекле. Микропрепараты окрасить, исследовать на обнаружение капсулы (Рис.3.9.).

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ

РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Инфекционный процесс  (определение)  Движущие силы инфекционного процесса  Патогенность (определение)  Этапы проявления патогенности в динамике инфекционного процесса  Вирулентность (определение)  Инвазивность (определение)  Токсигенность (определение)  Характеристика эндотоксинов  Характеристика экзотоксинов  Показатели фекального загрязнения окружающей среды  Восприимчивость (определение)  Инфекционная чувствительность (определение)  Показатели, по которым можно количественно оценить инфекционную чувствительность  Периоды инфеционного заболевания  Персистенция, это –  Механизмы персистенции  Бактерионосительство (определение)  Задачи экспериментальной инфекции  Условно-патогенные микроорганизмы (определение) |  | Эколюционно сложившееся динамическое взаимодействие восприимчивого макроорганизма и патогенного микроба в определенных условиях внешней среды   1. Патогенный микроб 2. Восприимчивый макроорганизм 3. Условия внешней среды   Способность определенных видов микробов вызывать инфекционный процесс у человека и животных.   1. Колонизация 2. Инвазия 3. Паразитирование 4. Интоксикация   Степень патогенности у данного штамма микроорганизма  Способность микроорганизма распространяться по организму, благодаря наличию особых ферментов, вызывающих изменение проницаемости клеток, тканей.  Способность микроорганизма выделять яды, обладающие высоким молекулярным весом и антигенными свойствами.   1. Глюцидолипиднопротеиновые комплексы 2. Освобождаются при разрушении бактериальной клетки 3. Термостабильны 4. Не обладают избирательностью действия на клетки и ткани 5. Слабо выражена способность вызывать образование антител 6. Белки 7. Высокотоксичны 8. Термолабильны 9. Полностью или частично секретируются из клетки при жизни 10. Органотропны, цитотропны 11. Иммуногенны 12. При обработке формалином теряют токсичность, сохраняя антигенность и превращаются в анатоксин 13. Коли-титр – минимальное количество воды (или другой жидкости), в котором –обнаруживается кишечная палочка (в норме не менее 300 мл). 14. Коли-индекс – количество кишечных палочек в 1 литре воды или другой жидкости (в норме не более 3).   Видовое понятие, отражающее способность макроорганизма вступать во взаимодействие с патогенным микроорганизмом, предоставляя ему условия существования.  Индивидуальная чувствительность макроорганизма к патогенным микробам, меняющая в зависимости от пола, возраста, входных ворот, состояния иммунной системы и т.д.   1. Бактерицидная активность сыворотки 2. Количество лизоцима, комплемента в жидкостях и тканях макроорганизма 3. Фагоцитарная активность лейкоцитов 4. Антитела и др. 5. Инкубационный 6. Продромальный 7. Нарастание клинических симптомов 8. Исход (выздоровление, смерть, бактерионосительство, рецидивы).   Длительное переживание возбудителя в организме   1. Специфическаяинактивация факторов иммунитета (АЛА, АИА, АКА и др.) 2. Экранирование клеточной стенки (капсула, оболочечный антиген) 3. Антигенная мимикрия 4. Утрата клеточной стенки (L-формы)   Особая форма взаимодействия восприимчивого макроорганизма и патогенного микроорганизма, протекающая бессимптомно, сопровождающаяся выделением возбудителя в окружающую среду.   1. Изучение вирулентности микроба, патогенеза заболевания 2. Определение эффективности лечебных и профилактических препаратов 3. Диагностика болезни (биологический метод)   Микробы нормальной микрофлоры человека, способные вызывать заболевание при снижении защитных сил организма |

ПИСЬМЕННЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

**Занятие 1**

В тетрадь для практических занятий переписать и заполнить данные таблицы

Таблица 1.

**Факторы патогенности микроорганизмов**

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

**Занятие 2**

**Формы инфекционного процесса**

Таблица 2.

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

**РАЗДЕЛ ИММУНИТЕТ (2 практических занятия)**

**ТЕМА: Учение об иммунитете. Система антиген-антитело в диагностике, терапии и профилактике инфекционных болезней**

**ЦЕЛЬ:**

1. Изучить общие закономерности взаимодействия антигенов с организмом человека и в системе антиген-антитело.
2. Усвоить принципы использования реакций иммунитета в диагностике инфекционных болезней.
3. Овладеть методами постановки и оценки результатов реакций иммунитета для обнаружения антигена или антитела.
4. Усвоить принципы изготовления и применения диагностических препаратов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА:

**Реакции иммунитета**

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

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

**Реакция агглютинации**

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

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

**Реакция преципитации**

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

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

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)**

Прямая (метод Кунса).

