

Болтаева К. Ш.

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ПО МОДУЛЮ
МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Учебное пособие
для высших учебных заведений**

**«IBN-SINO»
ТАШКЕНТ-2022**

УДК: 616.831-055.2
ББК 54.10
К 35

Учебное пособие по модулю микробиология
[Текст]: Учебное пособие -Т.,2022.«Издательство IBN-SINO».
355 с.Болтаева К. Ш.

Рецензенты:

1.Заведующий лабораторией фармако- токсикологического анализа
координационных соединений и биологически активных веществ
ТашФарми д.м.н. Саидов С.А.

2.Заместитель директора по научной работе института Микробиологии
АНРУз д.б.н. Миралимова Ш.М.

Учебное пособие по микробиологии, подготовленное К.Ш.Болтаевой составлено на основе учебной программы по микробиологии, утверждённой согласно № 107 приказа Министерства Здравохранения Республики Узбекистан от 25.04.2019 г. Для студентов 2 –го курса направления 5510500 – фармация. Без микробиологических знаний невозможно рациональное производство обширного ряда лечебно - профилактических средств: антибиотиков и вакцин, иммунных сывороток, диагностикумов и многих лекарственных препаратов. В работе каждого провизора, каждого аптечного работника и инженера антибиотической промышленности и вакцино-сывороточного дела микробиология необходима для производства соответствующих препаратов, для оценки качества продукции, для познания виновников порчи лекарственного сырья и препаратов, для обеспечения рентабельности технологии лекарственных средств, рационального хранения их и организации санитарно-гигиенических условий производства. Провизору необходимы конкретные знания о возбудителях заразных заболеваний человека и животных; об условиях, препятствующих их развитию, и о средствах, повреждающих их жизнеспособность.

ISBN: 978-9943-8261-9-9

© Болтаева К. Ш.
© «Издательство "IBN-SINO"» 2022.

ВВЕДЕНИЕ

Всестороннее изучение микроорганизмов составляет предмет и задачи микробиологии. Распространение микробов обширное, повсеместное. Они обитают в воде и почве, развиваются на различных минеральных и органических субстратах. Живут в организме различных растений и животных. Населяют слизистые и кожные покровы человека, а болезнетворные из них поражают различные ткани и органы.

Хозяйственно полезные микробы широко используются теперь в бродильной промышленности, масломолочном хозяйстве, в сыроварении. Они применяются в производстве различных органических кислот, красящих веществ, витаминов, аминокислот и многих других соединений, получение которых чисто химическим путем или нерентабельно, или невозможно.

Некоторые микроорганизмы, например кормовые дрожжи, богатые белковыми веществами, углеводами, витаминами специально размножаются на дешёвых питательных средах и используются для кормления домашних животных, птиц.

За последние годы микробы используются в качестве моделей для познания закономерностей наследственной передачи тех или иных признаков и полезных свойств, для получения разнообразных продуктов микробной жизнедеятельности.

Болезнетворные микробы, особенно вирусы, причиняют большой ущерб здоровью человека и животных: повреждают различные ткани и органы, отравляют организм токсическими продуктами их жизнедеятельности, являются смертоносными при целом ряде инфекционных заболеваний.

Некоторые микроорганизмы являются виновниками порчи разнообразных пищевых продуктов, напитков, с микробами связаны широко распространённые в природе процессы гниения и разрушения растительных пород, жилищных сооружений, железнодорожных построек, мостов и т. п.

Нетрудно видеть разнообразие задач и возможностей использования микроорганизмов, многообразие микробиологических исследований применительно к разным целям и различным микроорганизмам. Широки перспективы микробиологии и взаимосвязь ее с различными отраслями современной науки и промышленности.

Без микробиологических знаний немыслимо рациональное производство обширного ряда лечебно - профилактических средств: антибиотиков и вакцин, иммунных сывороток, диагностикумов и многих лекарственных препаратов.

В работе каждого провизора, каждого аптечного работника и инженера антибиотической промышленности и вакциносывороточного дела микробиология необходима для производства соответствующих препаратов, для оценки качества продукции, для познания виновников порчи лекарственного сырья и препаратов, для обеспечения рентабельности технологии лекарственных средств, рационального хранения их и организации санитарно-гигиенических условий производства.

Провизору необходимы конкретные знания о возбудителях заразных заболеваний человека и животных; об условиях, препятствующих их развитию, и о средствах, повреждающих их жизнеспособность. Без этих сведений провизор не сможет обеспечить ответы на постоянные запросы населения о средствах повреждения микробов в ближайшем окружении больных, об антисептических и дезинфекционных препаратах, об антибиотиках и важности правильного режима их применения.

С постоянным ростом культуры и благополучия населения, с неуклонным развитием профилактической медицины правильные сведения о заразных заболеваниях, всемерная пропаганда санитарных знаний способствуют успехам гигиенических мероприятий, повышению здоровья трудящихся.

ГЛАВА 1. ЗНАКОМСТВО С УСТРОЙСТВОМ И РАБОТОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА - МАЗКА. ПРОСТОЙ МЕТОД ОКРАСКИ ПРЕПАРАТОВ.

1.1 Микробиологические лаборатории

Задача медицинской микробиологической лаборатории - диагностика инфекционных болезней. Для этого проводят выделение возбудителя и определение иммунного ответа организма на внедрение микроорганизмов (серологическая диагностика). Кроме того, проводят выявление носителей патогенных (болезнетворных) микроорганизмов. Имеются лаборатории, в которых проводят вирусологические исследования. В специальных санитарно-бактериологических лабораториях проводят исследования с целью выявления степени микробного загрязнения внешней среды и различных объектов.

Материалом для микробиологических исследований служат чаще всего выделения человека (испражнения, моча, рвотные массы, мокрота, отделяемое ран), а также кровь, желчь, спинномозговая жидкость, промывные воды желудка, бронхов, трупный (секционный) материал и др.

Работа в микробиологической лаборатории с заразным материалом делает обязательным размещение ее в изолированном помещении. Для выполнения всех правил работы с заразным материалом и проведения микробиологических исследований лаборатория должна иметь несколько помещений:

1. Лабораторные комнаты.
2. Бокс с предбоксником.
3. Помещение для приготовления питательных сред.
4. Моечная.
5. Препараторская.
6. Стерилизационная (убивочная).
7. Регистратура.
8. Виварий.

Лабораторная комната предназначена для проведения микробиологических исследований. Она должна быть просторной и светлой. Стены красят светлой масляной краской, пол покрывают

линолеумом, лабораторные столы - пластиком или стеклом, что удобно для влажной уборки и дезинфекции. В лабораторной комнате оборудуют: рабочие столы для врача и лаборанта, место для окраски препаратов, термостат, холодильник, центрифугу, микроскоп, шкафы, раковину с подводкой горячей и холодной воды, газовые горелки (при отсутствии газа работают со спиртовыми горелками).

Число лабораторных комнат определяется объемом работы лаборатории. В крупных лабораториях выделяют отдельные комнаты для работы с различными видами возбудителей.

Рабочий стол устанавливают у окна, чтобы свет падал сбоку или прямо. На столе размещают горелку, бактериологические петли, банки с дезинфицирующим раствором и ватой.

Внимание! Перед началом работы на столе размещают все необходимое для проведения исследования. Горелку устанавливают на расстоянии, равном предплечью работающего, т. е. в позиции, исключающей лишние движения во время работы. Размер пламени в горелке и правильное свечение регулируют до начала работы.

В термостате при проведении обычных исследований температура должна быть 37 °С. В больших лабораториях может быть оборудована специальная термальная комната. Температуру ежедневно регистрируют.

В холодильнике держат некоторые питательные среды, диагностические препараты, кровь, желчь и пр.

Центрифугу используют для отделения плотных частиц от жидкости (например, эритроцитов от сыворотки).

В шкафах держат штативы, посуду, сухие питательные среды, реактивы и т.п. Около раковины должны находиться сосуд с дезинфицирующим раствором для обработки рук и аптечка с набором предметов для оказания первой медицинской помощи.

Бокс - строго изолированное помещение для проведения микробиологической работы в условиях, требующих особой стерильности. Обеззараживание воздуха проводят с помощью бактерицидных ламп (БУВ-15, БУВ-30 и др.) или водяной бани (перед работой бокс обрабатывают паром кипящей воды с дезинфицирующим раствором). Подача в бокс через приточно-вытяжную вентиляцию обеззараженного воздуха определенной температуры и влажности является лучшим способом обеспечения нужных условий для работы. Обычно в боксе работают два человека.

Входят в бокс через предбоксник, в котором переодеваются (халат, тапочки, шапочка, маска) и переходят в бокс через вторую дверь. Внимание! В боксе не разговаривают и избегают лишних движений.

Условия для лабораторных помещений:

В регистратуре, или части помещения ее заменяющей, принимают и регистрируют материал, поступающий для исследования, и выдают заключения микробиологического исследования.

Помещение для приготовления питательных сред должно находиться рядом с моечной и стерилизационной. В этой комнате должна быть раковина с подводкой горячей и холодной воды, дистиллятор, плита (газовая или электрическая), шкафы или стеллажи для хранения сухих питательных сред, химических реактивов, стерильной посуды.

Моечная - комната для мытья и обработки посуды, которая должна иметь раковину (с холодной и горячей водой) и плиту. Моечную оборудуют столами, стеллажами, снабжают приспособлениями для мытья посуды: моющими средствами, ершами, тряпками.

В стерилизационной находятся приборы для стерилизации чистой посуды, питательных сред и обеззараживания отработанного материала: автоклавы, сушильный шкаф и др. При наличии отдельной препараторской комнаты ее используют для подготовки, упаковки посуды и другой подсобной работы.

Виварий - помещение для содержания экспериментальных животных, имеется только в больших лабораториях.

1.2.Правила поведения и работы в микробиологической лаборатории.

1. К работе допускают сотрудников только после ознакомления с правилами поведения и режимом работы.
2. Все работники подвергаются профилактическим прививкам, главным образом против кишечных инфекций.
3. Каждый сотрудник имеет халат и шапочку; в лаборатории носят сменную обувь.
4. Каждый сотрудник обязан строго соблюдать личную гигиену, содержать в чистоте рабочее место.
5. Поступающий в лабораторию материал регистрируют в специальный журнал и маркируют.
6. Весь поступающий материал для исследования считают инфицированным (заразным). Его ставят на специальный поднос, а

емкость с материалом протирают дезинфицирующим раствором снаружи.

7. Переливать исследуемый материал из одной емкости в другую следует над дезинфицирующим раствором. Жидкий материал отсасывают с помощью резинового баллона, надетого на пипетку.

8. При попадании исследуемого материала на руки, стол или другие предметы их обрабатывают дезинфицирующим раствором.

9. По окончании работы руки, инструменты, рабочее место обрабатывают дезинфицирующим раствором. Культуры обезвреживают или, при необходимости, сохраняют в холодильнике, который опечатывают. Материал, требующий продолжения исследования, ставят в термостат, который тоже опечатывают. При хранении патогенных культур в лаборатории их регистрируют в специальном журнале. Указывают количество культур, даты их поступления, посева, уничтожения.

10. В лаборатории категорически запрещается принимать пищу и курить.

11. В лаборатории ежедневно проводят влажную уборку помещений с применением дезинфицирующих растворов. Ежедневно моют стены, полы, инвентарь горячей водой с мылом. Бокс убирают в конце рабочего дня, а перед работой облучают бактерицидными лампами.

1.3 Систематика и номенклатура микроорганизмов.

Микроорганизмом называется любой организм, имеющий микроскопические размеры и невидимый невооруженным глазом. В системе живых организмов микроорганизмы занимают особое положение, имея черты сходства и различия с клетками растительного и животного происхождения. Широкое использование электронной микроскопии и цитохимических методов в изучении тонкой структуры клеток дало возможность выделить два типа клеток: эукариотической и прокариотической.

Эукариотическая клетка содержит ядро с выраженной ядерной оболочкой, пластинчатым комплексом (аппарат Гольджи) и мембранными структурами, такими, как митохондрии и хлоропласты, в которых находится часть клеточного генома; эта клетка является структурной основой животных и растений. Из микроорганизмов к

эукариотам относятся простейшие, грибы, водоросли (за исключением сине-зеленых).

Одной из особенностей прокариотической клетки является отсутствие системы мембран. У большинства прокариотов имеется лишь цитоплазматическая мембрана с ее сложным строением и многочисленными функциями. Наследственная информация прокариотов сосредоточена в одной молекуле ДНК, которая и выполняет функцию ядра.

Все микроорганизмы, существующие в биосфере Земли, относятся к трем царствам природы:

I. Эукариоты – простейшие и грибы.

II. Прокариоты – цианобактерии – сине-зеленые водоросли, получающие энергию за счет фотосинтеза, и скотобактерии, нейтральные к свету, дифференцирующиеся в свою очередь на три класса:

1. Bacteria (включает кокки, палочки, актиномицеты, спириллы, спирохеты).

2. Rickettsiae.

3. Mollicutes.

III. Особое царство – Vira – составляют вирусы, среди которых выделяются паразиты микроорганизмов – фаги, возбудители заболеваний высших растений, животных и человека.

Классификация микроорганизмов, а также критерии, согласно которым определяется таксономическое положение, периодически меняются.

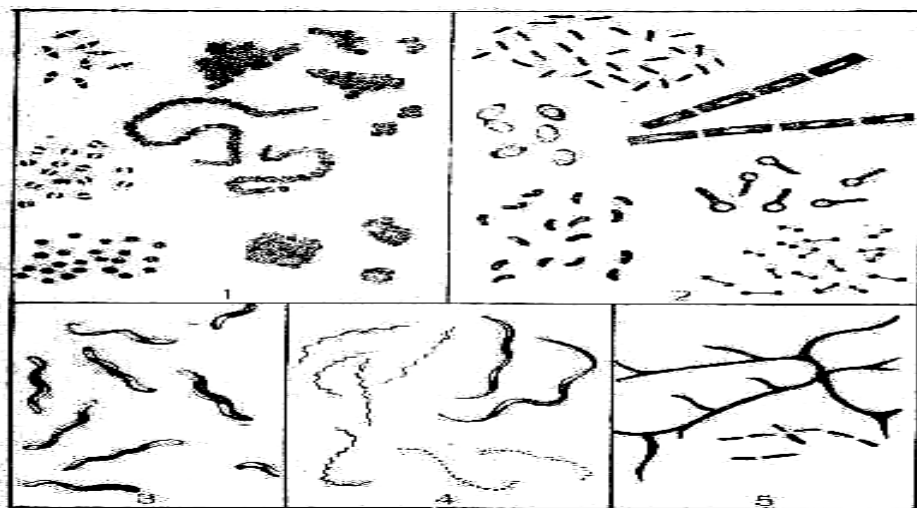


Рис.1. Скотобактерии. Класс Bacteria.

1-кокки; 2-палочки; 3-спириллы; 4-спирохеты; 5-актиномицеты

В старом издании «Руководства Берджи по определению бактерий», все прокариоты распределены на 19 групп. Такая классификация служит в основном практическим целям для распознавания бактерий, т.е. идентификации видовой принадлежности, в основе которой лежит определение ряда морфологических, тинкториальных и биологических свойств выделяемых культур. В соответствии 2 ому изданию (2001 г.) «Руководства Берджи бактерии делят на 2 домена: «Bacteria» и «Archaea» (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика доменов «Bacteria» и «Archaea»

Домен «Bacteria» (эубактерии)	Домен «Archaea» (архебактерии)
В домене «Bacteria» выделяют следующие: 1) бактерии с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные*; 2) бактерии с толстой клеточной стенкой, грамположительные**; 3) бактерии без клеточной стенки (класс Mollicutes - микоплазмы)	Архебактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Они имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (рРНК). Термин «архебактерии» появился в 1977 г. Это одна из древних форм жизни, на что указывает приставка «архе». Среди них нет возбудителей инфекций

*Среди тонкостенных грамотрицательных эубактерий различают:

- сферические формы, или кокки (гонококки, менингококки, вейлонеллы);
- извитые формы - спирохеты и спириллы;
- палочковидные формы, включая риккетсии.

** К толстостенным грамположительным эубактериям относят:

- сферические формы, или кокки (стафилококки, стрептококки, пневмококки);
- палочковидные формы, а также актиномицеты (ветвящиеся, нитевидные бактерии), коринебактерии (булавовидные бактерии), микобактерии и бифидобактерии (рис. 2.)

Классификация микробов

Большинство грамотрицательных бактерий объединены в тип протеобактерий, основанный на сходстве по рибосомной РНК («Proteobacteria» – по имени греческого бога Протеуса, принимавшего разнообразные облики). Они появились от общего фотосинтетического предка.

Грамположительные бактерии, согласно изученным последовательностям рибосомной РНК, являются отдельной филогенетической группой с двумя большими подотделами – с высоким и низким соотношением G+C (генетическое сходство). Как и протеобактерии, эта группа метаболически разнообразная.

В домен «Bacteria» входят 22 типа, из которых медицинское значение имеют следующие:

Тип Proteobacteria

Класс Alphaproteobacteria. Роды: Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Bartonella, Brucella

Класс Betaproteobacteria. Роды: Burkholderia, Alcaligenes, Bordetella, Neisseria, Kingella, Spirillum

Класс Gammaproteobacteria. Роды: Francisella, Legionella, Coxiella, Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Vibrio, Enterobacter, Callimatobacterium, Citrobacter, Edwardsiella, Erwinia, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Yersinia, Pasteurella

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейллонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

*Расположение спор: 1 - центральное, 2 - субтерминальное, 3 - терминально

Рис. 2. Формы грамотрицательных и грамположительных бактерий (эубактерий).

Класс Deltaproteobacteria. Род: Bilophila

Класс Epsilonproteobacteria. Роды: Campylobacter, Helicobacter, Wolinella

Тип Firmicutes (главным образом грамположительные)

Класс Clostridia. Роды: Clostridium, Sarcina, Peptostreptococcus, Eubacterium, Peptococcus, Veillonella (грамотрицательные)

Класс Mollicutes. Роды: Mycoplasma, Ureaplasma

Класс Bacilli. Роды: Bacillus, Sporosarcina, Listeria, Staphylococcus, Gemella, Lactobacillus, Pediococcus, Aerococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Lactococcus

Тип Actinobacteria

Класс Actinobacteria. Роды: Actinomyces, Arcanobacterium, Mobiluncus, Micrococcus, Rothia, Stomatococcus, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Propionibacterium, Bifidobacterium, Gardnerella

Тип Chlamydiae

Класс Chlamydiae. Роды: Chlamydia, Chlamydophila

Тип Spirochaetes

Класс Spirochaetes. Роды: Spirochaeta, Borrelia, Treponema, Leptospira

Тип Bacteroidetes

Класс Bacteroidetes. Роды: Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella

Класс Flavobacteria. Роды: Flavobacterium

Подразделение бактерий по особенностям строения клеточной стенки связано с возможной вариабельностью их окраски в тот или иной цвет по методу Грама. Согласно этому методу, предложенному в 1884 г. датским ученым Х. Грамом, в зависимости от результатов окраски бактерии делятся на грамположительные, окрашиваемые в сине-фиолетовый цвет, и грамотрицательные, красящиеся в красный цвет. Однако оказалось, что бактерии с так называемым грамположительным типом клеточной стенки (более толстой, чем у грамотрицательных бактерий), например, бактерии рода Mobiluncus и некоторые спорообразующие бактерии, вместо обычной грамположительной окраски имеют грамотрицательную окраску. Поэтому для таксономии бактерий большую значимость, чем окраска по Граму, имеют особенности строения и химического состава клеточных стенок.

1.4 Этапы приготовления мазков-препаратов.

Приготовление состоит из нескольких последовательных операций: подготовка мазка, высушивание, фиксация и окраска.

Исследуемый материал наносят на чистое обезжиренное предметное стекло. Для взятия бактериальной культуры:

- нагревают до покраснения бактериальную петлю в пламени горелки;

- берут пробирку с исследуемой культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность среды; вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянным пальцами правой руки к ладони;

- обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут исследуемый материал;

- вынимают петлю, обжигают край пробирки и закрывают пробкой.

- взятый материал осторожно распределяют по предметному стеклу тонким слоем, после чего бактериальную петлю стерилизуют в пламени спиртовки;

- если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной среде, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора

- мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем горелки. Нельзя допускать закипания материала, т.к. при этом может нарушиться структура микроорганизмов.

- фиксация препарата: высушенные мазки подвергают термической (предметное стекло (мазком вверх) проводят несколько раз через пламя горелки) или химической (фиксирующие растворы: формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнау, ацетон, пары осмиевой кислоты) обработке, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла.

Исследование висячей капли

Используют специальное стекло с луночкой, покровное стекло, вазелин. Края луночки покройте небольшим слоем вазелина. На покровное стекло пастеровской пипеткой нанесите каплю исследуемого материала. Затем осторожно стекло с луночкой накройте покровным стеклом с каплей так, чтобы капля оказалась в центре. Получается герметически закрытая камера, склеившиеся стекла быстро переверните вверх покровным стеклом. Препарат перенесите на предметный столик микроскопа. Конденсор слегка опустите. Сначала под малым увеличением найдите край капли, затем рассмотрите с сильной сухой системой. В капле видно движение

бактерий по типу «ввинчивания в среду». Следует отличать активное поступательное движение бактерий от пассивной броуновской.

Исследование раздавленной капли

На предметное стекло наносят пипеткой каплю культуры и покрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы при этом не образовались пузырьки воздуха, мешающие изучению препарата под микроскопом. Зарисуйте в тетрадь общий вид приготовленного препарата и отдельное поле зрения.

Инновационные методы, применяемые на занятии: деловая игра по методу «Снежков»

Правила игры:

Группа делится на 2-3 подгруппы, которые обсуждают одну и ту же проблему или ситуацию с целью набора наибольшего количества правильных ответов. Каждый правильный ответ записывается как балл этой группе в виде снежков. Группа, давшая наибольшее число правильных ответов, оценивается более высоко.

Комплекс вопросов для проведения деловой игры

- 1) Принципы организации и назначение микробиологических лабораторий.
- 2) Техника приготовления и фиксация мазков.
- 3) Методы окраски.
- 4) Изучение техники микроскопирования микробиологических объектов в иммерсионной системе.
- 5) Техника приготовления препаратов «висячая» и «раздавленная» капли

1.5 Методы окраски препаратов.

Методы окраски делят на ориентировочные (простые) и дифференциальные (сложные), выявляющие химические и структурные особенности бактериальной клетки.

Простой метод окраски. Препарат помещают на подставку для окраски, исследуемым материалом вверх. Пипеткой наносят на него раствор красителя. По истечении указанного времени краситель осторожно сливают, препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. При простом методе используют один краситель. Метиленовым синим и щелочным синим Леффлера

окрашивают препарат в течение 3 - 5 мин, фуксином Пфейффера-1-2 мин.

На окрашенный и высушенный препарат наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с помощью иммерсионной системы.

Контрольные вопросы:

1. Принципы организации и назначение микробиологических лабораторий.
2. Оснащение лаборатории и рабочего места.
3. Правила работы в микробиологической лаборатории.
4. Принципы классификации микроорганизмов.
5. Назвать классы эукариотов.
6. Перечислить представителей класса бактерии.
7. Что такое тинкториальные свойства?
8. Приготовление мазков.
9. Фиксация мазков.
10. Простые методы окраски.

Инновационные методы, применяемые на занятии: Деловая игра «Тур по галерее»

Ход работы:

1. Группа делится на 3 подгруппы.
2. Каждая подгруппа садится за отдельный стол, приготавливает чистый лист бумаги и берёт одну из цветных ручек.
3. На листе пишется дата, название игры, Ф.И. студентов – участников данной группы.
4. Один из участников берёт из конверта карточку.
5. Засекается время 10 мин.
6. В течение 10 мин в подгруппе обсуждается задание, записывается ответ и по окончании времени обмениваются листами с другой подгруппой по кругу.
7. Следующая подгруппа оценивает ответ предыдущей и если ответ неполный дополняет его или предлагает свой вариант ответа, если ответ оценивается как неправильный. На этот этап даётся 10 мин.
8. По окончании работы (30мин.) на листе оказывается 3 записи разными по цвету ручками.
9. Работы сдаются преподавателю.

10. Все участники обсуждают результаты и выбирают наиболее правильные ответы, которые заслуживают высшего балла.
11. На обсуждение отводится 15 мин.
12. Подгруппа, которая дала наиболее правильные ответы, получает максимальный балл – 100% от рейтинга теоретической части занятия. Подгруппа, занявшая второе место – 85,9%, 3 группа – 70,9%.
13. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущей оценки занятия.
14. Работы студентов сохраняются у преподавателей.

Карточка №1

1. Организация микробиологической лаборатории
2. Приготовление мазка
3. Изучение техники микроскопирования микробиологических объектов в иммерсионной системе.