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

Непрямая.

На 1-ом этапе микроорганизмы взаимодействуют со специфической сывороткой.

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

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

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

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

**Реакция Кумбса**

Это тест на выявление неполных антител, которые сами не могут агглютинировать антигены, но способны к ним присоединяться. Реакцию проводят поэтапно: к сыворотке крови обследуемого добавляют эритроцитарныйдиагностикум – известные антигены адсорбированные на эритроцитах. После инкубации эритроциты отмывают и добавляют кроличьи АТ против человеческих глобулинов. В результате антиглобулиновая сыворотка склеивает эритроциты через образовавшиеся на них комплексы АГ-АТ.

**Реакция связывания комплемента**

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

**Иммуноферментный метод**

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

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

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

**Специфические диагностические препараты**

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

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

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

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

4. Аллергены содержат специфические антигены. Используются для выявления аллергии: ГЗТ, ГНТ.

**Препараты для специфической профилактики и терапии**

**инфекционных заболеваний**

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

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

3. Бактериофаги (живые вирусы бактерий) – применяют для лечения и профилактики. Действие основано на специфическом лизисе возбудителя.

**Определение иммунного статуса**

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

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

Исследование иммунного статуса включает проведение тестов 1 и 2 уровней.

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

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

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

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

**Аллергия**

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

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

Вопросы для подготовки:

1. Иммунитет. Определение понятия.
2. Виды иммунитета по происхождению и условиям формирования.
3. Характеристика гуморальных и клеточных факторов иммунитета.
4. Механизмы иммунного ответа. Взаимодействие Т-, В-лимфоцитов и макрофагов. Их роль в клеточном и гуморальном иммунитете.
5. Антигены. Определение. Свойства. Химическая природа. Материальная основа специфичности.
6. Антигенная структура бактериальной клетки. Виды антигенов по специфичности. Значение для практической медицины.
7. Антитела. Классы иммуноглобулинов, их определение.
8. Аутоантигены, аутоантитела. Их роль в инфекционной патологии.
9. Серологическая диагностика инфекционных заболеваний. Отличие истинной от анемнестической реакции иммунитета.
10. Реакция агглютинации. Механизм, практическое использование.
11. Современные модификации реакции агглютинации: РНГА, РКоА. Механизм, практическое использование. Реакция Кумбса.
12. Реакция преципитации, ингредиенты. Механизм. Практическое использование.
13. Механизм реакции иммуно-флуоресценции. Практическое использование.
14. Лизины, бактериолизины. Реакция связывания комплемента. Ингредиенты. Механизм, практическое использование.
15. Иммуноферментный анализ. Механизм. Практическое использование.
16. Диагностические препараты: виды, определение, получение, применение.
17. Монорецепторные сыворотки: определение, специфичность, получение, применение.
18. Иммунный статус человека. Основные показатели.
19. Определение классов иммуноглобулинов. Метод радиальнойиммунодиффузии по Манчини.
20. Принципы определения Т- и В-лимфоцитов. Реакция Е- и ЕАС розеткообразования.
21. Оценка функциональной активности фагоцитов. Фагоцитарный показатель.
22. Вакцины. Виды вакцин. Получение, показания для применения.
23. Сыворотки и иммуноглобулины лечебные, профилактические. Получение, показания для применения.
24. Гиперчувствительность немедленного и замедленного типов. Механизм возникновения. Роль в инфекционной патологии. Практическое значение.

ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ:

1. Изучить таблицу-схему «Принципы практического использования системы «антиген-антитело» при диагностике инфекционных заболеваний».
2. Учесть реакцию агглютинации для определения вида микроба (работа 1).
3. Поставить реакцию агглютинации для определения типа микроба (работа 2).
4. Учесть результат реакции преципитации в агаре для определения токсигенности дифтерийных бактерий (работа 3).
5. Изучить механизм реакции иммуно-флюоресценции (прямой и непрямой).
6. Учесть и объяснить результат реакции агглютинации для серологической диагностики заболевания (работа 4).
7. Разобрать механизм и учесть результат РНГА для определения динамики антител в сыворотке крови больного (работа 5).
8. Изучить механизм реакции Кумбса.
9. Изучить ингредиенты и учесть результат реакции связывания комплемента (работа 6).
10. Учесть результат иммуноферментного анализа (работа 7).
11. Изучить диагностические препараты (работа 8).
12. Изучить диагностические препараты для выявления гиперчувствительности замедленного типа (аллергены) (Работа 1).
13. Рассмотреть таблицу «Специфические лечебные и профилактические препараты».
14. Изучить препараты для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний. (Работа 9).
15. Изучить методы выявления и оценки некоторых показателей иммунного статуса человека (иммуноглобулины, Т- и В-лимфоциты, фагоцитарный показатель) (Работа 10).

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

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

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

**Методика:**

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

**Работа 2**

**Цель:** Овладеть методикой постановки и оценки реакции агглютинации на стекле для определения типа выделенной культуры.

**Задача.** В бактериологическую лабораторию доставлены испражнения больного с предположительным диагнозом «Дизентерия». Выделена чистая культура бактерий, которая по морфологическим, ферментативным и антигенным свойствам идентифицирована как дизентерийная палочка вида Флекснера. С помощью монорецепторных сывороток определите тип выделенной культуры.

**Методика:**

Техника постановки реакции агглютинации на стекле

1. На обезжиренное предметное стекло нанести петлей каплю иммунной сыворотки.
2. В каплю сыворотки внести петлей культуру бактерий и перемешать до легкого помутнения.
3. Стекло слегка покачать.
4. При положительном результате через 2-5 минут видны вначале мелкие зерна, а позднее – крупные хлопья, смещающиеся на край капли, а жидкость становится прозрачной.
5. В контроль вместо сыворотки вносят физиологический раствор.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты реакции | Сыворотка Флекснера тип 1 + чистая культура бактерий | Сыворотка Флекснера тип 2 + чистая культура бактерий | Физиологический раствор+чистая культура бактерий |
| Результат | | | |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. К какомусеровару относится культура дизентерийной палочки? Почему? 2. Зачем нужно определять серовар возбудителя?).

**Работа 3**

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

**Методика:**

Рассмотреть чашку с поставленной реакцией, выявить токсигенные штаммы.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями.

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

**Работа 4**

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

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

**Методика:**

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

**Работа 5**

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

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

**Методика:**

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

**Работа 6**

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

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

**Методика:**

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ № 1

Цель:

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ № 2

Цель:

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

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

**Работа 7**

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

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

**Методика:**

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

**Работа 8**

**Цель:** Изучить препараты для специфической диагностики инфекционных болезней.

**Методика:**

Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации, заполнить таблицу.

**Примеры диагностических препаратов.**

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

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

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

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

**Цель:** Изучить препараты для выявления гиперчувствительности замедленного типа при инфекционных заболеваниях.

**Методика:**

Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации. Примеры аллергенов:

**Очищенный туберкулин** в стандартном разведении (ППД-Л) готовится путем очищения фильтрата убитой нагреванием культуры микобактерий туберкулеза. Применяется для выявления инфицированности людей туберкулезными бактериями путем постановки аллергической пробы Манту.

**Аллерген туляремийный – тулярин**. Взвесь туляремийных микробов вакцинного штамма, убитых нагреванием. Используется для диагностики туляремии и оценки состояния иммунитета в аллергической пробе.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Название  препарата | Состав | К какой группе диагностических препаратов  относится | Метод  диагностики |
|  |  |  |  |  |

**Работа 9**

**Цель:** Изучить препараты для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

**Методика:**

Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации, заполнить таблицу.

Примеры специфических препаратов:

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

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

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

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

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

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

**Работа 10**

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

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

**Методика:**

Используются демонстрационные препараты.