Карточка №2

1. Принципы классификации микроорганизмов.
2. Методы окраски.
3. Приготовление препарата «раздавленная» капля.

Карточка №3

1. Правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Техника приготовления и фиксация мазков.
3. Приготовление препарата «висячая» капля.

1.6. Изучение техники микроскопирования микробиологических объектов в иммерсионной системе. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа № 1

Для бактериоскопического исследования микроорганизмов наиболее часто применяют иммерсионные объективы. В отличие от сухих объективов, при работе с которыми между препаратом и линзой объектива находится воздух, при использовании иммерсионных объективов между линзой объектива и препаратом помещают жидкость, имеющую показатель преломления, близкий

показателю преломления стекла. Роль такой жидкости выполняет иммерсионное масло, чаще всего - кедровое масло. Лучи света, проходя через однородную оптическую среду (стекло и масло), не меняют своего направления. Это позволяет существенно повысить четкость изображения. Иммерсионные объективы отличаются от сухих объективов по своему устройству (подвижная фронтальная линза) и по внешнему виду: на их оправе имеется черная круговая нарезка и выгравировано обозначение МИ (масляная иммерсия). Для микроскопии с иммерсионным объективом требуется хорошее освещение объекта. Для этого используется дополнительная система линз, расположенная под предметным столиком – конденсор. При подготовке микроскопа к работе конденсор с помощью специального винта перемещают вверх до упора. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и помещают стекло на предметный столик. Под визуальным контролем сбоку опускают объектив до соприкосновения с каплей. После погружения объектива в каплю масла вращением макрометрического винта определяют контуры объекта, а затем с помощью микрометрического винта устанавливают четкое изображение объекта. После окончания микроскопии иммерсионный объектив поднимают, препарат убирают, а фронтальную линзу объектива протирают от остатков масла мягкой салфеткой.

ГЛАВА II. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, СТРУКТУРА, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ. СТЕРИЛИЗАЦИЯ И ДЕЗИНФЕКЦИЯ.

2.1 Морфология микроорганизмов.

Микроорганизмы (от лат. *micro* - малый) - организмы, невидимые невооруженным глазом. К ним относятся простейшие, спирохеты, грибы, бактерии, вирусы, изучением которых занимается микробиология. Величина микроорганизмов измеряется в микрометрах (мкм). В микромире существует большое разнообразие форм, которые делятся на группы с учетом общих принципов биологической классификации.

Первой общей биологической классификацией была созданная в XVIII веке система шведского ученого К. Линнея, основанная на морфологических признаках и включавшая животный и растительный мир. С развитием науки в классификации стали учитывать не только морфологические, но и физиологические, биохимические и генетические особенности микроорганизмов. В настоящее время невозможно говорить об единой классификации всех живых организмов: сохраняя единые принципы, классификации макро- и микроорганизмов имеют свои особенности.

Основными ступенями всех классификаций являются: царство - отдел - класс(группа) - порядок - семейство - род - вид. Главной классификационной категорией является вид - совокупность организмов, имеющих общее происхождение, сходные морфологические и физиологические признаки и обмен веществ.

Микроорганизмы относятся к царству прокариотов представители которых, в отличие от эукариотов, не обладают оформленным ядром. Наследственная информация у прокариотов заключена в молекуле ДНК, располагающейся в цитоплазме клетки.

Для микроорганизмов принята в 1980 г. единая международная классификация, в основе которой лежит система, предложенная американским ученым Берги.

Для того чтобы определить, к какому виду относится микроорганизм, необходимо с помощью различных методов изучить его особенности (форму клетки, спорообразование, подвижность,

ферментативные свойства) и по определителю найти его систематическое положение - идентифицировать.

Внутри вида существуют варианты: морфоварианты отличаются по морфологии, биоварианты - по биологическим свойствам, хемоварианты - по ферментативной активности, сероварианты - по антигенной структуре, фаговарианты - по чувствительности к фагам.

Для обозначения микроорганизмов принята общебиологическая бинарная или биномиальная (двойная) номенклатура, введенная К.Линнеем. Первое название обозначает род и пишется с прописной буквы. Второе название обозначает вид и пишется со строчной буквы. Например, *Staphylococcus aureus* - стафилококк золотистый. В названиях могут быть отражены имена исследователей, открывших микроорганизмы: бруцеллы - в честь Брюса, эшерихии - в честь Эшериха и т. д. В ряд наименований включены органы, которые поражает данный микроорганизм: пневмококки - легкие, менингококки - мозговую оболочку и т. д.

Морфология бактерий

Кокки (сoccus, ед. ч.; греч. kokkos зерно, зернышко) - бактерии шаровидной формы. К группе кокки относятся грамположительные и грамотрицательные (микрококки, диплококки, стрептококки, сарцины, стафилококки) и (группа А) имеются возбудители скарлатины, ревматизма и др.

Кокки могут вызывать воспалительные процессы в коже, слизистых оболочках и соединительной ткани, ангину, эндокардит, пищевые токсикоинфекции и интоксикации, сепсис и др. Многие кокки условно патогенны.

Кокки различаются по взаимному расположению отдельных клеток. Стафилококки располагаются в виде гроздьев, стрептококки (энтерококки) формируют цепочки, диплококки располагаются парно, микрококки образуют скопления неправильной формы, сарцины - скопления кубической формы. Диаметр кокков колеблется от 0,2 до 2,5 мкм. Кокки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки). Некоторые кокки, относящиеся к роду нейссерий (гонококки, менингококки), по форме напоминают кофейное зерно. Большинство кокков аэробы или факультативные анаэробы. Кокки выделяют экзотоксины (стафилококки), гемолизины (стафилококки и стрептококки), фибринолизин и гиалуронидазу (стафилококки, стрептококки, пневмококки), после гибели

освобождаются эндотоксины (пневмококки, менингококки, гонококки).

Палочковидные бактерии - могут различаться формой концов клетки: закругленный, заостренный, обрубленный. Некоторые представители этой группы могут быть слегка изогнутыми (вибрионы). Палочки размножаются поперечным делением, после чего особи разъединяются и только у небольшого числа бактериальных видов остаются соединенными по две особи или в виде цепочки.

Извитые формы - спиралевидные бактерии, например спириллы, имеющие вид штопорообразно извитых клеток. К патогенным спириллам относится возбудитель содоку (болезнь укуса крыс). К извитым также относятся кампилобактерии и хеликобактерии, имеющие изгибы как у крыла летящей чайки; близки к ним и такие бактерии, как спирохеты.

Спирохеты – тонкие, длинные, извитые (спиралевидной формы) бактерии, отличающиеся от спирилл подвижностью, обусловленной сгибательными изменениями клеток. Спирохеты состоят из наружной мембраны (клеточной стенки), окружающей протоплазматический цилиндр с цитоплазматической мембраной и аксиальной нитью (аксистилю). Аксиальная нить находится под наружной мембраной клеточной стенки (в периплазме) и как бы закручивается вокруг протоплазматического цилиндра спирохеты, придавая ей винтообразную форму (первичные завитки спирохет). Аксиальная нить состоит из периплазматических фибрилл – аналогов жгутиков бактерий и представляет собой сократительный белок флагеллин. Фибриллы прикреплены к концам клетки и направлены навстречу друг другу. Другой конец фибрилл свободен. Число и расположение фибрилл варьируют у разных видов. Фибриллы участвуют в передвижении спирохет, придавая клеткам вращательное, сгибательное и поступательное движение. При этом спирохеты образуют петли, завитки, изгибы, которые названы вторичными завитками. Спирохеты плохо воспринимают красители. Обычно их окрашивают по Романовскому-Гимзе или серебрением. В живом виде спирохеты исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

Спирохеты представлены 3 родами, патогенными для человека: *Treponema*, *Borellia*, *Leptospira*.

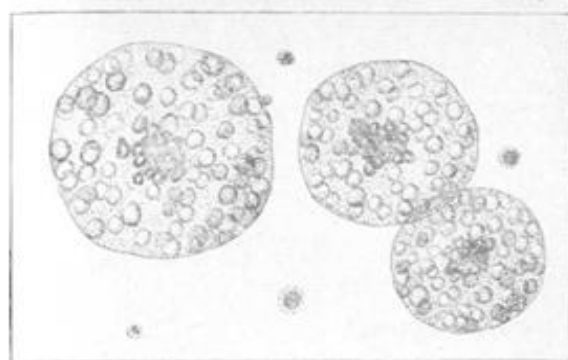
Трепонемы (род *Treponema*) имеют вид тонких штопорообразно закрученных нитей с 8–12 равномерными мелкими завитками. Вокруг протопласта трепонем расположены 3–4 фибриллы (жгутики). В цитоплазме имеются цитоплазматические филаменты. Патогенными представителями являются *T. pallidum* – возбудитель сифилиса, *T. pertenue* – возбудитель тропической болезни – фрамбезии. Имеются и сапрофиты – обитатели полости рта человека, ила водоемов.

Бореллии (род *Borrelia*), в отличие от трепонем, более длинные, имеют по 3–8 крупных завитков и 7–20 фибрилл. К ним относятся возбудитель возвратного тифа (*B. recurrentis*) и возбудители болезни Лайма (*B. burgdorferi* и др.).

Лептоспирсы (род *Leptospira*) имеют завитки неглубокие и частые – в виде закрученной веревки. Концы этих спирохет изогнуты наподобие крючков с утолщениями на концах. Образую вторичные завитки, они приобретают вид букв S или C; имеют 2 осевые нити (жгутики). Патогенный представитель *L. interrogans* вызывает лептоспироз при попадании в организм с водой или пищей, приводя к развитию кровоизлияний и желтухи.

МИКОПЛАЗМЫ

Микоплазмы (рис.2) - клетки, не имеющие клеточной стенки, но окруженные трехслойной липопротеидной цитоплазматической мембраной.



2-рис.коллоны микопл

Микоплазмы могут быть сферической, овальной формы, в виде нитей и звезд. Микоплазмы по классификации Берги выделены в отдельную группу. В настоящее время этим микроорганизмам уделяется все большее внимание как возбудителям заболеваний воспалительного характера. Размеры их различны: от нескольких микрометров до 125–150 нм. Мелкие микоплазмы проходят через бактериальные фильтры и называются фильтрующимися формами.

РИККЕТСИИ

Риккетсии- микроорганизмы размером от 0,2 до 30 мкм. Они имеют обычное для бактерий строение клетки: двухслойную оболочку, цитоплазму, нуклеоид. По форме риккетсии могут быть палочковидными, нитевидными и кокковидными (рис.3,4). Все риккетсии внутриклеточные паразиты, т. е. могут развиваться только в клетках живого организма. Они вызывают такие инфекционные заболевания, как сыпной тиф и различные лихорадки. Переносчиками риккетсии являются членистоногие: клещи, вши и блохи, в организме которых риккетсии размножаются.

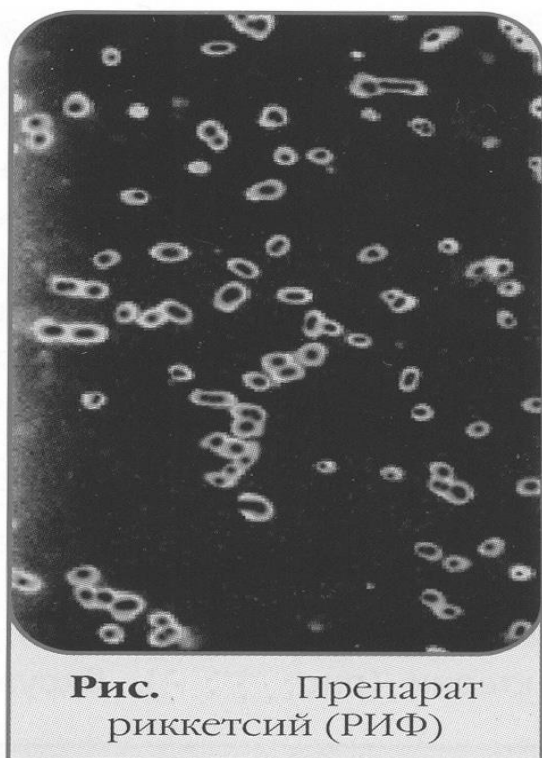


Рис. Препарат риккетсий (РИФ)

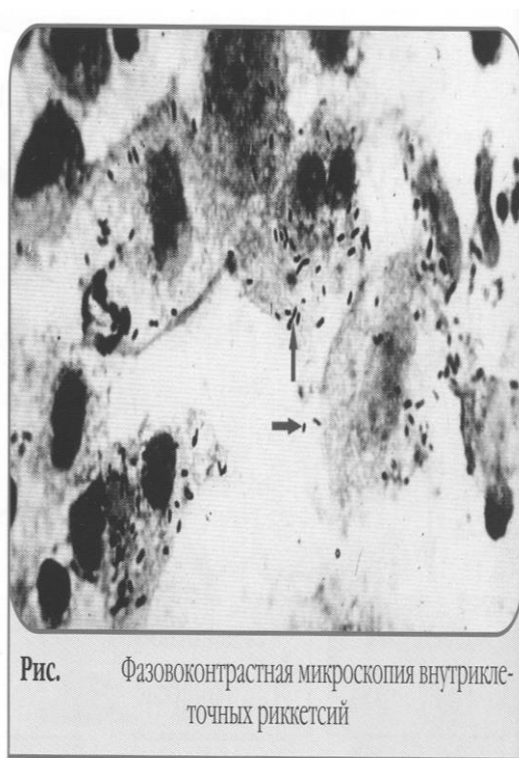


Рис. Фазовоконтрастная микроскопия внутриклеточных риккетсий

АКТИНОМИЦЕТЫ

Для актиномицетов характерно нитевидное или палочковидное и кокковидное строение и наличие боковых выростов; все они окрашиваются по Граму. (рис.5) К актиномицетам относятся: собственно актиномицеты (род *Actinomyces*), образующие споры на спороносцах, формирующиеся в виде длинных цепочек путём сегментации или фрагментации спороносцев;

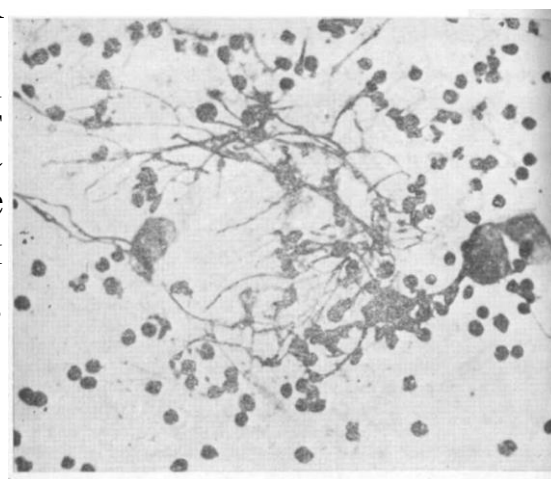


Рис.5

проактиномицеты (*Proactinomyces*) с хорошо развитым мицелием, распадающимся на палочки и кокки; микобактерии (*Mycobacterium*) с типичным ветвлением мицелия в виде палочковидных клеток, размножающихся делением (перешнуровыванием); микококки (*Mycococcus*) в виде округлых неправильно очерченных клеток (часто с боковыми выростами — почками), размножающихся перешнуровыванием и почкованием; микромоноспоры (*Micromonospora*) — группа, объединяющая 4 рода (*Micromonospora*, *Microbispora*, *Micropolyspora* и *Actinobifida*); формы со сложными органами плодоношения — спорангиями со спорами внутри (*Streptosporangium*, *Actinosporangium* и др.); формы, образующие споры со жгутиками (*Actinoplanes*, *Dermatophilus* и др.).

Актиномицеты широко распространены в почвах, в иле водоёмов, в воздухе и на растительных остатках. Среди актиномицетов имеются патогенные формы, вызывающие актиномикоз, туберкулёз (*Mycobacterium tuberculosis*), дифтерию (*Corynebacterium diphtheriae*); некоторые виды микобактерии поражают растения; проактиномицеты образуют клубеньки на корнях ольхи и др. растений, способствуя их росту. Большинство актиномицетов питается белковыми или небелковыми органическими веществами. Среди актиномицетов есть и автотрофы, а также формы, для которых источником углерода могут служить воски, смолы, парафины, нефть.

Источником азота для них служат нитраты, аммонийные соли, мочевины, аминокислоты и др. Живут актиномицеты в самых разных условиях: в аэробных и анаэробных, при t 5—7°C и 45—70°C. Актиномицеты участвуют в разнообразных почвенных процессах (аммонификация, разложение клетчатки, синтез и разложение перегноя). Многие актиномицеты продуцируют антибиотики, витамины, пигменты, аминокислоты и др. биологически активные вещества.

ВИРУСЫ

Вирусы - мельчайшие организмы неклеточного строения. Вирусная частица носит название вирион. Размеры вирионов составляют от 15 до 400 нм. Большинство вирусов можно увидеть только с помощью электронного микроскопа (рисунок 6).

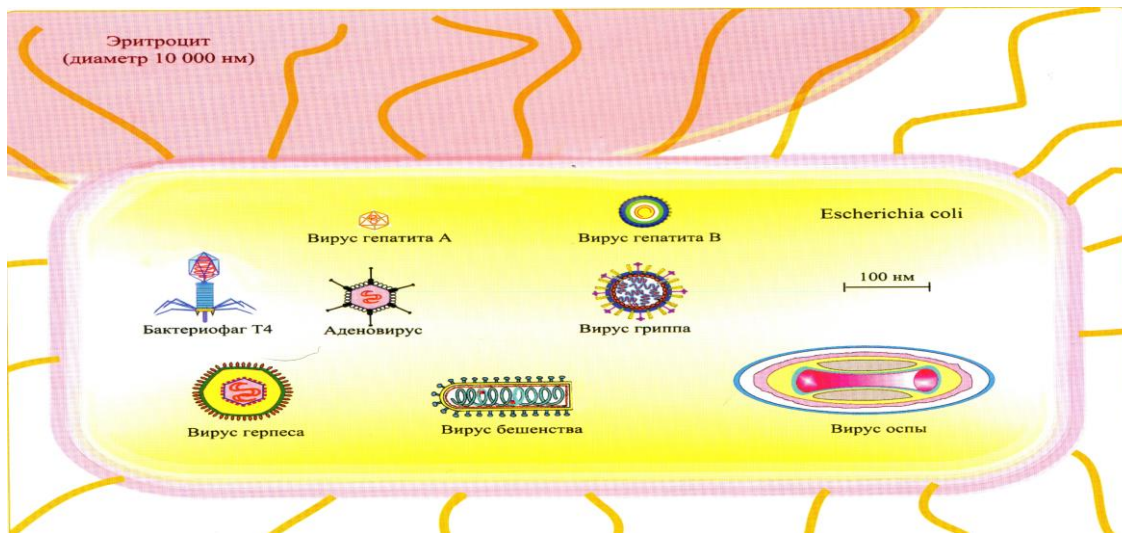


Рисунок 6. Сравнительный размер вирусов.

Оболочка вириона, капсид, состоит из молекул белка. Внутри находится нуклеиновая кислота только одного типа - ДНК или РНК. По типу нуклеиновой кислоты вирусы делятся на две группы ДНК и РНК вирусы. Все вирусы являются облигатными (обязательными) паразитами и в лабораториях культивируются в куриных эмбрионах, организме животных или культуре тканей. Форма вирионов разнообразна: сферическая, палочковидная, кубоидальная и сперматозоидная. Размножение вирусов осуществляется путем раздельного синтеза оболочки и нуклеиновой кислоты в клетке хозяина с последующей сборкой вирионов. Этот процесс называется репродукцией. В организме хозяина некоторые вирусы образуют внутриклеточные включения и элементарные тельца, которые видны в обычном световом микроскопе, так как величины их составляют несколько микрометров. Эти образования имеют диагностическое значение. Вирусы вызывают заболевания бактерий, растений, животных. Важнейшими инфекционными заболеваниями человека вирусной природы являются грипп, корь, полиомиелит, гепатит и бешенство.

Среди вирусов выделяют группу фагов (от лат. phagos - пожирающий), вызывающих лизис (разрушение) клеток микроорганизмов. Сохраняя присущие вирусам свойства и состав, фаги отличаются структурой вириона. Они не вызывают заболеваний человека и животных.

Подцарство простейшие относится к царству эукариот наряду с растениями, животными, грибами. Одноклеточные включают в себя несколько типов: саркомастигофоры, споровики, инфузории и др.

Простейшие могут обитать в океане, море, пресных водоемах, почве, в организмах других животных (т.е. являться паразитами).

Простейшие – организмы, состоящие из одной клетки, которая выполняет функции целостного организма. В клетке простейшего, как и в любой эукариотной клетке, есть ядро, окруженное оболочкой, цитоплазма и клеточные органоиды (митохондрии, комплекс Гольджи и др.). Кроме того, у простейших есть специальные органеллы движения, питания, осморегуляции, защиты и др. Клетка простейшего окружена оболочкой. Некоторые простейшие имеют постоянную форму тела (например, жгутиконосцы), которая обеспечивается довольно плотной оболочкой – пелликулой; другие простейшие, которые не имеют такой оболочки, способны изменять форму тела посредством вытягиваний ложноножек (псевдоподий), которые служат для движения и питания (саркодовые). Другие организмы двигаются с помощью жгутиков или ресничек.

Псевдоподии представляют собой выросты цитоплазмы неопределенной формы, которые могут образоваться в любом месте поверхности клетки.

Жгутики и реснички представляют собой сложные образования, движения которых происходят благодаря специальным белкам. Жгутики находятся на переднем конце одноклеточного, их обычно бывает 1-2 или 4-8; простейший вращает жгутиком благодаря чему движется, при вращении жгутика создается маленький водоворот и частички пищи плывут к клеточному рту.

Реснички расположены по всей поверхности клетки, они также способствуют движению и питанию одноклеточного организма.

Питание клетки может производиться с участием специальных органоидов (клеточный рот, клеточная глотка), а может и без их помощи (например, у саркодовых), при этом клетка питается фагоцитозом. Попадая в клетку, пища (одноклеточные водоросли, бактерии, другие простейшие) оказывается в пищеварительной вакуоли, в которой происходит переваривание пищи под действием пищеварительных ферментов.

Непереваренные остатки пищи выводятся наружу либо в любом месте клетки (саркодовые), либо специальным органоидом – порошицей (например, у инфузорий).

В клетку пресноводных простейших осмотически поступает вода. Излишки воды удаляются сократительными вакуолями, через которые также могут удаляться продукты диссимиляции.

Сократительные вакуоли имеются главным образом у пресноводных простейших, у остальных одноклеточных продукты обмена веществ удаляются через всю поверхность тела.

Кислород, растворенный в воде используется одноклеточными для дыхания, которое происходит всей поверхностью тела.

Размножение одноклеточных происходит путем митоза, но при некоторых условиях может идти половой процесс (у вольвокса – копуляция, у инфузории – конъюгация). Некоторые простейшие являются паразитами (например, споровики) они могут паразитировать и на человеке, вызывая опасные заболевания – лямблиоз, лейшманиоз, малярию, амебиаз, балантидиаз и др.

При неблагоприятных условиях простейшие образуют цисту, по окончании неблагоприятных условий она раскрывается и простейшее начинает активную жизнедеятельность.

У некоторых одноклеточных есть хроматофоры, в которых содержится хлорофилл, благодаря чему они могут осуществлять фотосинтез (эвглена зеленая, вольвокс). Есть также органоиды, способные реагировать на раздражители (например, стигмы у эвглены зеленой). Реакция на раздражитель у простейшего – таксис – может проявляться как в движении в сторону раздражителя (положительный таксис), так и в противоположную от него сторону (отрицательный таксис)

У некоторых простейших есть скелет (например, у лучевиков [саркодовые]), состоящий из кремнезема, у других есть раковины (чаще однокамерные).

Некоторые простейшие способны образовывать колонии.

ГРИБЫ

Грибы являются эукариотами, имеют более сложную, чем бактерии, клеточную организацию. Характерным для грибов является наличие мицелия (грибницы). Мицелий состоит из системы тонких (диаметр 5-10мкм), ветвящихся нитей (гиф), которые стелются по поверхности и могут проникать внутрь субстрата. У низших грибов (Zygomycetes) гифы обычно не имеют перегородок, весь мицелий является одной сильно разветвленной многоядерной клеткой (так называемый несептированный или нечленистый мицелий). У высших грибов (Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes) в гифах мицелия расположены поперечные перегородки или септы, делящие их на отдельные клетки (септированный, многоклеточный

мицелий). Дрожжевые клетки при размножении в определенных условиях могут образовывать псевдомицелий.

Грибы размножаются вегетативным (отдельными частицами

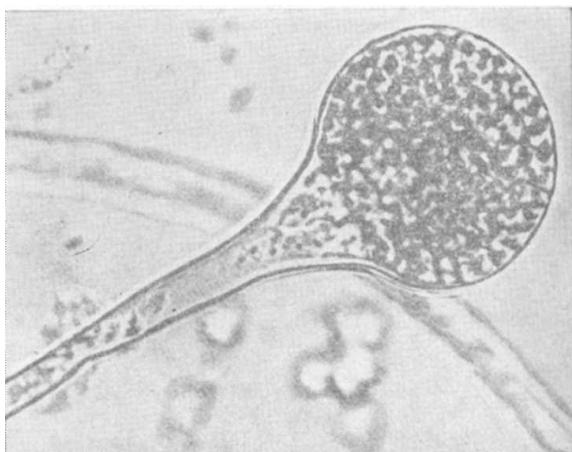


Рис7..Мисог.

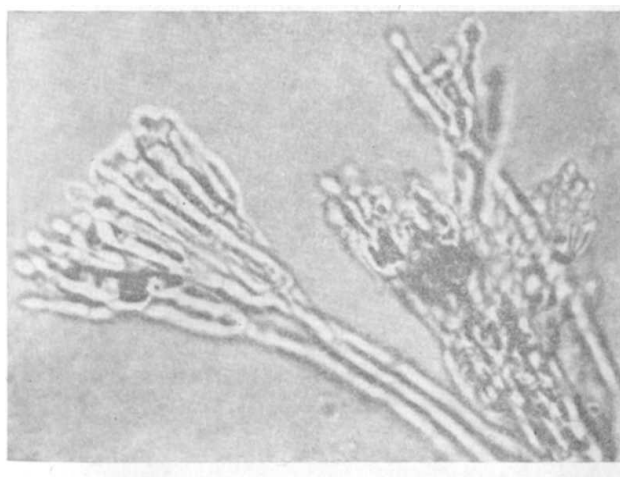


Рис8 . Penicillium.

мицелия),

бесполом (репродукциоонным) и половым путями. В результате бесполого размножения образуются эндоспоры (спорангиоспоры), например у *Mucor mucedo*, или экзоспоры (конидии), например у представителей классов *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*. (рис.7,8)

По способу полового размножения грибы делят на классы. У зигомицетов при половом размножении образуется зигота, у аскомицетов – аски (сумки) с аскоспорами, которые располагаются непосредственно на мицелии у голосумчатых грибов (дрожжи) и в особых плодовых телах у покрытосумчатых аскомицетов. Базидиомицеты, среди которых наиболее известны шляпочные грибы, в результате полового размножения образуют базидии с базидиоспорами. У многих дейтеромицетов половое размножение отсутствует или еще не определено.

Многие грибы являются продуцентами антибиотиков, ферментов и витаминов. Большая группа грибов способна вызывать заболевания у растений, животных и человека.

2.2 Структура бактериальной клетки

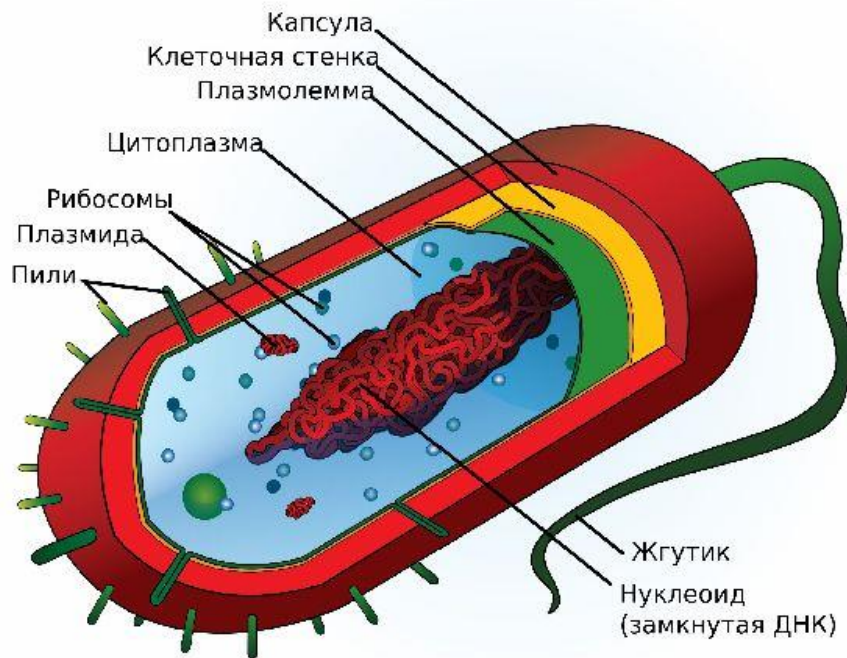


Рис.9

Оболочки клетки

Большинство бактерий имеет три оболочки (рис.9):

- клеточная мембрана;
- клеточная стенка;
- слизистая капсула.

Непосредственно с содержимым клетки – цитоплазмой, соприкасается клеточная мембрана. Она тонкая и мягкая.

Клеточная стенка – плотная, более толстая оболочка. Её функция – защита и опора клетки. Клеточная стенка и мембрана имеют поры, через которые в клетку поступают необходимые ей вещества. Многие бактерии имеют слизистую капсулу, которая выполняет защитную функцию и обеспечивает слипание с разными поверхностями.

Цитоплазма

Цитоплазма – это внутреннее содержимое клетки. На 75% состоит из воды. В цитоплазме находятся включения – капли жира и гликогена. Они являются запасными питательными веществами клетки.

Нуклеоид

Нуклеоид означает «подобный ядру». У бактерий нет настоящего, или, как ещё говорят, оформленного ядра. Это значит, что у них нет ядерной оболочки и ядерного пространства, как у клеток грибов, растений и животных. ДНК находится прямо в цитоплазме.

Функции ДНК:

- сохраняет наследственную информацию;
- реализует эту информацию, управляя синтезом белковых молекул, характерных для данного вида бактерий.

Отсутствие истинного ядра – самая важная особенность бактериальной клетки.

Но клеточная мембрана бактерий в некоторых местах проникает в цитоплазму, образуя складки, которые называются мезосомой. Мезосома участвует в размножении клетки и обмене энергии и как бы заменяет мембранные органоиды.

Единственный органоид, имеющийся у бактерий – рибосомы. Это маленькие тельца, которые размещены в цитоплазме и синтезируют белки.

У многих бактерий есть жгутик, с помощью которого они перемещаются в жидкой среде.

Жгутики

Жгутики бактерий определяют подвижность бактериальной клетки. Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, имеют большую длину, чем сама клетка. Толщина жгутиков 12-20 нм, длина 3-15 мкм. Они состоят из 3 частей: спиралевидной нити, крюка и базального тельца, содержащего стержень со специальными дисками (1 пара дисков - у грамположительных и 2 пары дисков - у грамотрицательных бактерий). Дисками жгутики прикреплены к цитоплазматической мембране и клеточной стенке. При этом создается эффект электромотора со стержнем-мотором, вращающим жгутик. Жгутики состоят из белка - флагеллина (от flagellum - жгутик); является Н-антигеном. Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

Число жгутиков у бактерий различных видов варьирует от одного (монотрих) у холерного вибриона до десятка и сотен жгутиков, отходящих по периметру бактерии (перитрих) у кишечной палочки, протей и др. Лофотрихи имеют пучок жгутиков на одном из концов клетки. Амфитрихи имеют по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки.

Пили

Пили (фимбрии, ворсинки) - нитевидные образования, более тонкие и короткие (3-10нм х 0, 3-10мкм) , чем жгутики. Пили отходят от поверхности клетки и состоят из белка пилина, обладающего антигенной активностью. Различают пили, ответственные за адгезию, то есть за прикрепление бактерий к поражаемой клетке, а также пили, ответственные за питание, водносолевой обмен и половые (F-пили), или конъюгационные пили. Пили многочисленны - несколько сотен на клетку. Однако, половых пилей обычно бывает 1-3 на клетку: они образуются так называемыми "мужскими" клетками-донорами, содержащими трансмиссивные плазмиды (F-, R-, Col-плазмиды). Отличительной особенностью половых пилей является взаимодействие с особыми "мужскими" сферическими бактериофагами, которые интенсивно адсорбируются на половых пилиях.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Деловая игра по методу «Снежков»

Правила игры:

Группа делится на 2-3 подгруппы, которые обсуждают одну и ту же проблему или ситуацию с целью набора наибольшего количества правильных ответов. Каждый правильный ответ записывается как балл этой группе в виде снежков. Группа давшая наибольшее число правильных ответов, оценивается более высоко.

Комплекс вопросов для проведения деловой игры

- 1) Морфология бактерий
- 2) Морфология простейших.
- 3) Морфология актиномицетов.
- 4) Морфология грибов.

- 5) Морфология спирохет.
- 6) Морфология риккетсий.
- 7) Морфология вирусов.
- 8) Изучение сложных методов окраски

2.3 Химический состав бактериальной клетки

Бактериальная клетка на 80-90% состоит из воды и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения, а для многих микроорганизмов губительно. В то же время особый способ высушивания микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) обеспечивает сохранение жизнеспособности большинства микроорганизмов. Лиофилизация используется для приготовления проб, пригодных для длительного хранения.

В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% - углеводы, 9% - липиды, 16% - РНК, 3% - ДНК и 3% - минеральные вещества.

Белки являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота.

Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

Липиды или жиры входят в состав ЦПМ и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат

запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены.

2.4 Стерилизация и дезинфекция

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждения попадания микробов на какой-либо объект.

Некоторые химические вещества используются в качестве антисептиков. Антисептики — это противомикробные вещества, которые используются для обработки биологических поверхностей.

Антисептика — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов в ране или организме в целом, на предупреждение и ликвидацию воспалительного процесса. К антисептикам относятся:

- * препараты йода (спиртовый раствор йода, йодиол, йодоформ, раствор Люголя);
- * соединения тяжелых металлов (соли ртути, серебра, цинка);
- * химические вещества нитрофуранового ряда (фуразо-лидон, фурациллин); окислители (перекись водорода, калия перманганат);
- * кислоты и их соли (салициловая, борная);
- * красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый).

Методы дезинфекции и стерилизации:

Дезинфекция – это уничтожение, в каком - либо объекте или окружающей среде патогенных микробов, вызывающих инфекционные болезни.

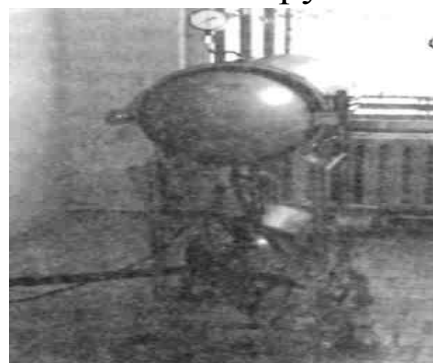
Виды дезинфекции:

- Профилактическая
- Очаговая
- Заключительная

Для уничтожения микроорганизмов в окружающей среде применяются стерилизация и дезинфекция.

Стерилизация — это полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор. Существуют физические, химические и механические способы стерилизации.

К наиболее распространенным способам физической стерилизации



относятся автоклавирование и сухожаровая стерилизация.

Автоклавирование — это обработка паром под давлением, которая проводится в специальных приборах — автоклавах (рис.15). Автоклав представляет собой металлический

Рис.15.

Автоклав.

цилиндр с прочными стенками, состоящий из двух камер: парообразующей и стерилизующей. В автоклаве создается повышенное давление, что приводит к увеличению температуры кипения воды.

Паром под давлением стерилизуют питательные среды, патологический материал, инструментарий, белье и т.д. Наиболее распространенный

режим работы автоклава — 2 атм., 120°C, 15—20 мин. Началом стерилизации считают момент закипания воды.

К работе с автоклавом допускаются подготовленные специалисты, которые точно и строго выполняют все правила работы с этим прибором.

Сухожаровая стерилизация — проводится в печах Пастера. Это шкаф с двойными стенками, изготовленный из металла и асбеста, нагревающийся с помощью электричества и снабженный термометром. Сухим жаром стерилизуют, в основном, лабораторную посуду. Обеззараживание материала в нем происходит при 160°C в течение 1 часа.

В бактериологических лабораториях используется такой вид стерилизации, как **прокаливание над огнем**. Этот способ применяют для обеззараживания бактериологических петель, шпателей, пипеток. Для прокаливания над огнем используют спиртовки или газовые горелки.

К **физическим способам стерилизации** относятся также УФ-лучи и рентгеновское излучение. Такую стерилизацию проводят в тех случаях, когда стерилизуемые предметы не выдерживают высокой температуры.

Механическая стерилизация — проводится при помощи фильтров (керамических, стеклянных, асбестовых) и особенно мембранных ультрафильтров из коллоидных растворов нитроцеллюлозы. Такая стерилизация позволяет освобождать жидкости (биопрепараты, сыворотку крови, лекарства) от бактерий, грибов, простейших и вирусов, в зависимости от размеров пор фильтра. Для ускорения фильтрации создают повышенное давление в

емкости с фильтруемой жидкостью или пониженное давление в емкости с фильтратом.

В микробиологической практике часто используют асбестовые фильтры Зейтца, Шамберлана. Такие фильтры рассчитаны на одноразовое применение.

Химическая стерилизация — этот вид стерилизации применяется ограниченно. Чаще всего используют химические вещества для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов.

При химической стерилизации возможно использование двух токсичных газов: окиси этилена и формальдегида. Эти вещества в присутствии воды могут инактивировать ферменты, ДНК и РНК, что приводит бактериальные клетки к гибели. Стерилизация газами осуществляется в присутствии пара при 50—80°C в специальных камерах. Этот вид стерилизации опасен для окружающих, однако существуют объекты, которые могут быть повреждены при нагревании и поэтому их можно стерилизовать только газом. Например, оптические приборы, некоторые питательные среды.

Для проведения стерилизации тех или иных объектов необходимо строго соблюдать установленный режим стерилизации (например, для питательных сред он указан в рецепте приготовления).

При проведении стерилизации в автоклаве необходимо осуществлять контроль стерилизации.

Контрольные вопросы:

1. Морфология бактерий
2. Морфология риккетсий, биологические свойства риккетсий.
3. Микоплазмы, особенности строения, морфология, методы изучения
4. Грибы, их строение и классификация.
5. Простейшие, их строение и классификация.
65. Вирусы, их особенности.
6. Особенности строения отдельных видов простейших.
7. Актиномицеты, их характеристика.
8. Спирохеты, их характеристика.
9. Структура бактериальной клетки.
10. Химический состав бактериальной клетки.
11. Сложные методы окраски.
12. Методы стерилизации, дезинфекции.
13. Что такое асептика, антисептика?

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 1

В смыве с операционных инструментов при микроскопии обнаружена смесь спорообразующих и неспороносных бактерий. Стерилизация инструментов проводилась кипячением.

1. Как можно установить результат воздействия температуры на различные формы бактерий.
2. Какой метод окраски применяется для выявления спор?
3. Достаточен ли предполагаемый режим для стерилизации инструментов?

Ситуационная задача №2

При микроскопии культуры из пробирки № 1 обнаружены спорообразующие палочки, а из пробирки № 2 — грамотрицательные палочки. Прогревают культур в течение 20 минут на водяной бане при 100 градусах.

1. Как проверить эффективность стерилизации?
2. Каково различие эффективности воздействия температуры на исследуемые бактерии?
3. Какой метод окраски применяется для выявления спор?

Деловая игра «Тур по галерее»

Ход работы:

1. Группа делится на 3 подгруппы.
2. Каждая подгруппа садится за отдельный стол, приготавливает чистый лист бумаги и берёт одну из цветных ручек.

3. На листе пишется дата, название игры, ФИ студентов – участников данной группы.
4. Один из участников берёт из конверта карточку.
5. Засекается время 10 мин.
6. В течение 10 мин в подгруппе обсуждается задание, записывается ответ и по окончании времени обмениваются листами с другой подгруппой по кругу.
7. Следующая подгруппа оценивает ответ предыдущей и если ответ неполный дополняет его или предлагает свой вариант ответа, если ответ оценивается как неправильный. На этот этап даётся 10 мин.
8. По окончании работы (30мин) на листе оказывается 3 записи разными по цвету ручками.
9. Работы сдаются преподавателю.
10. Все участники обсуждают результаты и выбирают наиболее правильные ответы, которые заслуживают высшего балла.
11. На обсуждение отводится 15 мин.
12. Подгруппа, которая дала наиболее правильные ответы, получает максимальный балл – 100% от рейтинга теоретической части занятия. Подгруппа, занявшая второе место – 85,9%, 3 группа – 70,9%.
13. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущей оценки занятия.
14. Работы студентов сохраняются у преподавателей.

Карточка №1

4. Морфология грибов.
5. Морфология простейших.
3. Метод окраски по Цилю – Нильсену.

Карточка №2

3. Морфология риккетсий.
4. Морфология актиномицетов.
3. Метод окраски по Граму.

Карточка №3

1. Морфология спирохет.
2. Морфология микоплазм.
3. Морфология бактерий.

2.5 Методы приготовления препаратов из посева патологического материала на жидкие и плотные питательные среды. Простые и сложные методы окраски. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа № 2

Приготовление различных мазков

Приготовление мазка из гноя или мокроты. Материал забирают стерильной пипеткой или петлей и наносят на середину предметного стекла. Вторым предметным стеклом покрывают первое так, чтобы свободными остались треть первого и второго стекол. Стекла с усилием раздвигают в стороны. Получают два больших мазка.

Приготовление мазка из крови. Каплю крови наносят на предметное стекло на расстоянии одной трети от левого края. Затем краем специально отшлифованного стекла, наклонив его под углом 45° , прикасаются к капле крови. Прижимая отшлифованное стекло к предметному продвигают его вперед. Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивает.

Приготовление мазков-отпечатков из внутренних органов трупов и пищевых продуктов твердой консистенции. Поверхность органа или пищевого продукта прижигают раскалённым скальпелем и из этого участка вырезают кусочек материала. Пинцетом осторожно захватывают этот кусочек и поверхностью среза прикасаются к предметному стеклу в двух - трех местах, делая ряд мазков-отпечатков.

Высушивание мазка. Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре. В случае необходимости его можно высушить около пламени горелки, держа стекло в горизонтальном положении за края большим и указательным пальцами мазком вверх. **Внимание!** При высокой температуре может произойти нарушение структуры клеток.

Фиксация мазка. Мазки фиксируют после полного высыхания с целью: 1) закрепить микроорганизмы на стекле; 2) обезвредить материал; 3) убитые микроорганизмы лучше воспринимают окраску. Фиксированный мазок-называется препаратом.

Способы фиксации. I. Физический - в пламени горелки: стекло берут пинцетом или большим и указательным пальцами и троекратно проводят через верхнюю часть пламени горелки в течение 6 с.

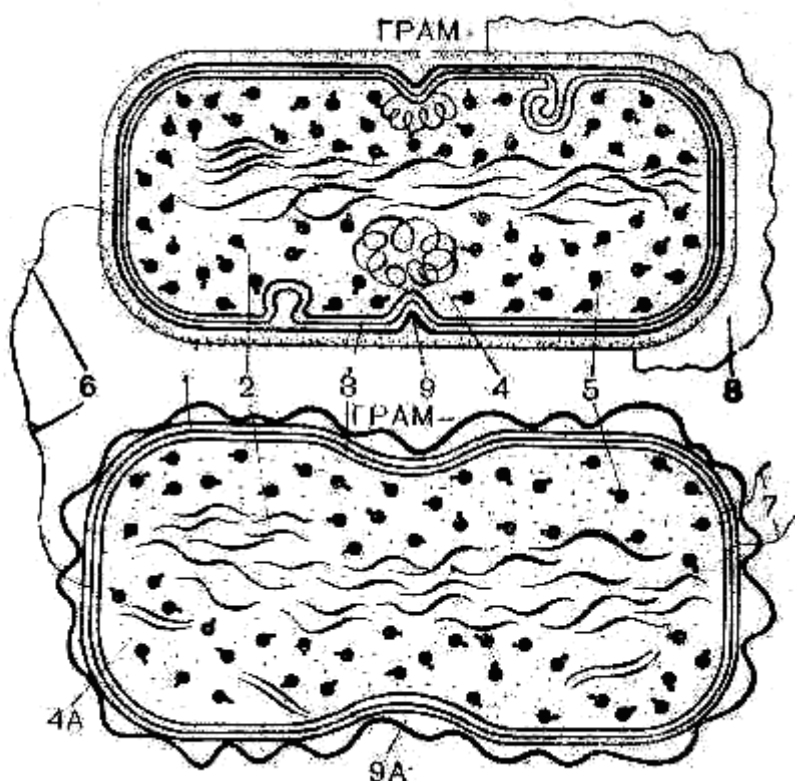
2. Химический - в жидкости: клеточные элементы в мазках из крови и мазках-отпечатках при действии высоких температур разрушаются, поэтому их обрабатывают одной из фиксирующих жидкостей: а) метиловым спиртом- 5 мин; б) этиловым спиртом-10 мин; в) смесью Никифорова-10-15 мин; г) ацетоном - 5 мин; д) парами кислоты и формалина - несколько секунд.

Сложные методы окраски.

Окраска по Граму универсальный и наиболее распространенный дифференциальный метод окраски.

Рис. 4 Схема строения грамположительных и грамотрицательных бактерий.

1 — клеточная стенка; 2 — нуклеонд; 3 — цитоплазматическая мембрана; 4 — мезосомы; 4А — внутрицитоплазматические мембраны; 5 — рибосомы; 6 — жгутики; 7 — пилли; 8 — капсула; 9 — перегородка; 9А — перетяжка.



В зависимости от результатов окраски все микроорганизмы делят на две группы - грамположительные и грамотрицательные. (рис.10).

Грамположительные бактерии содержат в клеточной стенке магниевую соль РНК, которая образует комплексное соединение с йодом и основным красителем (генциановым, метиловым или кристаллическим фиолетовым). Этот комплекс не разрушается при действии спирта, и бактерии сохраняют фиолетовый цвет.

Грамотрицательные бактерии не способны удержать основной краситель, так как не содержат магниевой соли РНК. Под действием спирта краситель вымывается, клетки обесцвечиваются и

окрашиваются дополнительным красителем (фуксином) в красный цвет.

1. На препарат накладывают бумажку по Синеву и наносят несколько капель воды или раствор генцианового фиолетового. Окрашивают 1-2 мин. Снимают бумагу или сливают краситель.

2. Не промывая водой, наносят раствор Люголя до почернения (1 мин.), затем краситель сливают.

3. Не промывая водой, наносят 96% спирт до отхождения красителя (30-60 сек.). Можно опустить препарат в стаканчик со спиртом на 1-2 сек.

4. Промывают препарат водой.

5. Докрашивают фуксином Пфейффера 3 мин., промывают водой и высушивают.

Микроскопируют с помощью иммерсионной системы.

Окраска по Цилю - Нильсену (для кислотоустойчивых бактерий). Этот метод применяют для выявления бактерий туберкулеза и проказы, имеющих в оболочке клеток большое количество липидов, воска и оксикислот. Бактерии кислото-, щелоче- и спиртоустойчивы. Для увеличения проницаемости клеточной стенки первый этап окрашивания проводят при подогревании.

1. Фиксированный препарат покрывают фильтровальной бумагой и наносят фуксин Циля. Удерживая стекло пинцетом, препарат подогревают над пламенем горелки до отхождения паров. Добавляют новую порцию красителя и подогревают еще 2 раза. После охлаждения снимают бумагу и промывают препарат водой.

2. Препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислоты, погружая 2-3 раза в раствор или наливая кислоту на стекло, затем несколько раз промывают водой.

3. Окрашивают водно-спиртовым раствором метиленового синего в течение 3-5 мин., промывают водой и высушивают.

Микроскопируют с помощью иммерсионной системы.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, остальные - в синий.

Окраска по Ожешко (выявление спор). 1. На высушенный на воздухе мазок наливают несколько капель 0,5% раствора хлороводородной кислоты и подогревают до образования паров. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем.

2. Окрашивают по способу Циля - Нильсена. Кислотоустойчивые споры окрашиваются в розово-красный, а бактериальная клетка - в голубой цвет.

Окраска по Бурри-Гинсу (выявление капсулы). Этот метод назван негативным, так как окрашивается фон препарата и бактериальная клетка, а капсула остается неокрашенной.

1. На предметное стекло наносят каплю черной туши, разведенной в 10 раз. В нее вносят каплю культуры. Ребром шлифовального стекла делают мазок, так же как мазок крови, и высушивают.

2. Фиксируют химическим способом спиртом или сулемой. Осторожно промывают водой.

3. Окрашивают фуксином Пфейффера 3-5 мин. Осторожно промывают и высушивают на воздухе.

Внимание! Фильтровальной бумагой не пользоваться, чтобы не повредить препарат.

Микроскопируют с помощью иммерсионной системы. Фон препарата черный, клетки – красные, капсулы бесцветные.

Окраска по Романовскому—Гимзе. Краска Романовского—Гимзы состоит из смеси азура, эозина и метиленовой сини. Перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды прибавляют 10 капель краски Романовского—Гимзы. Приготовленный раствор краски наносят на фиксированный мазок и оставляют на 1 ч. Затем краску сливают, препарат промывают водой и высушивают на воздухе. Краска Романовского—Гимзе окрашивает микробы в фиолетово-красный цвет.