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

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

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

1. Определение активности фагоцитоза и фагоцитарного показателя:

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

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

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

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

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

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

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

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

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Иммунитет (определение)  Формы иммунитета по происхождению  Формы врожденного иммунитета  Формы приобретенного иммунитета  Механизмы иммунитета  Перечислите неспецифические механизмы клеточного (тканевого) иммунитета  Назовите гуморальные неспецифеческие факторы защиты  Эффекторы специфических механизмов клеточного и гуморального иммунитета  Виды иммунокомпетентных клеток  Антигены (определение)  Назовите качества антигенов  Иммуногенность (определение)  Специфичность (определение)  Свойства, определяющие иммуногенность антигена  Специфичность антигена определяется  Антигены бактерий с учетом их локализации  Виды специфичности микробных антигенов  Антитела (определение)  Классы иммуноглобулинов  Иммунологические реакции (реакции иммунитета, серологические реакции) – определение:  Фазы реакций иммунитета  Практическое применение иммунологических реакций  Диагностический препарат для поиска  АГ, это –  Состав диагностической сыворотки  Получение диагностических сывороток  Монорецепторные сыворотки содержат:  Моноклональные антитела, это –  Метод диагностики для поиска антител (АТ)  Диагностический препарат для поиска АТ (название)  Состав диагностикума  Суть анамнестических реакций (следовых)  Компоненты реакции агглютинации (РА) для определения вида бактерий (бактериологический метод)  Компоненты реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) для определения антител  Компоненты реакции прямой иммунофлюоресценции (РИФ) для поиска АГ (экспресс-диагностика)  Компоненты реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) для поиска АГ (экспресс-диагностика)  Компоненты реакции связывания комплемента (РСК для поиска АТ)  Компоненты иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител |  | Способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих признаки генетически чужеродной информации  Врожденный и приобретенный   1. Иммунитет новорожденных 2. Видовой иммунитет 3. Естественный (активный и пассивный) 4. Искусственный (активный и пассивный) 5. Клеточные (тканевые) 6. Гуморальные 7. Патофизиологические 8. Бактерицидность кожи и слизистых 9. Барьер-фиксирующая способность лимфатических узлов 10. Фагоцитоз 11. Клеточная ареактивность 12. Воспаление 13. Естественные киллеры 14. Система комплемента 15. Лизоцим 16. Бета-лизины 17. Пропердин 18. Лейкины и другие вещества, обуславливающие бактерицидную активность сыворотки крови (БАС).   Иммунокомпетентные клетки и антитела   1. Лимфоциты (Т- и В-) 2. Макрофаги   Вещества, которые вызывают развитие иммунных реакций, в частности, выработку антител и специфически взаимодействуют с ними  Иммуногенность и специфичность  Количественная характеристика способности вызвать иммунный ответ  Структурные особенности, благодаря которым антигены отличаются друг от друга и взаимодействуют с антителом   1. Чужеродность 2. Коллоидная структура 3. Макромолекулярность   Химическим строением детерминантной групы (антигенной детерминанты)   1. Соматические 2. Поверхностно-соматические 3. Капсульные 4. Жгутиковые 5. Экзотоксины и ферменты патогенности   Родовая, групповая, видовая, типовая  Специфические гаммаглобулины (иммуноглобулины), образующиеся в организме под влиянием антигена и взаимодействующие с ним.  А, М, G, Е, Д.  Результат специфического взаимодействия антигена с антителами   1. Специфическая 2. Неспецифическая, определяющая вид реакции иммунитета 3. Диагностика инфекционных заболеваний (поиск АГ или АТ) 4. Оценка состояния поствакцинального иммунитета 5. Оценка иммунного статуса   Иммунная (диагностическая) сыворотка  Специфические антитела для определения вида, типа микроорганизмов, экзотоксинов  Иммунизация животных (чаще кроликов) соответсвующими микробами или их антигенами  Антитела к одной детерминантной группе антигена (видовые, типовые)  АТ к отдельной антигенной детерминанте, синтезируемые одним клоном клеток в гибридоме.  