ГЛАВА III. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ: ДЫХАНИЕ, РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЕ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

3.1 Физиология микроорганизмов

изучает жизненные функции микроорганизмов: питание, дыхание, рост и размножение. В основе физиологических функций лежит непрерывный обмен веществ (метаболизм).

Сущность обмена веществ составляют два противоположных и вместе с тем взаимосвязанных процесса: ассимиляция (анаболизм) и диссимиляция (катаболизм).

В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. При процессах диссимиляции питательные вещества разлагаются и окисляются, при этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. В результате распада питательных веществ происходит расщепление сложных органических соединений на более простые, низкомолекулярные. Часть из них выводится из клетки, а другие снова используются клеткой для биосинтетических реакций и включаются в процессы ассимиляции. Все процессы синтеза и распада питательных веществ совершаются с участием ферментов.

Особенностью микроорганизмов является интенсивный обмен веществ. За сутки при благоприятных условиях одна микробная клетка может переработать такое количество питательных веществ, которое в 30-40 раз больше ее массы.

Дыхание бактерий (или биологическое окисление) микроорганизмов представляет собой совокупность биохимических процессов, в результате которых освобождается энергия, необходимая для жизнедеятельности микробных клеток.

Все физиологические процессы, такие как движение, рост и размножение, образование спор и капсул, выработка токсинов, могут осуществляться при постоянном притоке энергии. Микроорганизмы добывают энергию за счет окисления различных химических соединений: углеводов (чаще глюкозы), спиртов, органических кислот, жиров и т. д. Сущность окисления состоит в том, что окисляемое вещество отдает электроны, а восстанавливаемое получает их.

По типу дыхания все микроорганизмы разделяются на облигатные (строгие) аэробы, облигатные анаэробы и факультативные (необязательные) анаэробы, микроаэрофилы, аэротолеранты.

Облигатные аэробы (микобактерии туберкулеза и др.) живут и развиваются при свободном доступе кислорода, т. е. реакции окисления осуществляются у них при участии молекулярного кислорода с высвобождением большого количества энергии. Примером может служить окисление глюкозы в аэробных условиях:

82,6 кД (688,5 ккал)

Существуют и *микроаэрофилы*, которые нуждаются в малых количествах кислорода (некоторые лептоспиры, бруцеллы).

Облигатные анаэробы (клостридии столбняка, ботулизма и др.) способны жить и размножаться только в отсутствие свободного кислорода воздуха. Дыхание у анаэробов происходит путем ферментации субстрата с образованием небольшого количества энергии. Так, при анаэробном разложении 1 моль глюкозы энергии выделяется значительно меньше, чем при аэробном дыхании: $C_6H_{12}O_6 \sim 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 130,6 \text{ кД} (31,2 \text{ ккал})$.

Наличие свободного кислорода для облигатных анаэробов является губительным. Это связано с тем, что в присутствии кислорода конечным продуктом окисления органических соединений оказывается перекись водорода. А поскольку анаэробы не обладают способностью продуцировать фермент каталазу, расщепляющую перекись водорода, то она накапливается и оказывает токсическое действие на бактерии.

Факультативные анаэробы могут размножаться как при наличии молекулярного кислорода, так и при отсутствии его. К ним относят большинство патогенных и сапрофитных бактерий.

Процессы разложения органических веществ в бескислородных условиях, сопровождающиеся выделением энергии, называют также брожением. В зависимости от участия определенных микроорганизмов и конечных продуктов расщепления углеводов различают несколько типов брожения: спиртовое, осуществляемое дрожжами; молочнокислое, вызываемое молочнокислыми бактериями; масляно-кислое, обусловленное масляно-кислыми бактериями и др.

Выделение тепла при дыхании микроорганизмов можно наблюдать при выращивании культур в сосудах, защищенных от потери тепла, - температура питательной среды будет постепенно повышаться. С выделением избыточного тепла при дыхании некоторых микроорганизмов связаны процессы самовозгорания торфа, навоза, влажного сена и хлопка. (биохимические механизмы дыхания более подробно изложены в учебниках биологической химии).

Рост и размножение бактерий являются одним из важнейших проявлений жизнедеятельности микроорганизмов.

Рост определяется как увеличение размеров отдельной особи и упорядоченное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур.

Под *размножением* понимают способность микроорганизмов к самовоспроизведению, в результате чего увеличивается число особей в популяции. Основным способ размножения у бактерий поперечное деление. (рис.11,12) Перед делением у бактериальных клеток, достигших определенного возраста, происходит удвоение молекул ДНК. Каждая дочерняя клетка получает копию материнской ДНК. Процесс деления считается законченным, когда цитоплазма дочерних клеток разделена перегородкой.

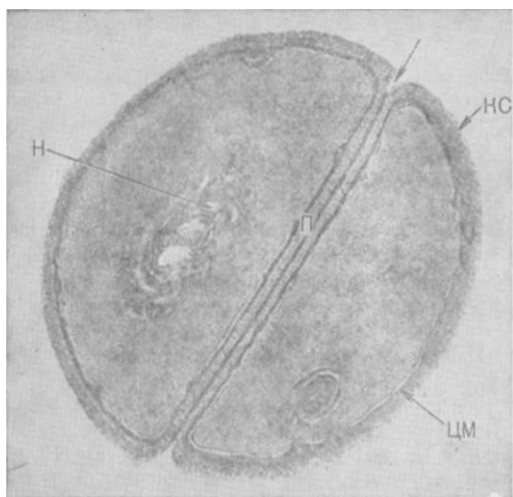


Рис. 11. Схема деления

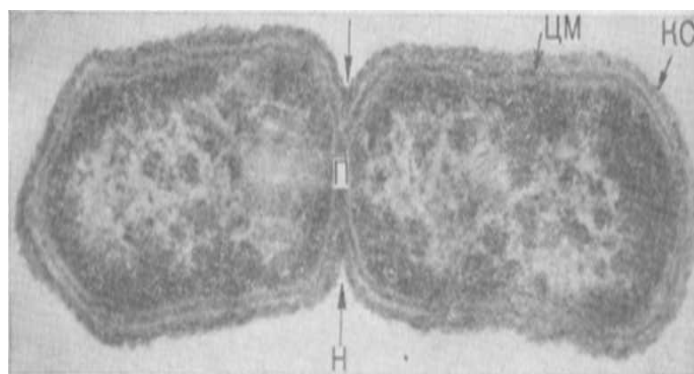


Рис. 12. Схема деления кишечной палочки.

Стрелками обозначены участки деления. КС — клеточная стенка; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; Н — нуклеоид; П — перегородка (электронограмма А. С. Быкова).

В образовании перегородки принимает участие цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка. Если перегородка формируется в середине делящейся клетки, то появляются дочерние клетки одинаковой величины (изоморфное деление). Иногда перегородка образуется ближе к одному из концов, тогда дочерние клетки имеют неодинаковый размер (гетероморфное деление).

Деление бактерий (кокков) может происходить в различных плоскостях с образованием многообразных сочетаний клеток: цепочки стрептококков, парные соединения (диплококки), тетрады кокков, тьюки (сарцина), гроздь (стафилококки). Палочковидные и извитые формы делятся поперечно и только в одной плоскости.

У некоторых бактерий размножение происходит путем образования почки (микобактерии туберкулеза, клубеньковые бактерии), которая по величине меньше исходной клетки.

Скорость размножения бактерий велика, что обусловлено интенсивностью их обмена. У большинства бактерий каждая клетка

делится в течение 15-30 мин. Подсчитано, что за 24 ч. у бактерий сменяется столько поколений сколько у человека за 5000 лет. Есть виды бактерий, которые делятся медленно, 1 раз в сутки, например микобактерии туберкулеза.

Для каждого вида бактерий скорость размножения может быть различной и зависит от возраста культуры, питательной среды, температуры, значения pH и многих других факторов.

Размножение бактерий в жидкой питательной среде обладает рядом особенностей и происходит в несколько последовательных фаз (рис. 13).

Фаза 1-исходная стационарная (латентная): микробные клетки адаптируются к питательной среде, при этом повышается интенсивность обменных процессов, увеличивается размер клеток. Бактерии начинают размножаться лишь к концу первой фазы.

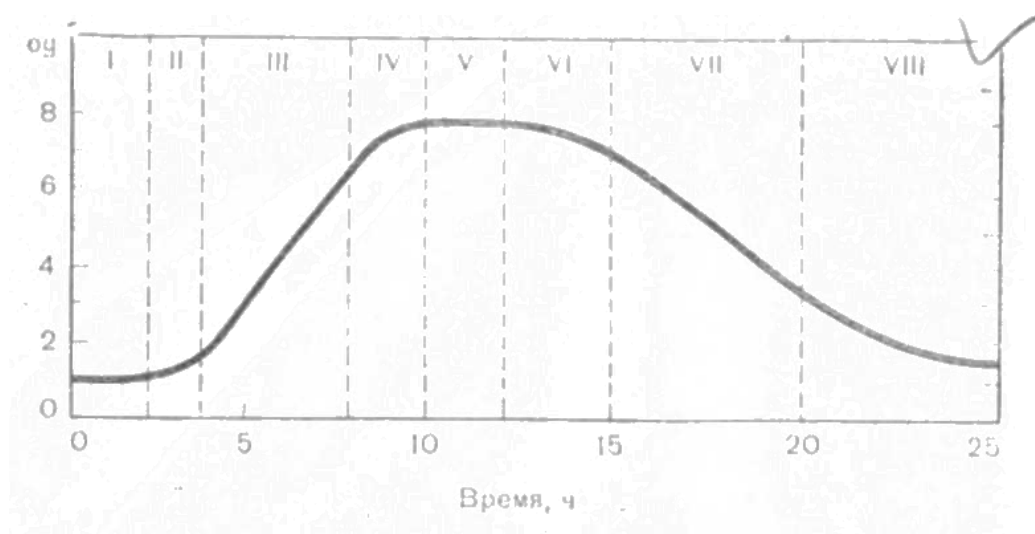


Рисунок 13. фазы размножения микроорганизмов.

Фаза 2 - логарифмического роста: бактерии энергично размножаются, вследствие чего количество клеток возрастает в геометрической прогрессии. В этой фазе бактерии 1 обладают наибольшей биохимической и биологической активностью.

Фаза 3 - стационарная: концентрация бактериальных клеток в среде остается постоянной. Это обусловлено тем, что число вновь появившихся бактерий почти равно числу отмирающих клеток. Длительность этой фазы у разных бактерий различна.

Фаза 4 - отмирания: жизнеспособных клеток бактерий становится все меньше, и постепенно они погибают. Причинами гибели клеток могут быть истощение питательной среды, накопление в ней вредных

продуктов обмена. В этой фазе у бактерий могут изменяться морфологические, биохимические и другие свойства. Фаза отмирания у различных видов бактерий неодинакова. Полная гибель культуры может наступить через несколько дней, недель или месяцев. Увеличение количества размножившихся в жидких питательных средах бактерий можно наблюдать через 18-24 ч - появляется либо помутнение среды, либо образование пленки или осадка. При этом характер изменения среды зависит как от вида и возраста бактериальной культуры, так и от состава самой питательной среды.

При размножении на плотных питательных средах бактерии образуют на поверхности среды и внутри нее типичные для каждого микробного вида колонии. Каждая колония - это популяция микроорганизмов, развившаяся из одной клетки определенного вида бактерии. Колонии бактерий различаются по размеру, форме, строению, консистенции и цвету. Внешний вид колоний у некоторых бактерий настолько характерен, что может служить дифференциальным признаком для идентификации микроорганизмов. Например, колонии возбудителя сибирской язвы можно сравнить с локонами или львиной гривой.

Спирохеты и риккетсии размножаются также поперечным делением. Процесс размножения (репродукция) вирусов.

Питание бактерий

Всем микроорганизмам для осуществления процессов питания, дыхания, размножения необходимы питательные вещества.

В качестве питательных веществ и источников энергии микроорганизмы используют различные органические и неорганические соединения, для нормальной жизнедеятельности им требуются также микроэлементы и факторы роста.

Процесс питания микроорганизмов имеет ряд особенностей: во-первых, поступление питательных веществ происходит через всю поверхность клетки; во-вторых, микробная клетка обладает исключительной быстротой метаболических реакций; в-третьих, микроорганизмы способны довольно быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания. Разнообразие условий существования микроорганизмов обуславливает различные типы питания.

Типы питания определяются по характеру усвоения углерода и азота. Источником других органоенов - водорода и кислорода служит вода. Вода необходима микроорганизмам и для растворения

питательных веществ, так как они могут проникать в клетку только в растворенном виде.

По усвоению углерода микроорганизмы делят на два типа: автотрофы и гетеротрофы:

-автотрофы (от греч. autos - сам, trophe - питание) способны синтезировать сложные органические вещества из простых неорганических соединений. Они могут использовать в качестве источника углерода углекислоту и другие неорганические соединения углерода. Автотрофами являются многие почвенные бактерии (нитрифицирующие, серобактерии и др.).

-гетеротрофы (от греч. heteros - другой, trophe - питание) для своего роста и развития нуждаются в готовых органических соединениях. Они могут усваивать углерод из углеводов (чаще всего глюкозы), многоатомных спиртов, органических кислот, аминокислот и других органических веществ.

Гетеротрофы представляют обширную группу микроорганизмов, среди которых различают сапрофитов и паразитов.

Сапрофиты (от греч. sapos - гнилой, phyton-растение) получают готовые органические соединения от отмерших организмов. Они играют важную роль в разложении мертвых органических остатков, например бактерии гниения и др.

Паразиты (от греч. parasitos-нахлебник) живут и размножаются за счет органических веществ живой клетки растений, животных или человека. К таким микроорганизмам относятся риккетсии, вирусы и некоторые простейшие.

По способности усваивать азот микроорганизмы делятся также на две группы: *аминоавтотрофы* и *аминогетеротрофы*. Аминоавтотрофы для синтеза белка клетки используют молекулярный азот воздуха (клубеньковые бактерии, азотобактер) или усваивают его из аммонийных солей. Аминогетеротрофы получают азот из органических соединений - аминокислот, сложных белков. К ним относят все патогенные микроорганизмы и большинство сапрофитов.

По источникам энергии среди микроорганизмов различают фототрофы, использующие для биосинтетических реакций энергию солнечного света (пурпурные серобактерии) и хемотротрофы, которые получают энергию за счет окисления неорганических веществ (нитрифицирующие бактерии и др.) и органических соединений

(большинство бактерий, в том числе и патогенные для человека виды).

Однако резкой границы между типами питания микробов провести нельзя, так как есть такие виды микроорганизмов, которые могут переходить от гетеротрофного типа питания к автотрофному, и наоборот.

В настоящее время для характеристики типов питания введена новая терминология: гетеротрофы называют органотрофами, а автотрофы - литотрофами (от греч. *litos* - камень), так как подобные микроорганизмы способны расти в чисто минеральной среде.

Факторы роста. Микроорганизмы для своего роста и размножения нуждаются в особых веществах, которые сами синтезировать не могут и должны получать их в готовом виде. Эти вещества называют факторами роста, и нужны они микробным клеткам в небольших количествах. К ним относят различные витамины, некоторые аминокислоты (необходимые для синтеза белка), пуриновые и пиримидиновые основания (идущие на построение нуклеиновых кислот) и др. Многие факторы роста входят в состав различных ферментов и играют роль катализаторов в биохимических процессах.

Знание потребностей микроорганизмов в питательных веществах и факторах роста очень важно, в частности, для создания питательных сред, применяемых для их выращивания.

Транспорт питательных веществ. Питательные вещества могут проникать в цитоплазму микробных клеток только в виде небольших молекул и в растворенном виде.

Сложные органические вещества (белки, полисахариды и др.) предварительно подвергаются воздействию ферментов, выделяемых микробной клеткой, и после этого становятся доступными для использования. Транспорт питательных веществ в клетку и выход из нее продуктов метаболизма осуществляется в основном через цитоплазматическую мембрану.

Питательные вещества проникают в клетку несколькими способами:

1. *Пассивная диффузия*, т. е. перемещение веществ через толщу мембраны, в результате чего выравниваются концентрация веществ и осмотическое давление по обе стороны оболочки. Таким путем могут проникать питательные вещества, когда концентрация в среде значительно превышает концентрацию веществ в клетке.

2. *Облегченная диффузия* - проникновение питательных веществ в клетку с помощью активного переноса их особыми молекулами-переносчиками, называемыми пермеазами. Это вещества ферментной природы, которые локализованы на цитоплазматической мембране и обладают специфичностью. Каждая пермеаза адсорбирует соответствующее питательное вещество на наружной стороне цитоплазматической мембраны, вступает с ним во временную связь и диффундирует комплексно через мембрану, отдавая на внутренней стороне ее транспортируемое вещество в цитоплазму. Этот процесс совершается без использования энергии, так как перемещение веществ происходит от более высокой концентрации к более низкой.

3. *Активный транспорт* питательных веществ осуществляется также с помощью пермеаз, но этот процесс требует затраты энергии. В этом случае питательное вещество может проникнуть в клетку, если концентрация его в клетке значительно превышает концентрацию в среде.

4. В ряде случаев транспортируемое вещество может подвергаться *химической модификации*, и такой способ переноса веществ получил название переноса радикалов или транслокации химических групп. По механизму передачи транспортируемого вещества этот процесс сходен с активным транспортом.

Выход веществ из микробной клетки осуществляется или в виде пассивной диффузии, или в процессе облегченной диффузии с участием пермеаз.

3.2 Ферменты микроорганизмов

Сложные процессы питания и дыхания микроорганизмов осуществляются с помощью ферментов, или энзимов. Ферменты, выделяемые микроорганизмами в окружающую среду, называются экзоферментами, а ферменты, тесно связанные с их клеткой, эндоферментами. Первые готовят питательные вещества для всасывания через оболочку клетки, вторые внутри клетки превращают поступившие вещества в составные части клетки.

Природа ферментов белковая. Названия ферменты получают от названия вещества, на которое они действуют, и окончания «аза». Они делятся на три группы — гидролазы, десмолазы и окислительно-восстановительные.

Гидролазы (гидро — вода) — ферменты, присоединяющие к питательному веществу воду. Они, в свою очередь, делятся на три основные группы: протеазы, липазы, карбоксилазы.

Протеазы — ферменты белков, они расщепляют белки до пептонов и полипептидов. Их определяют по разжижению белка желатины и пептонизации молока (молочного белка — казеина). Протеазу образуют *Bacillus larvae*, *Bac. alvei*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bacterium apisepcticus*, *Bact. vulgaris*.

Липазы, или эстеразы, — ферменты, расщепляющие жиры масла, воска и эфиры на жирные кислоты и спирты. Пчелиный воск, состоящий из высших жирных кислот и высшего одноатомного спирта, под действием липазы распадается на цериновую и пальметиновую кислоты и мерициловый спирт. Липазу образуют и разрушают воск следующие грибы: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. regulosus*, *A. tamarii*, *A. fischeri*, *Penicillium roqueformii*, *P. chrysogenum purpurescens*, *P. nissarum*, *P. oxalicum*, *P. decumbens*, *P. javanicura*, *P. soppi*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *oidium lactis*, *Fusarium sporotrichiella*. Липазу образуют также некоторые бактерии, например *Micrococcus cego-lyticus*, *M. aureus*, *M. citreus*, *Bact. proteus*, *Bact. vulgaris*, *Bact. prodigiosum*.

Наиболее часто микроорганизмы разрушают доек сотов и мервы. Для определения у микробов липазы их выращивают на агаровой среде с добавлением растительного масла и. небольшого количества красителя нильского синего. При наличии липазы среда из розовой становится фиолетовой в результате появления свободных жирных кислот.

3.3 Классификация питательных сред.

При составлении питательных сред для микроорганизмов необходимо учитывать их потребность в элементах питания. По составу питательные среды подразделяются на две группы: естественные (натуральные) и синтетические. *Естественными* обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Основой таких сред являются различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, овощи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство из них используется в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы,

так как в этих средах имеются, обычно, все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а с другой стороны, выяснить, какие вещества образуются по ходу развития микроорганизмов. Это связано с тем, что состав естественных сред очень сложен; кроме того, он не является постоянным, так как существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды неопределенного состава используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и для диагностических целей. К числу сред неопределенного состава относят и так называемые полусинтетические среды. В их состав наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. *Синтетические* среды — это такие среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды следует готовить на дистиллированной воде. Для разработки синтетических сред, обеспечивающих нормальный рост изучаемого микроорганизма или максимальный биосинтез какого-либо продукта его жизнедеятельности, необходимо знать особенности обмена веществ данного организма и его потребности в источниках питания. В настоящее время в распоряжении микробиологов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам сложным средам неизвестного состава. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть и довольно простыми по составу. Синтетические среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение в соответствующие продукты обмена. К *универсальным* средам относятся мясо-пептонный агар и мясо-пептонный бульон, на которых растут все виды микроорганизмов. С. Н. Виноградским в практику микробиологии введены *элективные* (избирательные) среды для определенных групп микроорганизмов. Эти среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодны или совсем не пригодны для развития других. Зная физиологические особенности

соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав среды, ее активную кислотность, условия аэрации, температуру и др.), при которых будут развиваться лишь микроорганизмы этой группы. Это позволяет вести различные биологические процессы в лаборатории и в производстве без предварительной стерилизации среды. Такие среды применяются главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания, для получения накопительных культур. Понятие «элективные среды» входит в более широкое понятие «элективные условия». Питательные среды применяют различной консистенции: *жидкие, плотные, полужидкие*. Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения их в чистую культуру и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5—2,5% агар-агара или 10—15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят агар-агар в количестве 0,1—0,2%. По назначению среды разделяют на элективные и дифференциально-диагностические. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры. *Дифференциально-диагностические* среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды. В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о

биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить клоны, сбраживающие лактозу от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный (пептонный) агар, углевод и основной фусин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развивается красная окраска соответствующих колоний. Среда с эозином и метиленовым синим (среда Левина) в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий и исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Подобные изменения окраски происходят потому, что красители присутствуют в среде не в виде самостоятельных соединений, а в виде комплексов с веществами питательной среды. При низких значениях pH эти комплексы выпадают в осадок, исходные же красители в этих условиях растворимы, при больших pH комплексы красителей бесцветны, тогда как метиленовый синий приобретает синюю окраску. Данная среда позволяет дифференцировать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*.

Познанием многообразия микроорганизмов мы обязаны двум обстоятельствам. Некоторые микроорганизмы уже сравнительно давно привлекли к себе внимание вследствие того, что они образуют колонии или скопления или же вызывают какие-либо заметные изменения в окружающей среде. Многие из таких, легко обнаруживаемых микроорганизмов поддаются прямому выделению; относительно нетрудно подобрать условия, которые обеспечивали бы их рост. Существуют, однако, и многие другие микроорганизмы (различных физиологических типов), ставшие доступными для исследования лишь после того, как Виноградский и Бейеринк разработали технику накопительных культур. И в принципе и на практике метод очень прост. Подбором ряда факторов (источники энергии, углерода и азота; акцептор электронов; свет; температура; pH и т. п.) создают определенные условия и инокулируют среду смешанной популяцией, какая имеется, например, в почве или в иле.

В такой среде наиболее хорошо приспособленный к ней тип микроорганизмов растет и вытесняет все остальные, сопутствующие, организмы. Посредством многократных пересевов в жидкую среду такого же состава и рассева по такой же плотной среде можно без труда выделить накопленный штамм. Частый пересев с жидкой среды на жидкую предотвращает рост сопутствующих организмов, которые могли бы использовать продукты выделения или даже автолиза клеток первичной культуры и расти за счет них. Прекрасным материалом для инокуляции служат пробы из тех мест, где уже имеется «естественное обогащение». Так, можно выделять микроорганизмы, использующие окись углерода, из сточных вод газовых заводов; микроорганизмы, использующие гемоглобин, — из сточных вод боен и бактерии, окисляющие углеводороды, — из нефтеносных пород, из почв, загрязненных нефтью, и из нефтяных отстойников. Метод накопительных культур позволяет выделять микроорганизмы с любой комбинацией потребностей в питательных веществах при условии, разумеется, что искомый тип вообще существует в природе. Для крайне специализированных микроорганизмов особенно легко создать элективные условия. Так, минеральная среда, не содержащая связанного азота, на свету строго избирательна для "сине-зеленых водорослей, фиксирующих N_2 . Если ту же среду дополнить органическим источником энергии и углерода, то на ней в темноте в аэробных условиях будет развиваться *Azotobacter*, а при исключении доступа воздуха — *Clostridium*. Для успешного получения накопительных культур требуется ограничиться удовлетворением минимальных потребностей только того микроорганизма, который хотят выделить. Если, например, хотят выделить бактерии, способные окислять метан или водород с нитратом или сульфатом в качестве акцептора водорода, то следует позаботиться об исключении доступа кислорода, иначе будут доминировать аэробные формы, окисляющие метан или водород. Для отбора можно также использовать устойчивость или толерантность микроорганизмов к кислотам и щелочам, к высоким температурам или излучению. Нередко наряду с «положительной» селекцией проводится и «отрицательная» — при помощи избирательно действующих ингибиторов. На питательной среде, содержащей азид, в аэробных условиях растут, например, молочнокислые бактерии, а рост других аэробных микроорганизмов подавляется. Азид, цианид и H_2S оказывают избирательное действие на те аэробные организмы, в

дыхании которых участвуют цитохромы. В медицинской диагностике пользуются избирательным подавлением для обнаружения *Corynebacterium diphtheriae* (применение питательных сред, содержащих теллурит) и патогенных *Enterobacteriaceae* (агаризованные среды с добавлением висмута). В посевном материале могут присутствовать различные штаммы с одинаковым типом обмена веществ, отличающиеся друг от друга лишь незначительно, например лишь по оптимальному значению pH или по скорости роста. Если для получения накопительной культуры использовать такой материал, то доминировать будет наиболее адаптированный к данным условиям или наиболее быстро растущий штамм, все же остальные будут подавлены и выделить их не удастся. Поэтому в тех случаях, когда хотят выделить максимальное число штаммов, растущих при определенных элективных условиях, посев следует проводить непосредственно в чашки. На плотных элективных средах штаммы, которым условия благоприятствуют, образуют колонии. При достаточно большом расстоянии между колониями конкуренция за питательные вещества не может иметь места; штаммы, растущие более медленно, не подавляются растущими быстрее, так что те и другие могут быть выделены отдельно. В этой обзорной таблице объединены данные относительно получения накопительных культур у микроорганизмов с разными типами обмена веществ. Чистую культуру микроорганизма (последний этап выделения) получают обычно па (или в) плотной питательной среде. Процедура начинается с отделения от популяции клеток одной-единственной клетки. Обязательное требование состоит в том, чтобы вырастающая из клетки колония оставалась изолированной от других клеток или колоний. Аэробные бактерии выделяют либо по методу Коха — рассеивая суспензию по поверхности среды в чашках, либо, что легче, размазывая каплю платиновой петлей по агаризованной среде. Анаэробные бактерии суспендируют в расплавленном агаре с температурой 45°C и проводят инкубацию без доступа воздуха. Тщательное отделение одной колонии, повторное суспендирование в жидкости и повторное нанесение мазка или разведение в агаре позволяют получать чистые культуры большинства микроорганизмов.



Термостат — прибор для поддержания постоянной температуры. (рис. 14-термостат М-2). Поддержание температуры обеспечивается либо за счёт использования терморегуляторов, либо осуществлением фазового перехода (например, таяние льда). Для уменьшения потерь тепла или холода термостаты, как правило, теплоизолируют. Но не всегда. Широко известны автомобильные моторы, где летом нет никакой теплоизоляции и за счёт действия терморегуляторов (ошибочно именуемых термостатами) поддерживается постоянная температура. Другим примером термостата, широко используемого в быту, является холодильник.

В термодинамике термостатом часто называют систему, обладающую столь большой теплоёмкостью, что подводимое к ней тепло не меняет её температуру.

Можно выделить два основных способа работы термостатов:

В термостате поддерживается постоянной температура теплоносителя, заполняющего термостат. Исследуемое тело при этом находится в контакте с рабочим веществом и имеет его температуру. В качестве рабочих веществ обычно используют воздух, спирт (от -110 до 60 °С), воду ($10 - 95$ °С), масло ($-10 — +300$ °С) и др.

Исследуемое тело поддерживается при постоянной температуре в адиабатических условиях (рабочее вещество отсутствует). Подвод или отвод теплоты осуществляется специальным тепловым ключом (в термостатах низких температур) или же используются электропечи с терморегулятором и массивным металлическим блоком, в который помещается исследуемое тело (в термостатах высоких температур).

Агар-агар — растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды с ничтожным содержанием азотистых веществ. Желатина — кислый азотсодержащий продукт, добываемый путем выварки костей и хрящей. В качестве плотных питательных сред широко применяют также гелевые пластины, введенные в микробиологическую практику С. Н. Виноградским. Для выращивания микроорганизмов, использующих органические формы азота, часто употребляют мясопептонные среды: **мясопептонный бульон**, мясопептонный агар и мясопептонную желатину. Мясопептонный бульон (МПБ). Для приготовления мясо-пептонных сред используют мясной бульон, который получают так: 500 г мелко изрубленного свежего мяса без костей, жира и сухожилий заливают в

эмалированной кастрюле 1 л водопроводной воды, нагретой до 50°C, и оставляют настаиваться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50—55°C. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят в течение 30 мин для свертывания коллоидных белков и фильтруют дважды (первый раз через марлю с ватой, второй — через бумажный фильтр). Фильтр доливают водой до 1 л, разливают в колбы, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120°C 20 мин (пробки колб закрывают сверху колпачками из бумаги). Ватные пробки должны быть плотными, так как они являются фильтром, препятствующим проникновению бактерий из воздуха после стерилизации. Мясной бульон может быть использован в любое время для приготовления соответствующих сред. Если их готовят сразу, то предварительная стерилизация излишня. Нередко в лабораторных условиях мясной настой кипятят вместе с мясом, а затем мясо отжимают. Бульон получается хорошего качества. Если желательно иметь мясной бульон особо высокой питательности, во время настаивания мяса с водой добавляют немного пепсина и подкисляют бульон соляной кислотой. Пепсин дополнительно гидролизует белковые соединения мяса, и количество усвояемых бактериями питательных веществ возрастает. Мясо можно заменить мясным экстрактом, беря его по 5 г на 1 л среды. Для приготовления мясопептонного бульона к 1 л мясного бульона добавляют 5—10 г пептона (пептон — первый продукт гидролиза белка с высокой молекулярной массой) для повышения калорийности среды и 5 г поваренной соли с целью создания осмотической активности. Среду нагревают до растворения пептона, постоянно помешивая. Затем устанавливают нейтральную или слабощелочную реакцию среды, приливая 20%-ный раствор Na_2CO_3 (до посинения влажной красной лакмусовой бумажки; при этом фенолфталеин еще не показывает щелочную реакцию — при добавлении его к среде в фарфоровой чашке розовая окраска не выявляется). Удобно использовать индикатор бромтимолблау. 1—2 капли его вносят стеклянной палочкой в фарфоровую чашку и добавляют каплю бульона. В нейтральной среде бромтимолблау бутылочно-зеленый, в кислой — желтый, в щелочной — синий. После установления реакции среду снова кипятят 5—10 мин и белки, свернувшиеся от изменения реакции, отфильтровывают через бумажный фильтр без осветления бульона или осветлив его белком. Прозрачный Мясопептонный бульон разливают в пробирки, закрывают ватными

пробками и стерилизуют при 120°C в течение 20 мин. **Мясо-пептонный агар (МПА).** К 1 л мясо-пептонного бульона добавляют 15—20 г мелко нарезанного агар-агара. Среду нагревают до растворения агара (температура плавления его 100°C, застывания — 40°C), устанавливают слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na₂CO₃ и через воронки разливают в пробирки (но 10 мл для разливок в чашки — агар столбиком и по 5 мл для получения скошенного, наклонного агара). При разливе агара необходимо следить затем, чтобы края пробирки были сухими, иначе пробки прилипают к стеклу. Пробирки со средой стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 20 мин. **Мясо-пептонная желатина (МПЖ).** В 1 л мясopептонного бульона помещают 100—150 г желатины. Температура плавления зависит от процентного содержания в среде. 10%-ная желатина плавится при 24°C, 15%-ная — при 25°. В летнее время среды готовят, добавляя 15% желатины. После растворения желатины при осторожном нагревании в среде устанавливают слабощелочную реакцию (как и для МПБ и МПА), кипятят в течение 5 мин, затем охлаждают до 40—50°C. Одновременно яичный белок взбивают с небольшим количеством воды, вливают его в охлажденную желатиновую среду, хорошо взбалтывают и снова нагревают. Среда после выпадения белков становится прозрачной. Ее фильтруют через горячую воронку, разливают в пробирки и стерилизуют в кипятильнике Коха текучим паром, прогревая среду по 30 мин через 24 ч 3 раза. **Картофельный агар.** 200 г очищенного и промытого водой картофеля нарезают ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды, варят 30 мин. Отвар фильтруют через вату и доводят до первоначального объема. К полученной жидкости прибавляют 2% агара, кипятят до его растворения и устанавливают нейтральную реакцию среды (рН 7,0). Среду стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин. **Пивное сусло.** Зерна ячменя замачивают в холодной воде и проращивают при 35°C. После того как ростки будут вдвое больше длины зерна, последнее высушивают до воздушно-сухого состояния (можно при слабом подогревании) и получают солод. Для приготовления сусла солод крупно размалывают и 250 г его берут на 1 л воды. Смесь подогревают при 57°C (для лучшего выделения фермента амилазы) до исчезновения реакции на крахмал (синее окрашивание с йодом). Пробы на осахаривание крахмала проводят в фарфоровой чашке в капле жидкости. Сусло процеживают через вату, затем фильтруют через бумажный фильтр. Такое сусло содержит

10— 20% сахара. Определив его содержание по плотности раствора с помощью сахариметра, сусло разбавляют водой до концентрации сахара 6—8%, стерилизуют при 115°C (давление 0,5 атм) в течение 30 мин. Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе. **Сусло-агар.** К приготовленному суслу добавляют 2,5—3% агара, кипятят до его расплавления, фильтруют через вату и стерилизуют таким же способом, как пивное. **Обезжиренное молоко.** Для приготовления питательных сред употребляют снятое молоко, так называемый обрат (жир в молоке неблагоприятно влияет на рост некоторых микроорганизмов). Обрат получают сепарированием молока, нагретого до 34°C. Жир можно удалять и при отстаивании молока. При стерилизации молока следует учитывать, что его нельзя длительное время выдерживать в автоклаве, так как лактоза (молочный сахар), содержащаяся в молоке, может карамелизоваться. Обезжиренное молоко разливают в стерильные пробирки и выдерживают при 115°C (давление 0,5 атм) 15 мин. Перед стерилизацией кислотность обрата не должна превышать 22° Тернера, иначе молоко свернется. После стерилизации его выдерживают трое суток в термостате при 30°C, чтобы спровоцировать развитие спорообразующих и других стойких к нагреванию форм. Через 3 дня каждую пробирку с молоком просматривают и пробирки, в которых развились микроорганизмы, выбраковывают. При стерилизации в автоклаве иногда наблюдается побурение молока вследствие карамелизации молочного сахара и пептонизации казеина. При длительной стерилизации на дно пробирки выпадает осадок казеина, который может частично пептонизироваться. Перегретое побуревшее молоко в качестве среды использовать нельзя. **Дрожжевые среды.** **Дрожжевая вода.** 50—100 г сухих дрожжей размешивают в 1 л воды, кипятят 10 мин, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют текучим паром по полчаса в течение трех дней ежедневно. **Дрожжевой автолизат.** 200 г прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, добавляют 2 г Na_2HPO_4 , 1 н. раствор NaOH (до pH 6,1) и 5 мл хлороформа, выдерживают при 37°C двое суток, доводят до pH 7,4, кипятят 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют при 115°C полчаса. **Дрожжевой экстракт.** 1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, смесь кипятят 1 ч, трижды отфильтровывают через бумажный фильтр и стерилизуют при 115°C 30 мин. **Бобовый отвар.** 50 г фасоли (лучше белой)

заливают 1 л водопроводной воды и варят до готовности так, чтобы бобы не разварились. Полученный отвар фильтруют через вату, добавляют к нему 10 г сахара и доводят до первоначального объема. Устанавливают слабощелочную реакцию среды, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при давлении пара 1,5 атм в течение 30 мин.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационные задачи:

Задача № 3

При росте чистой культуры бактерий на коротком пестром ряде отмечается изменение цвета среды всех пробирок за исключением среды с сахарозой и пузырьки газа в поплавках.

1. Назовите основные компоненты среды Гисса.
2. Какие бактерии на этой среде дают такие изменения и почему?

Задача № 4

При росте культуры на среде Китта-Тароцци отмечается диффузное помутнение среды и пузырьки газа.

1. Назовите основные компоненты среды Китт-Тароцци.
2. Какие бактерии на этой среде дают такие изменения и почему?

Контрольные вопросы:

1. Что такое рост микробов?
2. Размножение микробов.
3. Колонии микробов. Их характеристика.
4. Что такое чистая культура?
5. Методы выделения чистой культуры?
6. Рассказать этапы метода выделения чистой культуры.
7. Условия выращивания микробов.
8. Дыхание бактерий.
9. Типы дыхания.
10. Питательные среды для культивирования анаэробов.
11. Методы культивирования и выделения чистых культур анаэробов.
12. Аппаратура для выращивания анаэробов.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Деловая игра «Слабое звено»

Для работы необходимо:

- 1 - набор вопросов по физиологии микроорганизмов
- 2 – лист бумаги со списком группы для ведения протокола игры
- 3 – секундомер

Ход работы:

1. Игру проводит педагог и помощник из числа студентов - счётчик
2. счётчик на листе пишет дату, номер группы, факультет, название деловой игры и список студентов
3. Преподаватель или ведущий задаёт вопросы студентам последовательно из набора вопросов
4. Студент должен за 5 сек дать ответ
5. Преподаватель словом «правильно» или «неверно» оценивает ответ, если «неверно», то сам даёт ответ
6. Счётчик ставит напротив фамилии студента «+» или «-», в зависимости от правильности ответа
7. Студенты проходят таким образом 2 тура вопросов
8. После 2-х туров вопросов игра приостанавливается и студенты, которые получили 2 минуса выбывают из игры как «слабое звено»
9. Игра продолжается по новому кругу с оставшимися студентами. Снова им предлагается новый тур вопросов и вновь отсеиваются студенты, у которых в сумме с первыми турами получилось 2 минуса
10. Отбирают самого сильно игрока
11. На листе против каждой фамилии ведущий регистрирует кто в каком туре выбыл и стал «слабым звеном».
12. Игра оценивается максимально в 100%
13. Выставленные баллы на листе протокола учитываются при подсчёте текущего итога занятия в качестве оценки за теоретическую часть
14. В нижней свободной части журнала преподаватель делает запись о проведении деловой игры

Перечень вопросов:

1. Приведите пример микроорганизмов, которые делятся путём почкования
2. Расскажите методы стерилизации
3. Идентификация – это ...

4. Продолжите фразу: «Микроаэрофилы – микроорганизмы, которые...
5. Приведите пример микроорганизма, который может размножаться как в присутствии кислорода, так и без него
6. Как называют группы микроорганизмов, которые могут выживать в присутствии кислорода, т.к. содержат фермент дисмутазу?
7. Какое проникновение веществ в микробную клетку идёт с потреблением энергии?
8. На какой питательной среде по назначению растут 90% микробов?
9. Метод Вейнберга для выделения чистой культуры является характерным для аэробных или анаэробных бактерий?
10. Для каких возбудителей характерно молочнокислое брожение?
11. Оптимальная температура для роста и свечения большинства видов микробов?
12. Сколько % составляет вода в цитоплазме бактерий?
13. Какое соединение образуется в присутствии кислорода, что оказывает ядовитое действие по отношению к анаэробам?
14. Актиномицеты и грибы размножаются путём спорообразования или поперечным делением?
15. Первая фаза размножения?
16. Продолжите: по консистенции питательные среды могут быть...
17. Назовите состав среды Эндо
18. В какой цвет окрашиваются лактозоотрицательные бактерии в среде Плоскирева?
19. Назовите состав среды Китта-Тароцци для культивирования анаэробов
20. Клостридии столбняка – это анаэробы или аэробы?
21. Ауксотрофы – это микробы ...
22. Должны ли быть питательные среды прозрачными?
23. Облигатные анаэробы развиваются в присутствии или отсутствии кислорода?

Вопросы суперигры:

1. Определите вид бактерий по циклу развития: клетки их превращаются в длинные нити, некоторые прорастают и дают начало новым клеткам и нитям.

2. Определите вид бактерий по циклу развития: вегетативные клетки палочковидной формы сменяются у них овальными или шаровидными микроцистами; клетки образуют плодовые тела с особым строением плодоносцев.
3. Определите pH среды, при котором могут жить сапрофиты и патогенные микробы.
4. Какой тип брожения характерен для представителей рода *Bifidobacterium*?
5. Назовите два пути получения энергии микроорганизмами?
6. Какой тип брожения характерен для представителей рода *Enterobacteriaceae*?
7. Перечислите транспорт питательных веществ в микробную клетку.

3.4 Методы выделения аэробных и анаэробных чистых культур, методы идентификации. Пересевы бактерий на плотные и жидкие питательные среды. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №3

Посев (бакпосев) — один из стационарных методов культивирования микроорганизмов на питательных средах, применяемый для культуральной диагностики в медицинской микробиологии, а также для исследования биохимических и биологических свойств в различных биотехнологических целях. В зависимости от содержания исследуемых бактерий в образце, проводят посев на плотные питательные среды (для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры). Если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения. Различают различные методы посева.

Для посевов применяют микробиологические петли, реже — иглы и шпатели. Чаще всего для культивирования используются пробирка и чашка Петри. Универсальным инструментом для засева культуры является бактериальная петля. Помимо неё, для посева уколом применяют специальную бактериальную иглу, а для посевов на чашках Петри — металлические или стеклянные шпатели. Для посевов жидких материалов наряду с петлёй используются градуированная и пастеровская пипетки.

Посев на плотные питательные среды (в пробирке)

При посеве берут пробирку в левую руку, а правой, плотно обхватив пробку четвертым и пятым пальцами, вынимают её. Удерживая другими пальцами той же руки петлю, сначала в горизонтальном, а потом в вертикальном положении её вносят в открытое пламя и прожигают до красного каления. Остывшей петлёй набирают посевной материал, после чего закрывают пробирку пробкой, предварительно проведя край пробирки над пламенем спиртовки. Пробку при этом обжигать не следует. Затем в пробирку со скошенным агаром вносят петлю с посевным материалом, опуская её до конденсата в нижней части среды, и зигзагообразным движением распределяют материал по скошенной поверхности агара. Вынув петлю, обжигают край пробирки и закрывают её пробкой. Петлю фламбируют в пламени горелки и ставят в штатив рукояткой вниз. Пробирки с посевами подписывают заранее, указывая дату посева, номер исследования и название культуры.

Посев на плотные питательные среды (в чашке Петри)

Посевы «газоном» производят на плотную питательную среду в чашке Петри. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку, петлёй или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара по методу Дригальского. После инкубации посева появляется равномерный сплошной рост бактерий с разделением их на колонии. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводят путём изучения морфологии бактерий, их культуральных, биохимических и других признаков, присущих каждому виду.

Колония — это видимое изолированное скопление представителей одного вида микроорганизмов, образующееся при размножении одной колониеобразующей единицы (КОЕ) на плотной питательной среде (на поверхности или в глубине её). Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим культуральным признакам.

Культуральная дифференцировка микроорганизмов

Колонии различаются по величине, форме, цвету, консистенции, контуру края, структуре и характеру поверхности:

- по величине — крупные (диаметр более 4—5 мм), средние (2—4 мм) и малые (1—2 мм)
- по форме — круглые, розеткообразные, листовидные и т. д.
- по цвету, зависящему от пигмента — белого, ярко-синего, красного цветов и т. д.
- по консистенции — сухие, влажные, сочные, слизистые
- по поверхности — гладкие, морщинистые, исчерченные, плоские, выпуклые, плосковыпуклые, вдавленные
- по краю — с ровными, волнистыми, бахромчатыми краями
- по структуре — могут иметь аморфную, зернистую, волокнистую внутреннюю структуру
- в чистой культуре, выращенной на скошенном питательном агаре, характер роста может быть сухим, влажным, ползучим, складчатым, пигментированным

В жидкой питательной среде одни бактериальные культуры дают диффузное помутнение, другие характеризуются придонным, пристеночным ростом. Некоторые культуры образуют плёнки на поверхности среды, другие — осадок на дне пробирки.

Культивирование анаэробов значительно отличается от культивирования аэробов: так как атмосфера содержит значительное количество кислорода, для его удаления из среды применяют специальные техники посева, среды и анаэроостат.

Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов: Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов можно подразделить на две основные группы: а) методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов; б) методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

Методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов.

Рассев шпателем по Дригальскому. Берут 3 чашки Петри с питательной средой. На 1-ю чашку петлей или пипеткой наносят каплю исследуемого материала и растирают шпателем по всей поверхности питательного агара. Затем шпатель переносят во 2-ю чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносят в 3-ю чашку и аналогичным способом производят посев. На 1-й чашке вырастает максимальное количество колоний, на 3-й — минимальное. В зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом

материале, на одной из чашек вырастают отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма.

Рассев петлёй (посев штрихом). Метод принципиально не отличается от предыдущего, но более экономичен. Берут одну чашку Петри с питательным агаром и делят её на 4 сектора, проводя разграничительные линии на внешней стороне дна чашки. Исследуемый материал петлёй вносят в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору на расстоянии одна от другой около 5 мм. Этой же петлёй, не изменяя её положения по отношению к агару, проводят такие же линии на других секторах чашки. В том месте, где на агар попало большое количество микробных клеток, рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток вырастают отдельные колонии.

Метод фильтрации. Основан на пропускании исследуемого материала через специальные фильтры с определенным диаметром пор и разделении содержащихся микроорганизмов по величине. Этот метод применяется главным образом для очистки вирусов от бактерий.

Методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

Метод Шукевича. Исследуемый материал засевают в конденсационную воду скошенного агара. При размножении подвижные формы микробов из конденсационной воды распространяются по агару, как бы «вползают» на его поверхность. Отсекая верхние края культуры в конденсационную воду свежескошенного агара и повторяя это несколько раз, можно получить чистую культуру.

Метод прогревания. Позволяет отделить спорообразующие бациллы от неспоровых форм. Прогревают исследуемый материал на водяной бане при 80°C 10-15 мин. При этом погибают вегетативные формы, а споры сохраняются и при посеве на соответствующую питательную среду прорастают.

Бактериостатический метод (метод ингибирования). Основан на различном действии некоторых химических веществ и антибиотиков на микроорганизмы. Определенные вещества угнетают рост одних микроорганизмов и не оказывают влияния на другие. Например, небольшие концентрации пенициллина задерживают рост грамположительных микроорганизмов и не влияют на грамотрицательные. Смесь пенициллина и стрептомицина позволяет освободить нитчатые грибы и дрожжи от бактериальной флоры.

Серная кислота (5% раствор) быстро убивает большинство микроорганизмов, а туберкулёзная палочка выживает в этих условиях.

Метод обогащения. Исследуемый материал засевают на элективные питательные среды, способствующие росту определенного вида микроорганизмов.

Метод заражения лабораторных животных или растений. Применяют в целях выделения и идентификации патогенных микроорганизмов и отделения их от сапрофитной флоры. Для заражения подбирают наиболее восприимчивые к предполагаемому возбудителю инфекции виды животных или сорта растений. После появления у зараженных организмов признаков болезни их убивают и производят посев органов и тканей на питательные среды. При выделении и изучении облигатных паразитов этот метод является основным и единственным.

Методы культивирования и выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов.

Для культивирования анаэробов необходимо понизить окислительно-восстановительный потенциал среды, создать условия анаэробноза, т.е. пониженного содержания кислорода в среде и окружающем ее пространстве. Это достигается применением физических, химических и биологических методов.

Физические методы. Основаны на выращивании микроорганизмов в безвоздушной среде, что достигается:

- 1) посевом в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества;
- 2) посевом микроорганизмов в глубину плотных питательных сред;
- 3) механическим удалением воздуха из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы;
- 4) заменой воздуха в сосудах каким-либо индифферентным газом.

Метод Вейнберга используют для получения чистых культур строгих анаэробов. Культуры, выращенные на среде Китта-Тароцци, вносят в сахарный бульон. Затем пастеровской пипеткой с запаянным концом материал переносят в узкие пробирки (трубки Виньяля) с сахарным МПА, погружая пастерку до дна пробирки. Засеянные пробирки быстро охлаждают холодной водой, что позволяет зафиксировать отдельные бактериальные клетки в толще затвердевшего агара. Пробирки инкубируют, и изучают выросшие колонии. При обнаружении подозрительной колонии на её месте делают распил,

колонию быстро отбирают и засеивают на среду Китта-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры).

Химические методы. Основаны на поглощении кислорода воздуха в герметически закрытом сосуде (анаэроостате, эксикаторе) такими веществами, как пирогаллол или гидросульфит натрия.