Серологический  Диагностикум  Специфические антигены для определения вида, типа, класса антител  Выявление стабильно низкого уровня специфических антител, как следствие перенесенного в прошлом инфекционного процесса либо вакцинации   1. Исследуемая чистая культура бактерий 2. Видовая диагностическая сыворотка 3. Электролит 4. Сыворотка крови обследуемого 5. Эритроцитарныйдиагностикум 6. Электролит 7. Исследуемый материал 8. Специфическая люминесцентная сыворотка 9. Люминесцентный микроскоп 10. Исследуемый материал 11. Специфическая сыворотка 12. Антиглобулиновая люминесцентная сыворотка 13. Люминесцентный микроскоп 14. Сыворотка обследуемого 15. Диагностикум 16. Комплемент 17. Гемолитическая сыворотка 18. Эритроциты барана 19. Диагностикум на твердой фазе 20. Сыворотка обследуемого 21. Антиглобулиновая сыворотка, меченая ферментом (пероксидазой) 22. Субстрат для фермента с индикатором на его активность |
| Группы факторов, определяющих иммунный статус  Показатели клеточных факторов неспецифической защиты  Показатели гуморальных факторов неспецифической защиты  Показатели клеточных факторов специфической защиты  Показатели гуморальных факторов специфической защиты  Тесты 1-ого уровня оценки иммунного статуса  Тесты 2-ого уровня оценки иммунного статуса |  | 1. Неспецифические (клеточные и гуморальные) 2. Специфические (клеточные и гуморальные) 3. Фагоцитоз: процент (индекс Гамбургера), число (индекс Райта), завершенность 4. Естественные киллеры (процент) 5. Бактерицидная активность сыворотки БАС (процент) 6. Лизоцим сыворотки (мкг/мл) 7. Комплемент (усл.ед) 8. Бета-лизины (усл.ед) и др. 9. Т-лимфоциты: процент (Е-розетки), функциональная активность (бласттрансформация) 10. В-лимфоциты: процент (ЕАС-розетки), функциональная активность (бласттрансформация)   Сывороточные иммуноглобулины разных классов: количество в мкг/мл (реакция преципитации в геле)   1. Число (процент) Т- и В-лимфоцитов 2. Фагоцитоз 3. Уровни иммуноглобулинов разных классов 4. Уровень факторов неспецифической защиты 5. Субпопуляции Т-лимфоцитов (процент) 6. Функциональная активность Т- и В-лимфоцитов 7. Определение медиаторов иммунной системы 8. Тесты на ГЧЗТ |
| Специфические лечебно-профилактические препараты, действующие на микроорганизмы (возбудителя), это –  Состав сывороток, гаммаглобулинов  Преимущество гаммаглобулинов перед сыворотками  Получение сывороток (гамма-глобулинов)  Механизм лечебного действия сывороток, гамма-глобулинов  Профилактика анафилактического шока  Механизм действия бактериофага  Показания к применению препаратов, действующих на возбудителя (патогена)  Специфические лечебно-профилактические препараты, действующие на макроорганизм, это-  Состав вакцин  Получение вакцин  Типы вакцин по происхождению  Механизм действия вакцин  Новые поколения вакцин: |  | 1. Сыворотки 2. Гаммаглобулины 3. Бактериофаги   Известные антитела   1. Концентрированные антитела 2. Отсутствие балластных белков   Иммунизация животных и человека препаратом с известным антигеном (вакциной)   1. Нейтрализация антигенов – факторов вирулентности возбудителя 2. Формирование пассивного иммунитета   Дробное введение сыворотки по методу А.М.Безредки  Лизис возбудителя   1. Лечение 2. Экстренная профилактика (контактных лиц)   Вакцины  Известные антигены  Из микроорганизмов (токсинов) определенного вида   1. Корпускулярные: живые, убитые 2. Лизат: химические, анатоксины   Формирование активного иммунитета   1. Генно-инженерные 2. Генетические 3. Идиотипические |
| Инфекционная аллергия (определение)  Анафилаксия (определение)  Синоним термина «Аллергия»  Гиперчувствительность по механизму формирования классифицируется на 2 типа:  Роль инфекционной аллергии при заболевании  Использование в медицине состояния инфекционной аллергии  Виды анафилаксий  Стадии анафилактической реакции  Меры профилактики анафилактического шока при повторном парентеральном введении антигена (иммунная чужеродная сыворотка)  Диагностические препараты для постановки аллергических проб, это –  Примеры аллергенов |  | Состояние повышенной чувствительности на повторное действие микробов или продуктов их распада  Состояние повышенной чувствительности на повторное парентеральное введение аллергена (чаще белка)  Гиперчувствительность (ГЧ)   1. ГЧНТ – немедленного типа 2. ГЧЗТ – замедленного типа 3. Защитная 4. Патогенетическая 5. Диагностика инфекционных заболеваний (аллергическая проба) 6. Прогноз течения болезни 7. Решение вопроса о ревакцинации 8. Системные (шок, сывороточная болезнь) 9. Местные (реакция Артюса) 10. Стадия сенсибилизации 11. Стадия разрешения   Десенсибилизация организма введением малых доз сыворотки (метод А.М.Безредки)  Аллергены – специфические антигены, выявляют состояние инфекционной аллергии  Туберкулин, бруцеллин, тулярин, др |