Биологические методы. Основаны на совместном выращивании анаэробов со строгими аэробами. Для этого из застывшей агаровой пластинки по диаметру чашки вырезают стерильным скальпелем полоску агара шириной около 1 см. Получается два агаровых полудиска в одной чашке. На одну сторону агаровой пластинки засевают аэроб, например часто используют *S. aureus* или *Serratia marcescens*. На другую сторону засевают анаэроб. Края чашки заклеивают пластилином или заливают расплавленным парафином и помещают в термостат. При наличии подходящих условий в чашке начнут размножать аэробы. После того, как весь кислород в пространстве чашки будет ими использован, начнется рост анаэробов (через 3-4 сут.). В целях сокращения воздушного пространства в чашке питательную среду наливают возможно более толстым слоем.

ГЛАВА IV ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ: СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ, РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ. БАКТЕРИОФАГИ.

4.1 Характеристика вирусов.

Наряду с одно- и многоклеточными организмами в природе существуют и другие формы жизни. Таковыми являются вирусы, не имеющие клеточного строения. Они представляют собой переходную форму между неживой и живой материей.

Вирусы (лат. *vīrus* — яд) были открыты в 1892 г. русским ученым Д. И. Ивановским при исследовании мозаичной болезни листьев табака.

Каждая вирусная частица состоит из РНК или ДНК, заключенной в белковую оболочку, которую называют капсидом (простые вирусы) и суперкапсидом или пеплосом окруженный липопротеиновой оболочкой (сложные вирусы). Капсид и оболочка (суперкапсид) защищают вирионы от воздействия окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие (адсорбцию) с определенными клетками, а также антигенные и иммуногенные свойства вирионов.

Оболочка вируса является производной структурой от мембран вирус-инфицированной клетки (рис. 16). Полностью сформированная инфекционная частица называется вирионом.

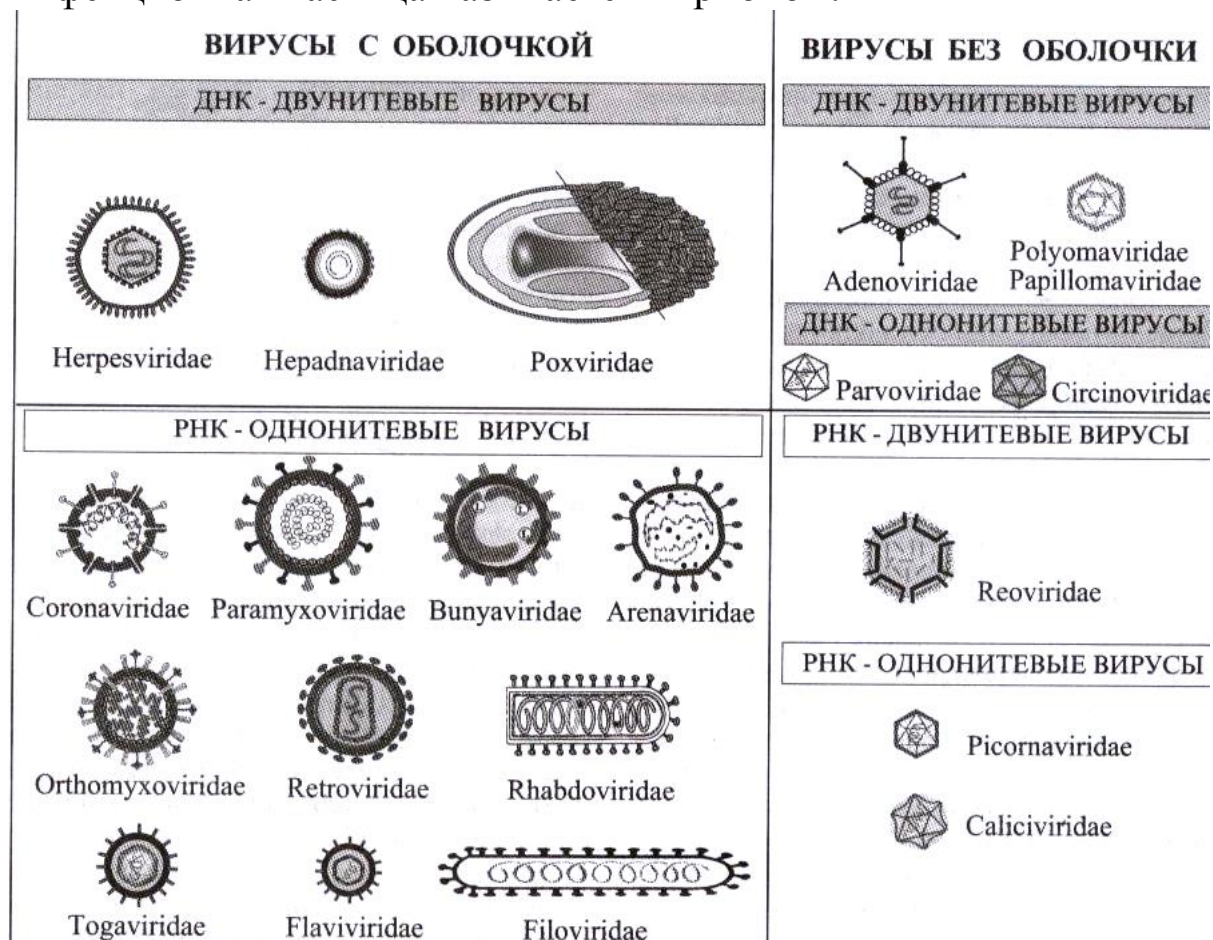


Рисунок 16. Классификация и морфология вирусов

У некоторых вирусов (например, герпеса или гриппа) есть еще и дополнительная липопротеидная оболочка, возникающая из плазматической мембраны клетки хозяина.

Вирусы способны размножаться только в клетках других организмов. Вне клеток организмов они не проявляют никаких признаков жизни. Многие из них во внешней среде имеют форму кристаллов.

Размеры вирусов определяют с помощью электронной микроскопии, методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор, методом ультрацентрифугирования. Наиболее мелкими вирусами являются парвовирусы (18 нм) и вирус полиомиелита (около 20 нм), наиболее крупным – вирус натуральной оспы (около 350 нм).(рис.19)

Различают ДНК- и РНК-содержащие вирусы. Они обычно гаплоидны, т. е. имеют один набор генов. Исключением являются

ретро-вирусы, имеющие диплоидный геном. Геном вирусов содержит от шести до нескольких сотен генов и представлен различными видами нуклеиновых кислот: двунитевыми, одонитевыми, линейными, кольцевыми, фрагментированными.

Среди РНК-содержащих вирусов различают вирусы с положительным (плюс-нить РНК) геномом. Плюс-нить РНК этих вирусов выполняет наследственную (геномную) функцию и функцию информационной РНК (иРНК). Имеются также РНК-содержащие вирусы с отрицательным (минус-нить РНК) геномом. Минус-нить РНК этих вирусов выполняет только наследственную функцию.

Классификация.

В вирусологии используют следующие таксономические категории: семейство (название оканчивается на *viridae*), подсемейство (название оканчивается на *virinae*), род (название оканчивается на *virus*). Однако названия родов и особенно подсемейств даны не для всех вирусов. Вид вируса не получил биномиального названия, как у бактерий.

В основу классификации вирусов положены следующие категории: тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), ее структура, количество нитей (одна или две), особенности воспроизводства вирусного генома, размер и морфология вирионов, количество капсомеров и тип симметрии нуклеокапсида, наличие оболочки (суперкапсида), чувствительность к эфиру и дезоксихолату, место размножения в клетке, антигенные свойства и др.

Вирусы в зависимости от экологических особенностей делятся на следующие группы:

- 1) вирусы человека
- 2) вирусы животных
- 3) вирусы растений
- 4) вирусы насекомых
- 5) вирусы бактерий

По типу содержания нуклеиновой кислоты делятся на 3 подгруппы:

- 1) рибовирусы - вирусы гриппа
- 2) дезоксивирусы – вирусы натуральной оспы
- 3) неклассифицированные – вирусы гепатита.

Культивирование вирусов.

Для культивирования вирусов используют лабораторных животных, культуры тканей и куриные эмбрионы.

Культивирование на животных.

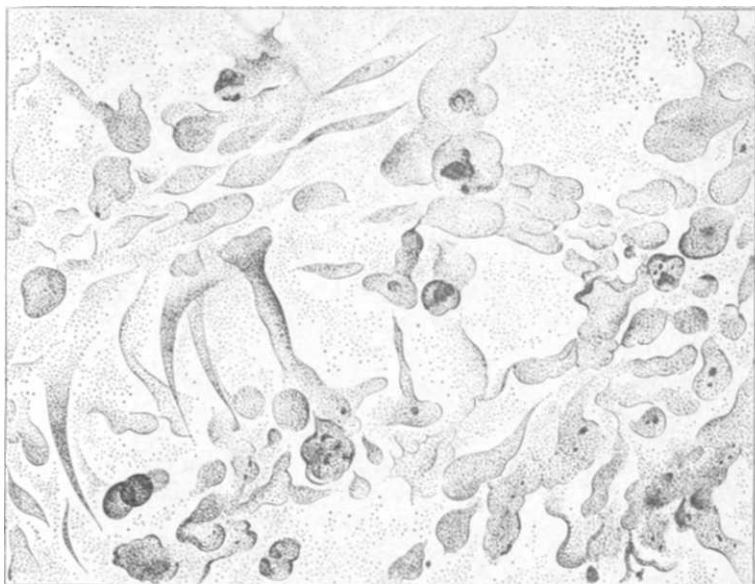


Рис. 15. Видимые проявления действия вирусов в клеточных культурах.

Для создания моделей вирусных инфекционных болезней и выделения вирусов используют лабораторных животных (белых мышей, хомяков, крыс, кроликов и др.). Чувствительность животных к вирусам зависит от вида животного и его возраста.

Культивирование в культурах клеток и тканей.

Культуры клеток (тканей) получают из тканей животных и человека. Их делят на первичные, которые используют только в течение одной генерации, и перевиваемые, которые поддерживают путем пассажей (перевивок) длительное время. Клетки перевиваемой культуры ткани готовят из нормальных (чаще эмбриональных) и злокачественных линий клеток; они способны сравнительно прочно прикрепляться к стеклу флакона, образовывать монослой и многократно размножаться *in vitro*. Репродукция вирусов в культуре клеток сопровождается так называемым цитопатическим действием (ЦПД), которое проявляется в изменении морфологии клеток и их гибели (рис.15).

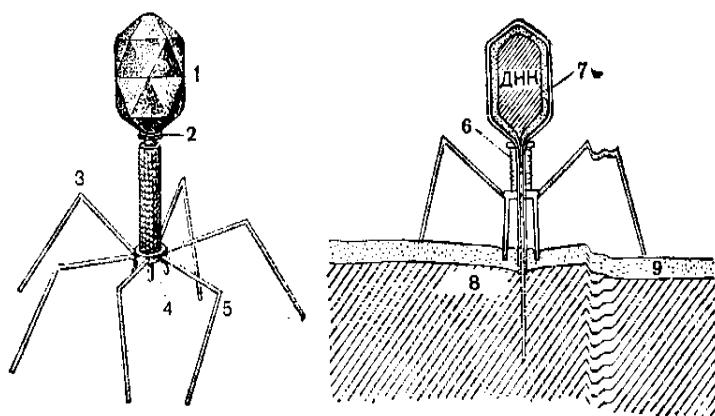
Культивирование в куриных эмбрионах.

Куриный эмбрион – удобная модель для культивирования вирусов, риккетсий и хламидий с целью получения вирусов и для приготовления диагностических, профилактических и лечебных препаратов – диагностикумов и вакцин. Куриные зародыши используются в возрасте от 8 до 12 дней, перед заражением скорлупу обрабатывают 70% спиртом, обжигают, смачивают йодом (2% настойка), вторично протирают спиртом и обжигают. Вирусосодержащий материал наносят на хорион – аллантоисную оболочку или вводят в желточный мешок, аллантоисную полость, либо в амнион (ткань эмбриона). После инфицирования эмбрионы помещают в термостат при 37°C.

Инновационные методы, применяемые на занятии: Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют её самостоятельно, затем 3- 5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают своё мнение. В конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Культивирование вирусов	Краткая характеристика
1.	На курином эмбрионе.	
2.	На животных.	
3.	На культуре клеток и тканей.	



4.2 Бактериофаги

—это вирусы, обладающие способностью проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их лизис.

Фаги широко распространены в

природе — в воде, почве, сточных водах, в кишечнике

Рисунок 17. Строение бактериофагов.

животных, человека, птиц, в раковых опухолях растений. Фаг был выделен из молока, овощей. Источником фагов патогенных микробов являются больные люди и животные, бактерионосители, реконвалесценты. Выделяются с содержимым кишечника, мочой, его обнаруживали в мокроте, слюне, гное, носовом секрете. Особенно большое количество фагов выделяется в период выздоровления.

Фаг получают путем добавления в котлы с бульонными культурами специального производственного фага, который выдерживают сутки при 37°C, затем фильтруют. Проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность (силу действия).

Структура и морфология фагов: большинство фагов состоит из головки, воротничка и хвостового отростка, заканчивающегося базальной пластинкой, к которой прикреплены фибриллы (рис.17).

Содержание головки — это ДНК (иногда РНК). Хвостовой отросток имеет цилиндрический стержень, окруженный сократительным чехлом. В оболочку фаговой частицы и отросток входит белок, состоящий из полиаминов: спермин, путресцин, кислоторастворимый пептид.

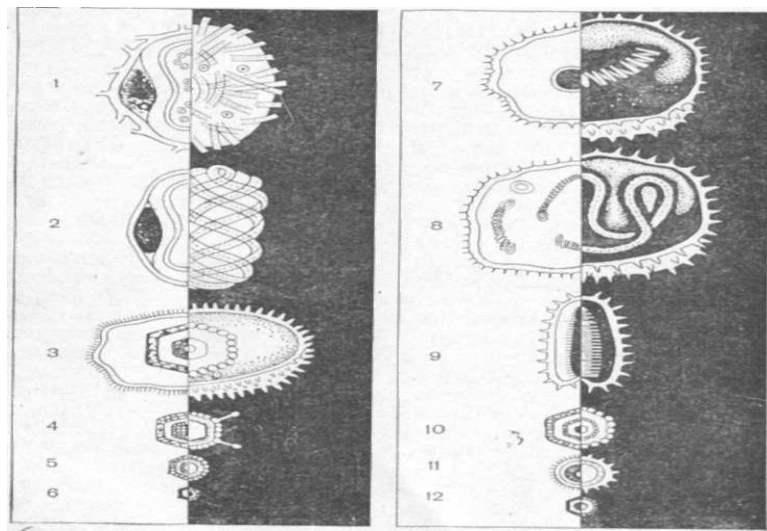


Рис. 19. Форма и сравнительная величина некоторых вирусов.

1 — вирус оспы; 2 — вирус паравакцины; 3 — вирус герпеса; 4 — аденовирус; 5 — паповавирус; 6 — парвовирус; 7 — вирус гриппа; 8 — парамиксовирус; 9 — рабдовирус; 10 — реовирус; 11 — альфа-вирус; 12 — энтеровирус

Фаги более устойчивы во внешней среде, чем бактерии. Выдерживают давление до 6000 атм., устойчивы к действию радиации. До 13 лет не теряют своих литических свойств, находясь в запаянных ампулах.

Некоторые вещества, например, хлороформ и ферментативные яды (цианид, хлорид), не оказывают влияния на

фаги, но вызывают гибель бактерий.

Однако фаги быстро погибают при кипячении, действии кислот, УФ-лучей.

Специфичность.

Фаги обладают строгой специфичностью, т. е. способны паразитировать только в определенном виде микроорганизмов: стрептококках, стафилококках и т. д. Фаги с более строгой специфичностью, которые паразитируют только на определенных представителях данного вида, называются типовыми. Фаги, которые лизируют микроорганизмы близких видов, например, видов, входящих в род возбудителей дизентерии (шигелл), называются поливалентными.

Механизм взаимодействия.

По механизму взаимодействия с клетками фаги подразделяются на вирулентные и умеренные.

Феномен бактериофагии, вызываемый вирулентными фагами, проходит в 5 фаз:

- 1) адсорбция — с помощью нитей хвостового отростка;
- 2) проникновение в клетку;
- 3) репродукция белка и нуклеиновой кислоты внутри клетки;
- 4) сборка и формирование зрелых фагов;
- 5) лизис клетки, выход фага из нее.

Умеренные фаги не лизируют все клетки, а с некоторыми вступают в симбиоз. Клетка выживает. Умеренный фаг превращается в профаг, который не обладает литическим действием.

Лизогенезация бактерий сопровождается изменением их морфологических, культуральных, ферментативных, антигенных и биологических свойств. Так, например, нетокси-генные штаммы коринебактерий дифтерии в результате лизогенизации превращаются в токсигенные. Практическое использование фагов: * назначают с профилактической и лечебной целью при дизентерии, брюшном тифе, паратифах, холере, чуме, стафилококковой инфекции; в диагностике инфекционных заболеваний; метод фаготипирования дает возможность устанавливать вид бактерий и тем самым выявлять источники инфекции.

Практическое применение фагов.

Бактериофаги широко используют в микробиологических лабораториях (в лабораторной диагностике инфекций), а также в клинике для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

1. Фагоиндикация — метод определения видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных в чистой культуре, по типу лизирующего фага. По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды (например, в воде) можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных болезней.

2. Фаготипирование — используется при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Метод основан на строгой специфичности действия фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, «бляшки», или «негативной колонии», фага). Методику фаготипирования используют **для выявления источника и путей распространения инфекции** (эпидемиологическое маркирование). Выделение бактерий

одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.

3. Фаготерапия – применение бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний. Чаще всего используются брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей.

4. Фагопрофилактика - применение бактериофагов с целью профилактики инфекционных заболеваний у людей, бывших в контакте с больным, но статус которых еще не известен (характерные симптомы еще не проявляются).

5. Бактериофаги широко применяют в генной инженерии и биотехнологии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

Качественный метод определения. Чашку Петри с МПА засеивают суточной культурой бактерий, чувствительной к данному фагу, после чего вносят каплю фильтрата, в котором содержатся соответствующие фаги; через 24 часа инкубации при 37°C на чашке отмечают наличие зоны лизиса.

Количественный метод определения фагов (титрование фага). Берут 10 пробирок, в каждую наливают по 4,5 мл МПБ. В 1-ю пробирку пипеткой вносят 0,5 мл исходного раствора испытуемого бактериофага. Из первого разведения 0,5 мл переносят во 2-ю пробирку, из 2-й – 0,5 мл в 3-ю и т.д. до 9-й пробирки включительно, таким образом, получая десятикратные разведения фага. 10-ю пробирку оставляют для контроля, она не содержит бактериофага. Во все пробирки вносят по одной капле суточной культуры микроорганизмов. В качестве тест-культуры используют штамм бактерий, чувствительный к испытуемому фагу. Пробирки помещают в термостат при 37°C на 24 часа, затем производят учет результатов. **Титром** бактериофага считается наибольшее разведение фага, при котором наблюдается лизис культуры.

Контрольные вопросы:

1. Изучение морфологии различных вирусов.
2. Изучение демонстрационных препаратов внутриклеточных включений- телец Гварнери и Бабеша-Негри.
3. Ознакомление с методами культивирования вирусов:
 - а) заражение куриного эмбриона;
 - б) вскрытие куриных эмбрионов и лабораторных животных, зараженных вирусами;
3. Изучение строения бактериофагов.
4. Качественный и количественный методы титрования фага.

Инновационные методы, применяемые на занятии: Тренинг Бумеранг

Студенты делятся на группы, и каждой группе даётся своё задание по теме занятия.

Каждая группа, состоящая из 3 – 4 студентов высказывает своё мнение и между группами начинаю дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Понятие вирусов.
2. Препараты фагов.
3. Генетика микроорганизмов.

Задание для 2-ой группы

1. Чувствительность вирусов к физическим и химическим факторам.
2. Чувствительность вирусов к физическим и химическим факторам.
3. Методы дезинфекции и стерилизации.

Задание для 3-ой группы

1. Методы культивирования вирусов.
2. Строение бактериофагов.
3. Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.

Задание для 4-ой группы

1. Классификация вирусов.
2. Культивирование вирусов на животных.
3. Резистентность фага.

Задание для 5-ой группы

1. Культивирование в культурах клеток и тканей.
2. Качественный метод определения фагов.
3. Что такое ЦПД.

Задание для 6-ой группы

1. Количественный метод определения фагов.
2. Строение бактериофага
3. Применение бактериофагов в медицине.

4.3 Определение фаготипа бактерий. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №4

В основу фаготипирования положен принцип совместного выращивания типизируемой культуры с типовым бактериофагом. Наступление лизиса является индикаторным признаком, определяющим типовую принадлежность бактерий.

Для фаготипирования бактерий рекомендуется применять 1,5% мясо-пептонный агар с 5% глицерина.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма отсевают на бульон и помещают в термостат при 37 °С. С появлением заметного роста культуру набирают в пастеровскую пипетку с тонко оттянутым капилляром и наносят небольшими каплями на поверхность хорошо подсушенной питательной среды. Расположение капель на поверхности агара можно наметить заранее. Количество капель должно соответствовать числу типовых фагов плюс 1 капля для контроля роста культуры. Каплям культуры дают возможность впитаться, для чего требуется 3-10 мин. Затем на поверхность каждой капли наносят эксцентрично по 1 капле типового фага с таким расчетом, чтобы часть культуры оставалась свободной от воздействия бактериофага. Сектор, оставшийся свободным от воздействия бактериофага, является контролем роста культуры. При постановке опыта для каждого типа бактериофага берут отдельную пипетку. Типовой бактериофаг применяют в критическом тест - разведении, т. е. в наибольшем разведении, при котором исследуемый бактериофаг вызывает на плотной питательной среде явный лизис культуры

гомологического фаготипа и не лизирует культуры других гетерологических типов. После того как бактериофаг впитается в питательную среду, чашки с посевом помещают в термостат при 37 °С. Через 6—8 ч производят учет результатов фаготипирования. Непрерывное 6-часовое инкубирование чашек в термостате можно заменить 2-часовой инкубацией, после которой чашки переносят в холодильник, а на следующий день их снова на 3—4 ч помещают в термостат и затем учитывают результаты.

Наличие хорошо выраженного лизиса исследуемой культуры с одним из типовых фагов указывает на принадлежность культуры к данному фаготипу. Появление выраженных признаков лизиса одновременно в нескольких каплях указывает на то, что степень разведения типовых фагов, взятых в опыт, недостаточна. В этих случаях опыт следует повторить с большими разведениями бактериофагов.

Учет фаготипирования производят как в проходящем, так и в падающем свете. Интенсивность лизиса отмечают с помощью четырехкрестной системы.

ГЛАВА 5. МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ. ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОБЫ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ. АНТИБИОТИКИ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБИОТИКАМ

5.1 Микрофлора лекарственных растений и растительного сырья

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, высших растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Для приготовления лекарств служат самые разнообразные растения и работники аптечных учреждений, фармацевтических фабрик и заводов должны обеспечивать сохранность лекарственного сырья от микробной порчи.

Все микроорганизмы, населяющие лекарственные растения, можно разделить на две группы:

- представители нормальной микрофлоры растений;
- фитопатогенные микроорганизмы - возбудители заболеваний растений.

Нормальная микрофлора растений

Микроорганизмы являются постоянными обитателями растений, лекарственного сырья растительного происхождения. Различные группы микроорганизмов могут находиться на поверхности или внутри различных частей растений, их корней, семян, плодов, часть из них (фитопатогенные) могут приводить к болезням растений и порче лекарственного сырья. Работники аптечных учреждений должны способствовать сохранности лекарственного сырья от микробной порчи.

Микроорганизмы, населяющие лекарственные растения, можно разделить на две группы:

- представители нормальной микрофлоры растений;
- фитопатогенные микроорганизмы - возбудители заболеваний растений.

Нормальная микрофлора растений представлена ризосферными и эпифитными микробами.

Зона почвы, находящаяся в контакте с корневой системой растений, носит название ризосферы, а микроорганизмы, развивающиеся здесь, называют ризосферными. Количество микроорганизмов в ризосфере в сотни раз больше, чем в остальной почве. Почвенные микробы могут оказывать благоприятное воздействие на растения, что обусловлено:

- минерализацией органических веществ и растительных остатков;
- образованием различных факторов роста (витаминов, аминокислот, ферментов), усиливающих обменные процессы в растениях и способствующих усилению корневого питания;
- антагонизмом в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

Состав микрофлоры ризосферы специфичен для различных растений. Основная масса прикорневой микрофлоры представлена грамотрицательными неспороносными бактериями рода *Pseudomonas*, микобактериями и грибами, главным образом

базидиомицетами. Грибы образуют симбиоз с корнями растений, в том числе и лекарственных, называемый микоризой.

В зависимости от особенностей симбиоза грибов с растениями различают эктотрофные и эндотрофные микоризы. Эктотрофные – ассоциации, при которых гриб поселяется на их поверхности корней, образуя своего рода чехол из мицелия. При эндотрофных микоризах мицелий гриба располагается в клетках коры корней растений, где образует скопления в виде клубков.

Микориза благоприятна для развития растений:

- увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разрастаний гиф гриба;
- грибы своими ферментами разлагают органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой;
- микоризные грибы снабжают растения ростовыми факторами.

Растения выделяют ряд веществ, стимулирующих развитие гриба. Грибы получают от растений углеводы, служащие источником энергии.

Эпифитной называется микрофлора, находящаяся на надземных частях растений. По качественному составу она довольно однообразна, типичными ее представителями являются *Pseudomonas furbicola aurum* - граммотрицательные короткие подвижные палочковидные бактерии, образующие колонии золотистого цвета на МПА; *Pseudomonas fluorescens* - полиморфные граммотрицательные палочковидные бактерии с полярно расположенными жгутиками, обуславливающие флуоресценцию при росте на МПА и МПБ. Реже встречаются споровые бактерии *Bacillus mesentericus*, плесневые и дрожжевые грибы. Эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных бактерий, защищая растения от заболеваний.

5.2 Фитопатогенные микроорганизмы

Инфекционные болезни растений вызываются фитопатогенными микроорганизмами. Заражение растений происходит через инфицированные семена, почву, грунтовые и дождевые воды, насекомых. Основным источником является почва, т.к. в ней содержатся остатки неперегнивших растений.

Фитопатогенные микробы могут проникать в растения через естественные образования (чечевички, нектарники, желёзки, корневые волоски) и повреждения. Некоторые микроорганизмы вырабатывают ферменты, лизирующие кутикулу растений и облегчающие внедрение возбудителя. Попадая в растение и достигнув критической концентрации, микроорганизмы вызывают заболевания. Различают общие поражения всего растения вследствие распространения возбудителя в сосудистой системе и местные или очаговые – поражения на листьях, стволах, ветвях, корнях и корневищах, возникающие при интрацеллюлярном распространении.

По совокупности анатомических и физиологических изменений определяют тип болезни растений:

Камеде-, смоло-, слизетечения. Чаще вызывают бактерии рода *Erwinia* и грибы (*Ascomycetes*), наблюдают у лиственных и хвойных деревьев.

Сухая и мокрая гниль. Размягчаются и разрушаются отдельные участки тканей растения за счет деятельности бактерий (род *Pectobacterium*) и грибов (*Ascomycetes* и несовершенные грибы).

Мучнистая роса. На листьях и побегах возникает белый налет, который является следствием размножения грибов (*Ascomycetes*).

Пожелтение, увядание, засыхание. Чаще всего вызывают грибы (*Fungi imperfecti*), реже бактерии (род *Corynebacterium*), может носить неинфекционный характер.

Чернь. На листьях и побегах появляется черная пленка вследствие развития грибов, бактерий рода *Erwinia*.

Ожог. Листья, молодые побеги, цветы, плоды буреют, чернеют. Возбудителями ожога являются бактерии рода *Erwinia*.

Пятнистость. Некоторые бактерии (род *Pseudomonas*), грибы (класс *Ascomycetes* и несовершенные грибы), вызывают образование разного цвета, формы, размеров пятен на листьях, плодах, семенах.

Опухоли. Местное увеличение ствола, ветвей, корней, корневищ в виде наростов, вздутий, утолщений за счет гиперплазии клеток. Эти заболевания вызывают бактерии (род *Agrobacterium*), грибы.

Язвы. Проявляются в виде углублений, часто окруженных наплывом. Вызываются бактериями (род *Erwinia*), грибами, механическими повреждениями.

Мозаика листьев. На листьях появляются бледно окрашенные пятна, чередующиеся с нормально окрашенными участками. Вызывается вирусами (вирус мозаичной болезни табака).

Ведьмины метлы. Образование побегов из спящих почек вызывают бактерии (род *Rhizobium*), грибы (класс *Ascomycetes*) и вирусы.

Деформация. Проявляется в изменении формы органов (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость) вследствие поражения грибами (*Ascomycetes* и несовершенные грибы), вирусами (семейство *Reoviridae*).

Принципиально важным является отклонение от нормы обменных процессов вплоть до качественных изменений клеточных структур у больных растений, что приводит к изменению химического состава тканей и снижению содержания активных веществ. Использование их в качестве сырья в аптечных условиях становится невозможным.

Растительный организм обладает защитными механизмами, противодействующими внедрению и размножению фитопатогенных бактерий. К ним можно отнести особенности покровных тканей, высокую кислотность клеточного сока, образование биологически активных веществ – фитонцидов, подавляющих развитие микроорганизмов.

5.3 Борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.

Для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами проводятся следующие мероприятия:

а. Биологические:

- лечение антибиотиками,
- селекция, гибридизация,
- возделывание выносливых растений,

б. Физико-химические:

- удаление больных растений,
- сжигание листьев,
- дезинфекции семян и посадочного материала,
- дезинфекция почвы,
- опрыскивании растений химическими веществами,
- очистка и обработка семян,
- уничтожение переносчиков возбудителей болезней, обитающих на растениях.

в. Карантинные:

- защита от завоза больных растений.

Высушенные растения, их части называют лекарственным сырьем. Из него готовят лекарственные препараты. Лекарственное сырье загрязняется микробами во время сборки, сушки, измельчения, упаковки, хранения.

Признаки порчи лекарственного сырья: изменение цвета, гниение, плесень.

В испорченном сырье уменьшается количество лекарственных веществ и накапливаются токсины. Такое сырье непригодно для получения лекарственных препаратов.

Для оценки санитарного состояния лекарственного сырья определяют микробное число. Кол-во микробов в 1 г сырья называется микробным **числом**.

Меры предупреждения **порчи** лекарственного **сырья**:

- уничтожать больные растения,
- соблюдать технологию транспортировки, сушки, хранения переработки.

Фитопатогенные бактерии относятся к родам: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* (табл.2). Вирусы вызывают более 20% болезней растений. Большинство фитопатогенных вирусов относится к семейству *Reoviridae*, родам *Phytoreovirus*, *Fijvirus*. Из фитопатогенных грибов следует отметить два класса – аскомицеты (*Ascomycetes*), и несовершенные грибы (*Fungi imperfecti*).

Таблица 2. Фитопатогенные бактерии - возбудители инфекционных заболеваний лекарственных растений

Роды	Виды	Вызываемые заболевания
<i>Erwinia</i>	<i>E. amylovora</i>	Ожог, увядание
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i>	Пятнистость
<i>Xanthomonas</i>	<i>X. heterocea</i>	Пятнистость, увядание
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. insidiosum</i> , <i>C. fasciens</i>	Увядание
<i>Pectobacterium</i>	<i>P. phetophthorum</i> , <i>P. aroidae</i>	Гнили
<i>Rhizobium</i>	<i>R. legyminosorum</i>	Язвы
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Опухоли

5.4 Микрофлора растительного лекарственного сырья

Лекарственное растительное сырье может инфицироваться патогенными микроорганизмами на всех этапах заготовки (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. При хранении сырья важно соблюдение санитарного режима в аптеках. Неблагоприятное действие оказывают влажность, пыль, насекомые и другие факторы, повышающие микробное обсеменение и приводящие к порче лекарственного сырья. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание, плесневение всего растения или его частей. При этом резко снижается содержание или полностью исчезают фармакологически активные вещества, использование такого недоброкачественного сырья становится бесполезным или вредным. Легко портятся плоды, ягоды и корневища, богатые углеводистыми соединениями, более устойчивыми являются сухие листья, корни, кора.

Состав микроорганизмов зависит от вида лекарственного сырья, его структуры и фармакологических свойств. Преобладают грибы (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*), актиномицеты и спорообразующие виды бактерий (*B. subtilis*, *B. megatherium*).

5.5 Микрофлора готовых лекарственных форм

Микробной порче подвергаются готовые лекарственные формы: сухие (порошки, сборы), жидкие (микстуры, настои, отвары, капли), мягкие (мази, пасты, шарики, свечи) и стерильные инъекционные препараты. Лекарства с высокой обсемененностью микробами, особенно патогенными, могут вызывать инфекционные заболевания у людей. К фитозоонозам – инфекциям, вызываемым патогенными микроорганизмами, общими для теплокровных (включая человека) и растений чаще всего относят кишечный иерсиниоз, листериоз, псевдотуберкулез, микотоксикозы. Размножение микроорганизмов в готовых лекарствах ведет к изменению их физических и органолептических свойств, появлению токсичности.

Причиной микробного обсеменения готовых лекарств может быть микробное загрязнение растительного лекарственного сырья, воздуха производственных помещений, оборудования, посуды, дистиллированной воды, рук персонала.

Инъекционные препараты, глазные капли и мази, препараты для новорожденных должны быть стерильными. В ряде случаев инъекционные средства, оставаясь стерильными, обладают пирогенными свойствами. Пирогенная реакция организма человека, возникающая за счет применения лекарств, характеризуется повышением температуры, вазомоторными расстройствами, в тяжелых случаях – шоковым состоянием. Пирогенные вещества (пирогены), представляющие собой эндотоксины (преимущественно грамотрицательных бактерий), не инактивируются при кипячении, для их разрушения необходимо автоклавирование в течение 3 ч.

Причиной пирогенности лекарственных препаратов (появление эндотоксинов и вследствие – пирогенности) являются микробное загрязнение дистиллированной воды, нарушения асептики технологического процесса, увеличение времени между приготовлением раствора и стерилизацией.

Из жидких инъекционных лекарственных форм легче всего обсеменяются микробами настои и отвары; при их хранении появляются признаки порчи: муть, изменение цвета, пленка, необычный запах. Срок хранения этих препаратов ограничен. Спиртовые настойки меньше подвержены порче вследствие антимикробного действия алкоголя.

Сухие порошкообразные вещества, особенно тальк и крахмал, мягкие лекарственные формы также подвержены микробному загрязнению. Их микробная порча носит очаговый характер и проявляется изменением цвета и консистенции вещества.

Микробный состав готовых лекарств может быть представлен следующими группами:

- плесневые и дрожжевые грибы - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*;
- кокки - сарцины, стафилококки;
- спороносные палочковидные бактерии - *B. subtilis*, *B. mesentericus*.

Предупреждение микробной порчи готовых лекарственных веществ возможно при соблюдении условий, снижающих их микробное загрязнение: соблюдение правил личной гигиены, качественное обеззараживание воздуха аптечных помещений, правильная обработка посуды, оборудования, при необходимости (стерильные лекарства) - асептическое изготовление.

Микрофлора нестерильных лекарственных форм.

Нестерильными называются лекарственные формы, в которых допускается содержание определенного количества непатогенных микробов.

Основные лекарственные формы: настои, настойки, порошки, таблетки, мази, капли и др.

Признаки порчи нестерильных лекарственных препаратов: изменение цвета, неприятный запах, помутнение, осадок, пленка, изменение консистенции.

В жидких и мягких лекарственных формах условия для роста и размножения микроорганизмов более подходящие. Это связано с высоким содержанием воды, растительных масел и отсутствием консервантов в составе многих мазей. Более того, содержание в составе мазей антимикробных веществ не всегда гарантирует их микробную чистоту. В жидких лекарственных формах метаболиты микроорганизмов могут изменить его химический состав, а также привести к образованию токсичных продуктов. В твёрдых лекарственных формах риск микробной порчи минимален, так как отсутствуют условия для размножения микробов. Высокая загрязнённость сырья, его неправильное хранение может приводить к изменению свойств.

Обсеменение лекарственного сырья может проходить на всех этапах его заготовки и при хранении. Активному размножению микроорганизмов способствует увлажнение растений и растительного сырья. Размножившиеся микроорганизмы приводят к изменению фармакологических свойств препаратов, полученных из лекарственных растений. Микроорганизмы могут также попадать из окружающей среды, от людей и обсеменять лекарственные препараты в процессе их изготовления из растительного сырья.

Для соблюдения санитарного режима изготовления лекарственных препаратов проводится санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды предприятия и каждой серии выпускаемой лекарственной формы. Контроль стерильности лекарственных средств проводится путем посева на тиогликолевую среду для выявления различных бактерий, в том числе анаэробов; при посеве на среду Сабуро выявляют грибы, главным образом рода Кандида. Стерильность лекарственных средств с антимикробным действием определяют путем мембранной фильтрации: фильтр после фильтрации исследуемого препарата делят на части и вносят для

подращивания задержанных микроорганизмов в жидкие питательные среды. При отсутствии роста препарат считается стерильным.

Лекарственные средства, не требующие стерилизации, содержат микроорганизмы, поэтому их испытывают на микробиологическую чистоту: проводят количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов в 1г или 1мл препарата, а также выявляют микроорганизмы (бактерии семейства энтеробактерий, синегнойная палочка, золотистый стафилококк), которые не должны присутствовать в нестерильных лекарственных средствах.

В нестерильных лекарственных формах определяют:

1. Микробное число - количество бактерий и грибов в 1 г (мл).
2. Наличие кишечной палочки, золотистого стафилококка, синегнойной палочки.

Нормы микробов в нестерильных лекарственных формах:

1. В 1г (мл) препарата для приема внутрь не более 1000 бактерий и 100 грибов.
2. В 1г (мл) препарата для местного применения - не больше 100 микробов, в т.ч. грибов.
3. В таблетированных препаратах не должно быть патогенной микрофлоры, а общая обсемененность не должна превышать 10 тыс. микробных клеток на таблетку.
4. Не допускается наличие кишечной палочки, золотистого стафилококка, синегнойной палочки.

Пути повышения микробной чистоты нестерильных лекарственных средств.

В зависимости от источников и путей попадания микроорганизмов в лекарственные средства возможны различные подходы к обеспечению требуемого уровня микробной чистоты нестерильных лекарственных средств. Если микробное обсеменение вызвано попаданием вместе с сырьём, то для достижения требуемого уровня микробной чистоты достаточно очистить от микроорганизмов сырьё. Если обсеменение микробами происходит в процессе изготовления, то проводят деконтаминацию готовой лекарственной формы. Предварительного обеззараживания можно достичь прессованием сыпучих материалов (при отсутствии споровых микроорганизмов, низкой влажности исходного порошка и высоком давлении). На практике применяют четыре способа деконтаминации сырья и готовых лекарственных средств.

Термический способ. Широко распространённый метод промышленной деконтаминации. Не пригоден для обработки термолabileльных лекарственных форм, для которых применяют прогревание до 60-70 °С горячим воздухом, инфракрасное и высокочастотное излучение.

Химический способ. Более пригоден для стерилизации светонепроницаемых веществ (бактерицидное действие реализуется лишь на глубине 1 мм). Наиболее часто его используют для обработки упаковочного материала и технологической воды. Возможна обработка УФ-лучами формообразующих веществ (крахмала, талька, сахара) в дисперсном состоянии (при перемешивании).

Ионизирующее излучение. Наиболее перспективный способ деконтаминации сырья и готовых лекарственных форм. Ионизирующее излучение обладает высокой проникающей способностью. При облучении не образуются канцерогенные, мутагенные, токсичные вещества, сохраняются физико-химические и биологические свойства обрабатываемых лекарств. Метод используют для обработки антибиотиков, витаминов, ферментов, гормонов и алкалоидов.

Стерильные и асептические лекарственные формы.

Стерильные (безмикробные) лекарственные формы готовят в асептических условиях и стерилизуют. К ним относятся растворы для инъекций, глазные капли, препараты для детей до 1 года.

Асептические лекарственные формы готовят в асептических условиях без стерилизации.

Асептика - предупреждение попадания микробов в лекарственный препарат. Асептические и стерильные лекарственные формы готовят в асептических условиях:

1. Требования к помещению.

Помещение называется асептический блок. Уборка в нем производится 1 раз в смену с использованием дезинфицирующих растворов (хлорамин Б - 1%, перекись водорода - 3%). Для стерилизации воздуха и поверхностей применяют бактерицидные лампы. Отбор проб для бактериологического исследования (силами центров ГСЭН) различных объектов в аптеках проводится не менее 2 раз в квартал. Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппарата Кротова. Микробное число воздуха в асептическом блоке не должно превышать 500 - 750 до и 1000 МК/м³ после работы, а золотистого

стафилококка, плесневых и дрожжевых грибов не должно быть в 250 л воздуха ни до, ни после работы.

2. Требования к аптечной посуде, дистиллированной воде. Они обрабатываются в автоклаве (120 ° - 1 атм. - 45 мин. или 132 ° - 2 атм. - 20 мин).

3. Требование к персоналу. Персонал работает в стерильной одежде (халат, шапочка, бахилы, марлевая повязка), обрабатывает руки дезраствором (0,5% р-р хлорамина Б или этанол - 80%).

4. В стерильных лекарственных формах содержание микроорганизмов не допускается, в асептических - допускается не более 10-15 в 1г (мл).

Объекты санитарно-бактериологического обследования в аптеках

В аптеках согласно инструкции, утвержденной приказом Министерства здравоохранения, не менее двух раз в квартал осуществляется бактериологический контроль, объектами которого служат:

- вода дистиллированная;
- инъекционные растворы до и после стерилизации;
- глазные мази после стерилизации;
- глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильной основе;
- сухие лекарственные вещества, используемые для приготовления инъекционных растворов;
- нестерильные лекарственные формы;
- аптечная посуда, пробки, прокладки, прочие материалы;
- инвентарь, оборудование, руки, санитарная одежда персонала;
- воздух аптечных помещений.

5.6 Определение микрофлоры в лекарственных формах

При исследовании лекарственных форм осуществляют:

- определение общего микробного числа (микробная обсемененность);
- определение бактерий группы кишечной палочки;
- определение дрожжевых и плесневых грибов;

- определение условно - патогенных и патогенных микроорганизмов.

Общее микробное число (ОМЧ) – количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г (мл) препарата, определяют по числу выросших колоний.

Определение микробной обсемененности растительного лекарственного сырья.

В асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек площадью 1 см², который помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят четыре десятикратных разведения (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), для посева в связи с большой обсемененностью растительного сырья используют два последних (1: 1000 и 1: 10000) разведения. В стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45⁰С МПА, перемешивают и после застывания агара посева инкубируют при 37⁰С 24 - 48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Полученное число колоний следует умножить на степень разведения.

Определение микробной обсемененности готовых лекарств

Жидкие лекарственные формы разводят стерильным физиологическим раствором 1:10 (или 1:100) и засевают в объеме 0,5 мл на МПА в чашке Петри. 1г порошка или таблеток помещают в пробирку с 10 мл физиологического раствора и после растворения производят посев на МПА.

Мягкие лекарственные формы (мази, пасты) в количестве 1 г взвешивают в асептических условиях, переносят в пробирки с 10 мл стерильного 1,4% раствора натрия гидрокарбоната для диспергирования, которое производят вращательным движением пробирки между ладонями в течение 2-4 мин., 0,5 мл полученного раствора засевают на МПА в чашках Петри. Чашки с посевами помещают в термостат на 48 ч, затем подсчитывают число колоний и определяют количество бактерий в 1 мл или 1 г образца.

Определение общего количества грибов

Определение общего количества грибов проводят на твердой среде Сабуро, на которую засевают 0,5 мл цельного или разведенного 1:10 препарата. Посевы инкубируют при 24⁰С в течение 5 суток,

затем подсчитывают число выросших колоний и определяют количество грибов в 1 мл (1 г) препарата.

Качественное определение условно - патогенных и патогенных микроорганизмов

1. Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella).

Посев лекарственных средств производят на среду Эндо и висмут -сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамотрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae.

2. Определение патогенных стафилококков.

Определение патогенных стафилококков производят посевом на желточно - солевой агар. На этой среде патогенные стафилококки вызывают расщепление лецитина, проявляющееся в образовании вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. Выделенную чистую культуру исследуют на наличие плазмокоагулазы.

3. Выявление Pseudomonas aeruginosa.

Осуществляют на среде с глицерином. Синегнойная палочка на этой среде образует зеленоватые флуоресцирующие колонии, выделяющие в среду сине - зеленый пигмент.

4. Выявление протей. Производят посевом на МПА по Шукевичу.

Наличие условно - патогенных и патогенных микроорганизмов в лекарственных препаратах недопустимо. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI издания приняты следующие критерии оценки микробной обсемененности лекарственных средств (табл. 3)

Таблица 3. Нормативы предельно допустимого содержания непатогенных микроорганизмов в лекарственных формах

Лекарственные средства	Содержание микроорганизмов в 1 г/мл
Инъекционные растворы перед стерилизацией, не позднее 1,5 ч после	Не более 30

приготовления	
Инъекционные растворы после стерилизации	Стерильны
Глазные капли, средства для новорожденных	Стерильны
Дистиллированная вода для приготовления стерильных растворов	Не более 15
Препараты для местного применения (на кожу, слизистую носа, гинекологические)	Не более 100, в том числе не более 10 грибов
Пероральные препараты	Не более 1000, в том числе не более 100 грибов

Определение пирогенности

Пирогенность (повышение температуры тела) обусловлена наличием в стерильных лекарственных препаратах продуктов распада бактерий (липополисахаридов). Стерильные инъекционные растворы должны быть апиrogenны.

Определение пирогенности проводят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, весом 2,5-3,0 кг, содержащихся на полноценном рационе. Испытуемую дистиллированную воду или лекарственные средства вводят трем кроликам в ушную вену в количествах и растворителях, предусмотренных соответствующими инструкциями.

Воду для инъекций и раствор лекарственного средства считают непирогенными если сумма повышений температуры у 3 кроликов меньше или равна 1,4⁰С. Если сумма превышает 2,2⁰С, то испытуемые растворы считают пирогенными. В случаях, когда сумма повышений температуры у 3 кроликов находится в пределах от 1,5 до 2,2⁰С, испытание проводят на 5 кроликах. В этом случае раствор считают непирогенным, если сумма повышений температуры у всех 8 кроликов не превышает 3,7⁰С.

5.7 Антибиотики

– вещества природного происхождения, обладающие выраженной биологической активностью против микроорганизмов, могут быть получены из микробов, растений, животных тканей и методом химического синтеза. Антибиотиками называются продукты

метаболизма любых организмов, способных избирательно подавлять жизнедеятельность микроорганизмов и убивать их.

Антибиотикотерапия – один из разделов химиотерапии, так как с того момента, когда антибиотик получают в виде определенного, часто химически чистого вещества, его следует рассматривать как химиотерапевтический препарат.

Применяющиеся в настоящее время антибиотики классифицируют по источникам их выделения, способам получения, спектру и молекулярному механизму действия, химической структуре и клиническому использованию.

Все имеющиеся антибиотики по источникам выделения можно разделить на следующие группы:

а. Антибиотики, выделенные из грибов. Грибы – активные продуценты антибиотиков; из них выделены первые антибиотики, применяющиеся и сейчас в медицинской практике.

б. Антибиотики различного строения, полученные из актиномицетов, образуют большую группу. Актиномицеты – антагонисты составляют около 50% всех видов актиномицетов, обнаруживаемых в почвах.

с. Антибиотики, выделенные из бактерий, составляют менее обширную группу. Наибольшее практическое значение имеют грамицидин и грамицидин С, выделенные из различных штаммов почвенных бактерий.

д. Антибиотики, выделенные из тканей животных; первым среди них явился лизоцим, обнаруженный в слезной жидкости, слюне и выделенный из яичного белка. Лизоцим оказывает бактериолитическое действие на грамположительные микроорганизмы.

е. Антибиотики, полученные из растений, так называемые фитонциды.

В настоящее время различают три способа получения антибиотиков: биологический, метод получения полусинтетических препаратов и синтез химических соединений – аналогов природных антибиотиков.

1. Биологический синтез. Одним из главных условий получения антибиотика в большом количестве является продуктивность штамма, поэтому используются наиболее продуктивные мутанты «диких штаммов», полученные методом химического мутагенеза. Продуцент выращивают в жидкой оптимальной среде, в которую и

поступают продукты метаболизма, обладающие антибиотическими свойствами.

2. Полусинтетические антибиотики. Их готовят комбинированным способом: методом биологического синтеза получают основное ядро молекулы нативного антибиотика, а методом химического синтеза, путем частичного изменения химической структуры – полусинтетические препараты

3. Синтетические антибиотики. Изучение химической структуры антибиотиков дало возможность получать их методом химического синтеза. Одним из первых антибиотиков, полученных таким методом, был левомецетин.

По **спектру действия** все антибиотики принято классифицировать на антибактериальные, антигрибковые и противоопухолевые.

Антибактериальные антибиотики угнетают развитие бактерий. Существуют антибиотики узкого спектра действия, которые угнетают рост только грамположительных или грамотрицательных бактерий и антибиотики широкого спектра, которые угнетают рост как грамположительных, так грамотрицательных бактерий.

Противогрибковые антибиотики оказывают угнетающее действие на рост микроскопических грибов. По химической структуре они относятся к полиенам и применяются для лечения грибковых заболеваний.

Достижением химиотерапии является получение антибиотиков, способных задерживать развитие злокачественных опухолей

По **механизму действия** антибиотики существенно различаются: являясь химическими веществами с избирательным спектром действия, они фиксируются определенными микробными клетками, проникают в них и нарушают отдельные жизненные процессы клетки.

Для того чтобы антибиотики давали терапевтический эффект необходимо соблюдать определенные правила:

1) правильный выбор антибиотика со знанием спектра действия;

2) введение в организм антибиотика в терапевтической концентрации, т.е. в дозах необходимых для подавления роста и размножения микроба-возбудителя;

3) определение антибиотикограммы возбудителя, т.е. чувствительности у применяемому лечебному препарату;

- 4) правильный выбор способа введения антибиотика;
- 5) создание активной концентрации антибиотика в организме и поддержание этой концентрации в течение всего курса лечения до ликвидации инфекционного процесса;
- 6) правильное сочетание антибиотиков при комбинированном их применении;
- 7) комбинация антибиотиков с сывороточными и вакцинными препаратами.

К одной из древних проблем медицины относится лечение инфекционных заболеваний. Под химиотерапией понимают лечение лиц, страдающих инфекционными болезнями, с помощью химических веществ, действующих избирательно на возбудителя в организме человека, при отсутствии вредного влияния на клетки и органы больного.

Первые химиотерапевтические препараты были синтезированы П.Эрлихом в 1909 г. Это были соединения, содержащие мышьяк и использованные при лечении сифилиса. Затем получили применение химиотерапевтические препараты, содержащие соединения висмута, ртути, сурьмы, для лечения инфекций, вызываемых спирохетами и простейшими.

Новым этапом в развитии химиотерапии явился синтез сульфаниламидных препаратов. Антибактериальная активность протонзила, синтезированного в 1935 г., при введении в организм животных, как оказалось обусловлена образованием в организме продукта расщепления протонзила – сульфаниламида. Это вещество стало эффективным средством для лечения стрептококковых инфекций и многих заболеваний, вызываемых бактериями.

Селективная токсичность сульфаниламида обусловлена способностью большинства бактерий синтезировать фолиевую кислоту. Оказалось, что химиотерапевтические препараты по своей структуре подобны витаминам, обязательным для роста микробов. На этом и основывается их химиотерапевтическое действие. Необходимо, чтобы микробная клетка могла усваивать вместо нужного ей витамина похожее на него вещество, которое способно нарушить синтез в клетке нормального фермента. Результат может быть различен в зависимости от того, какие ферменты или клетки поражаются химиотерапевтическим препаратом. Если исключена система или фермент клетки, не играющие большой роли в ее жизни, то клетка не страдает. При нарушении системы или

фермента, играющих более значительную роль в жизни клетки, она может оказаться угнетенной, развитие клетки при этом приостанавливается. В таком случае препарат дает бактериостатический эффект. Если же нарушается или выключается система или фермент, жизненно важные для клетки, без которых она не может существовать, наблюдается бактерицидный эффект.

5.8 Возможные осложнения со стороны макроорганизма.

1. Развитие аллергических реакций. Некоторые антибиотики, введенные в организм больного, вызывают состояние повышенной чувствительности, нарастающее по мере применения препарата.

2. Реакция обострения (феномен Герца – Геймера). Заключается в развитии явлений общей интоксикации при активной антибактериальной терапии в результате высвобождения эндотоксина при массовой гибели микробов.

3. Нарушение формирования полноценного иммунитета после перенесенного заболевания в результате антибиотикотерапии, что приводит к рецидивам и повторным заболеваниям.

4. Дисбактериозы. Наблюдаются в результате применения антибиотиков широкого спектра действия, которые подавляют рост не только патогенных микроорганизмов, но и представителей чувствительной к ним микрофлоры. Дисбактериоз – заболевание, обусловленное активацией представителей аутомикрофлоры, на которые данный антибиотик не оказывает действия, а подавляет другие, сдерживавшие их размножение.

5. Прямые токсические (органотропные) реакции. Для снижения токсических свойств антибиотиков получают новые соединения, новые соли, обладающие меньшей токсичностью. Одним из методов уменьшения токсичности является комбинация антибиотиков с другими веществами.

6. Влияние антибиотиков на развитие плода. Побочное действие антибиотиков на плод может развиваться в соответствии с их органотропным эффектом. Дефекты развития плода могут быть обусловлены повреждением организма матери, воздействием антибиотиков на сперматозоиды, изменениями функционирования плаценты и даже прямым действием на метаболизм плода.

5.9 Развитие устойчивости микроорганизмов к применяемым препаратам.

Наличие лекарственно – устойчивых форм микробов затрудняет лечение больных инфекционными заболеваниями. Устойчивость к антибиотикам является наследуемым признаком и детерминируется генами хромосомной и внехромосомной локализации. У некоторых бактерий обнаружена множественная лекарственная устойчивость, детерминированная внехромосомным фактором, получившим название R – фактора.

При изучении биохимической природы резистентности бактерий к лекарственным веществам были выделены ферменты, инактивирующие антибиотики.

В процессе действия антибиотиков возможно изменение различных свойств микроорганизмов: морфологии клеток и формы колоний, физиологических свойств микробов, химического состава микробной клетки.

Для лекарственно-резистентных микроорганизмов характерна персистенция – способность микроорганизмов переживать в глубине тканей, находясь в состоянии анабиоза. На такие персистирующие микроорганизмы антибиотики не действуют.

5.10 Ускоренный метод определения чувствительности макроорганизма к антибиотику

В чашку Петри наливают 15 мл питательного агара. После застывания агара на него наносят смесь 4 мл такого же агара, 1 мл взвеси тест – культуры (приготовленной по стандарту 1 млрд. микробных клеток в 1 мл) и 1 мл 0,2% водного раствора 2,6 – дихлорфенолиндофенола (рН 7,2-7,3). Вместо культуры можно использовать клинический материал. Затем на застывший агар ярко – синего цвета наносят диски, пропитанные антибиотиками, и чашки ставят в термостат при 37°C. Через 2-4 ч. учитывают результаты по диаметру синих зон отсутствия роста. Резистентные к антибиотику микроорганизмы восстанавливают краситель, обесцвечивая его или трансформируя в желтый цвет. Данный краситель задерживает рост стафилококков, поэтому при работе с этим микроорганизмом раствор индикатора наливают на поверхность чашки в количестве 2-3 мл уже после выдерживания чашки с дисками в термостате. Избыток индикатора сливают через 5-7 мин и учитывают результаты.

Определение активности антибиотиков методом серийных разведений

Серийный метод титрования может быть выполнен в разных объемах среды (от 1 до 10 мл). Эксперименты выполняются в асептических условиях при использовании стерильных пипеток для каждого ингредиента реакции. Титрование можно проводить в плотных и жидких средах.

При титровании в жидких средах в ряд пробирок наливают питательную среду в строго определенном объеме. Количество пробирок определяется количеством разведений препарата, которое необходимо взять в опыт. В 1-ю пробирку вносят определенное количество раствора антибиотика, перемешивают, затем определенный объем смеси из 1-й пробирки переносят во 2-ю, перемешивают и переносят то же самое количество смеси из 2-й в 3-ю и т.д. Из последней пробирки, содержащей антибиотик, такой же объем смеси выливают, чтобы во всех пробирках объем жидкости был одинаков. Пробирка, не содержащая антибиотика, является контрольной. После этого во все пробирки, содержащие серийно разведенный антибиотик, и в контрольную пробирку вносят одинаковое количество взвеси тест – культуры. Штатив с пробирками встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 18-20 ч.

Кратность разведения антибиотика обычно выбирают равной двум, для этого в каждую пробирку наливают, например, по 1 мл бульона, 1-ю пробирку вносят 1 мл раствора антибиотика и переносят из пробирки в пробирку по 1 мл смеси. При этом точность определения активности препарата составляет $\pm 50\%$. Точность определения можно повысить путем дополнительных разведений антибиотика, например, используя кратности 1:1,1; 1:1,5; 1:1,20 и т.д.

Взвесь клеток тест – культуры готовят на изотоническом растворе хлорида натрия при обязательном сравнении со стандартами мутности. При титровании антибактериальных антибиотиков микробная нагрузка обычно составляет $2,5 \cdot 10^5$ микробных клеток на 1 мл раствора антибиотиков в питательном бульоне. Для этого готовят взвесь тест – культуры по стандарту 10 ед. мутности, что составляет 1 млрд. микробных тел в 1 мл. взвесь разводят изотоническим раствором до концентрации $2,5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл и вносят в пробирки с серийно-разведенным антибиотиком по 0,1 мл на 1 мл питательного бульона. При использовании в качестве тест –

культуры дрожжей микробная нагрузка составляет $4 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл.

Метод серийных разведений в плотных средах отличается тем преимуществом, что микробы – загрязнители при этом легко выявляются и по существу не изменяют общих результатов титрования, тогда как на жидких средах весь опыт может оказаться безрезультатным из-за попадания в пробирки хотя бы единичных клеток посторонних устойчивых микроорганизмов. Этот метод используют также при работе с микроорганизмами, которые не растут на обычных жидких средах. Вначале готовят ряд серийных разведений антибиотика, а затем вносят по 1 мл каждого разведения в пробирку, содержащую 4 мл расплавленной и охлажденной до 45-50°C агаризованной среды. Затем пробирки скашивают до застывания агара, а на поверхность плотной среды петлей засевают взвесь тест – культуры.

Для выявления бактерицидного действия препарата делают высеv на МПА из всех пробирок, где визуально не отмечен рост микроорганизма. Для стойких антимикробных веществ, которые адсорбируются на микробных клетках и препятствуют их росту даже в свежей питательной среде, применяют соответствующие нейтрализаторы.

Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар

Этот метод точнее, чем метод серийных разведений, поэтому он чаще используется на практике. Однако методу диффузии присущи определенные недостатки. Критерии для оценки данных, полученных с быстрорастущими микроорганизмами, не применимы к медленнорастущим штаммам. Поэтому если в качестве тест - культуры необходимо использовать медленнорастущий микроорганизм, применяют метод разведений или условия испытания отрабатывают в специальных экспериментах. То же можно сказать и о медленнодиффундирующих антибиотиках.

Голодный агар разливают по 15 мл в чашки Петри, размещенные на горизонтальном столике. После застывания агара чашки подсушивают в термостате, затем в каждую чашку наливают по 5 мл питательного агара, смешанного с тест-культурой. Количество последней берут из расчета 20 млн клеток на 1 мл среды. Перед внесением культуры в агар его необходимо охладить до 40-45°C. Вместо цилиндров можно использовать лунки, которые делают в

агаре с помощью специального приспособления. После застывания второго слоя агара на его поверхность наносят по трафарету 6 цилиндров на каждую чашку. В три из них через один сносят по 0,1 мл испытуемого раствора антибиотика, а в три оставшихся цилиндра вносят по 0,1 мл стандартного раствора (контроль). После этого чашки помещают в термостат при 37°C на 16-18 часов. По истечении этого времени цилиндры удаляют с чашки, а размеры зон задержки роста тест - культуры измеряют. Расчет активности антибиотика по размеру зон задержки может быть произведен на основании расчетных таблиц В.С.Дмитриевой (ГФХІ) или по стандартным кривым.

Контрольные вопросы:

1. Источники микробного загрязнения лекарственного сырья и лекарственных средств.
2. Меры предупреждения микробной загрязненности лекарственных средств.
3. Методы микробиологического контроля загрязненности лекарственных средств.
4. Основные требования к производству стерильных лекарственных форм.
5. Пирогены, опасность их попадания в лекарственные средства, используемые для инъекций.
6. Методы исследования стерильности лекарственных средств.
7. Классификация антибиотиков.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 5

В клинику поступил больной с диагнозом «Стафилококковая пневмония». Для успешного этиологического лечения в целях выбора эффективного антибиотика было рекомендовано определение антибиотикограммы возбудителя.

1. С помощью какого метода можно определить антибиотикочувствительность?
2. Принцип метода и учет результатов.

Ситуационная задача № 6

У больного с нагноением ожоговой поверхности взят материал для бактериологического исследования. При определении суммарной чувствительности микрофлоры гноя к антибиотикам пенициллинового ряда был получен положительный результат. Однако, антибиотикотерапия оказалась безуспешной.

1. Какая была допущена ошибка при определении чувствительности микрофлоры к антибиотикам?
2. Как объяснить отсутствие терапевтического эффекта при суммарной чувствительности микрофлоры гноя к антибиотикам?

Игра «Кто больше? Кто быстрее?»

Для работы необходимо:

1. Карточки с вопросами по теме (к-во карточек равно числу студентов в группе, в каждой карточке по 5 вопросов).
2. Секундомер.

Ход работы:

1. Игра проводится в устном виде.
2. Студенты поочередно вытягивают карточки с вопросами.
3. В течение нескольких минут каждый студент устно отвечает на серию вопросов, написанных на карточке.
4. Преподаватель считает число правильных ответов.
5. В игре участвуют все студенты.
6. Общее время игры 45 минут.
7. Вопросы, на которые были даны правильные ответы, обсуждаются.
8. Ответы студентов оцениваются по следующей форме:
 - правильные 5 ответов-0,9 балла
 - правильные 4 ответа-0,7 балла
 - правильные 3 ответа-0,5 балла
 - правильные 2 ответа-0,3 балла
 - правильные 1 ответ-0,1 балла
 - правильные 0 ответов-0 баллов
9. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущей оценки занятия.

Перечень вопросов:

1. Источники микробного загрязнения лекарственного сырья и лекарственных средств.
2. Меры предупреждения микробной загрязненности лекарственных средств.
3. Методы микробиологического контроля загрязненности лекарственных средств.
4. Основные требования к производству стерильных лекарственных форм.
5. Пирогены, опасность их попадания в лекарственные средства, используемые для инъекций.
6. Методы исследования стерильности лекарственных средств.
7. Нормальная микрофлора растений.
8. Объекты санитарно-бактериологического обследования в аптеках.
9. Фитопатогенные микроорганизмы.
10. Борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.
11. Признаки порчи лекарственного сырья.
12. Микрофлора растительного лекарственного сырья.
13. Микрофлора готовых лекарственных форм.
14. Микрофлора нестерильных лекарственных форм.
15. Нормы микробов в нестерильных лекарственных формах.
16. Пути повышения микробной чистоты нестерильных лекарственных средств.
17. Стерильные и асептические лекарственные формы.

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют её самостоятельно, затем 3- 5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают своё мнение. В конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№ Микрофлора	Краткая характеристика
Растительного лекарственного сырья	
Готовых лекарственных форм	

Нестерильных лекарственных форм	
---------------------------------	--

5.11 Определение стерильности готовых лекарственных форм.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №5:

Практическая часть состоит из 4-х частей:

- а – названия опыта
- б – цель работы и значение опыта
- в – ход выполнения опыта. Указать объект исследования, порядок выполнения опыта, инструментальные приборы.
- г – оформление протоколов

Определение стерильности готовых лекарственных форм.

Инъекционные растворы, глазные капли, лекарственные средства для новорожденных, другие лекарственные препараты, стерилизуемые в процессе их изготовления, засевают неразведенными в тиогликолевую среду для определения микробной обсемененности и среду Сабуро для выявления дрожжевых и плесневых грибов. Посевы на тиогликолевой среде выдерживают 14 суток при 37⁰С, на среде Сабуро 14 суток при 24⁰С. Учет результатов посевов проводят по отсутствию видимых изменений в посевах.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков.

1-ый день – суспензию чистой культуры методом газона засевают на чашку с плотной питательной средой и подсушивают 10-15 мин. с помощью стерильного пинцета раскладывают на поверхность засеянной среды в чашке Петри на одинаковом расстоянии друг от друга и 2 см от края чашки 5-6 дисков с антибиотиками, различающиеся цветом. Чашки выдерживают 18-20 часов в термостате при 37⁰С в перевернутом кверху дном положении.

2-ой день – Затем идет учет результатов. Отмечают наличие роста м/о в чашке с помощью линейки или миллиметровой бумаги на дне чашке измеряют диаметры задержки роста вокруг дисков (6 мм) по наиболее четкому контуру. По степени чувствительности

микроорганизмы делятся на 3 группы: чувствительные к данному антибиотику (диаметр зоны вокруг задержки роста больше 20 мм); умеренно – чувствительные (11-20 мм); устойчивые – меньше 10 мм.

ВЫВОД:

исследуемая культура _____
является _____

ГЛАВА 6 ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА.

6.1. Микрофлора тела человека

Организм человека заселен (колонизирован) более чем 500 видов микроорганизмов, составляющих нормальную микрофлору человека, находящихся в состоянии равновесия (эубиоза) друг с другом и организмом человека. Микрофлора представляет собой стабильное сообщество микроорганизмов, т.е. микробиоценоз.

Она колонизирует поверхность тела и полости, сообщаемые с окружающей средой. Место обитания сообщества микроорганизмов называется биотопом. В норме микроорганизмы отсутствуют в легких и матке. Различают нормальную микрофлору кожи, слизистых оболочек рта, верхних дыхательных путей, пищеварительного тракта и мочеполовой системы. Среди нормальной микрофлоры выделяют резидентную и транзиторную микрофлору. Резидентная (постоянная) облигатная микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме. Транзиторная (непостоянная) микрофлора не способна к длительному существованию в организме. Организм человека и его нормальная микрофлора составляют единую экологическую систему. Формирование микрофлоры новорожденных начинается с попадания микроорганизмов в процессе родов на кожу и слизистые оболочки. Дальнейшее формирование микрофлоры определяется санитарным состоянием среды, в которой проходили роды, типом вскармливания и др.

Нормальная микрофлора становится устойчивой и к концу третьего месяца жизни сходной с микрофлорой взрослого. Количество микроорганизмов у взрослого человека составляет около 10¹⁴ особей,

причем преобладают в значительной степени облигатные анаэробы. Представители нормальной микрофлоры заключены в экзополисахаридно-муциновый матрикс, образуя на слизистых оболочках и коже биологическую пленку, устойчивую к различным воздействиям. Микрофлора кожи имеет большое значение в распространении микроорганизмов в воздухе. В результате десквамации (шелушения) несколько миллионов чешуек, несущих каждая по несколько микроорганизмов, загрязняют окружающую среду. На коже и в ее более глубоких слоях (волосяные мешочки, просветы сальных и потовых желез) анаэробов в 3—10 раз больше, чем аэробов. Кожу колонизируют пропионибактерии, коринеформные бактерии, стафилококки, стрептококки, дрожжи *Pityrosporum*, дрожжеподобные грибы *Candida*, редко микрококки, *Myc. fortuitum*. На 1 см² кожи приходится менее 80 000 микроорганизмов. В норме это количество не увеличивается в результате действия бактерицидных стерилизующих факторов кожи, в частности в поте кожи обнаружены α-глобулин, иммуноглобулины А, G, трансферрин, лизоцим и другие противомикробные вещества. Процесс самоочищения кожи усиливается на чисто вымытой коже. Усиленный рост микроорганизмов происходит на грязной коже; при ослаблении организма размножающиеся микроорганизмы определяют запах тела. Через грязные руки происходит контаминация (загрязнение) лекарственных средств микроорганизмами кожи, что приводит к последующей порче лекарственных препаратов. В верхние дыхательные пути попадают пылевые частицы, нагруженные микроорганизмами, большая часть которых задерживается в носо- и ротоглотке. Здесь растут бактероиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, пептококки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, непатогенные нейссерии и др. Трахея и бронхи обычно стерильны. Микрофлора пищеварительного тракта является наиболее представительной по своему качественному и количественному составу. При этом микроорганизмы свободно обитают в полости пищеварительного тракта, а также колонизируют слизистые оболочки. В полости рта обитают актиномицеты, бактероиды, бифидобактерии, эубактерии, фузобактерии, лактобактерии, гемофильные палочки, лептотрихии, нейссерии, спирохеты, стрептококки, стафилококки, вейлонеллы и др. Обнаруживаются также грибы рода *Candida* и простейшие.

Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет. Микрофлора желудка представлена лактобациллами и дрожжами, единичными грамотрицательными бактериями. Она несколько беднее, чем, например, кишечника, так как желудочный сок имеет низкое значение pH, неблагоприятное для жизни многих микроорганизмов. При гастритах, язвенной болезни желудка обнаруживаются изогнутые формы бактерий —

Helicobacter pylori, которые являются этиологическими факторами патологического процесса. В тонкой кишке микроорганизмов больше, чем в

желудке; здесь обнаруживаются бифидобактерии, клостридии, эубактерии, лактобациллы, анаэробные кокки. Наибольшее количество микроорганизмов накапливается в толстой кишке. В 1 г фекалий содержится до 250 млрд микробных клеток. Около 95 % всех видов микроорганизмов составляют анаэробы. Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются: грамположительные анаэробные палочки (бифидобактерии, лактобациллы, эубактерии); грамположительные спорообразующие анаэробные палочки (клостридии, перфрингенс и др.); энтерококки; грамотрицательные анаэробные палочки (бактероиды); грамотрицательные факультативно-анаэробные палочки (кишечные палочки и сходные с ними бактерии сем. Enterobacteriaceae — цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.). В меньших количествах обнаруживаются фузобактерии, пропионибактерии, вейлонеллы, пептококки, стафилококки, синегнойная палочка, дрожжеподобные грибы, а также простейшие, вирусы, включая фаги. На эпителии успешно растут спирохеты, нитевидные бактерии. Бифидобактерии и бактероиды составляют 80—90 % от общего количества микрофлоры кишечника. Важную роль в жизнедеятельности человека играет

микрофлора толстой кишки — своеобразный экстракорпоральный орган. Она является антагонистом гнилостной микрофлоры, так как продуцирует молочную, уксусную кислоты, антибиотики и др. Известна ее роль в водно-солевом обмене, регуляции газового состава кишечника, обмене белков, углеводов, жирных кислот, холестерина и нуклеиновых кислот, а также продукции биологически активных соединений — антибиотиков, витаминов,

токсинов и др. Морфокинетическая роль микрофлоры заключается в ее участии в развитии органов и систем организма; она принимает участие также в физиологическом воспалении слизистой оболочки и смене эпителия, переваривании и детоксикации экзогенных субстратов и метаболитов, что сравнимо с функцией печени. Нормальная микрофлора выполняет, кроме того, антимутагенную роль, разрушая канцерогенные вещества в кишечнике. В то же время некоторые бактерии могут продуцировать сильные мутагены.

Пристеночная микрофлора кишечника колонизирует слизистую оболочку в виде микроколоний, образуя своеобразную биологическую пленку, состоящую из микробных тел и экзополисахаридного матрикса. Экзопполисахариды микроорганизмов, называемые гликокаликсом, защищают микробные клетки от разнообразных физико-химических и биологических воздействий. Слизистая оболочка кишечника также находится под защитой биологической пленки. Значительное влияние оказывает микрофлора кишечника на формирование и поддержание иммунитета. В кишечнике содержится около 1,5 кг микроорганизмов, антигены которых стимулируют иммунную систему. Естественным неспецифическим стимулятором иммуногенеза является мурамилдипептид, образующийся из микрофлоры под влиянием лизоцима и других литических ферментов, находящихся в кишечнике. Важнейшей функцией нормальной микрофлоры кишечника является ее участие в колонизационной резистентности, под которой понимают совокупность защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических и других особенностей анаэробов кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию слизистых оболочек посторонними микроорганизмами. С целью предотвращения инфекционных осложнений, при пониженной сопротивляемости организма и повышенном риске аутоинфекции, в случаях обширных травм, ожогов, иммунодепрессивной терапии, трансплантации органов и тканей проводят мероприятия, направленные на сохранение и восстановление колонизационной резистентности. Исходя из этого, осуществляют селективную деконтаминацию — избирательное удаление из пищеварительного тракта аэробных бактерий и грибов для повышения сопротивляемости организма к инфекционным агентам. Селективную деконтаминацию проводят путем назначения для приема внутрь малоадсорбируемых химиопрепаратов,

подавляющих аэробную часть и не влияющих на анаэробы, например комплексное назначение ванкомицина, гентамицина и нистатина. Нормальная микрофлора влагалища включает бактериоиды, лактобактерии, пептострептококки и клостридии. Представители нормальной микрофлоры при снижении сопротивляемости организма могут вызвать гнойно-воспалительные процессы, т.е. нормальная микрофлора может стать источником аутоинфекции, или эндогенной инфекции. Она также является источником генов, например генов лекарственной устойчивости к антибиотикам. Кроме того, как уже было сказано выше, кишечная микрофлора, попадая в окружающую среду, может загрязнять почву, воду, воздух, продукты питания и т.д. Поэтому ее обнаружение свидетельствует о загрязнении исследуемого объекта выделениями человека. Состояние эубиоза — динамического равновесия микрофлоры и организма человека — может нарушаться под влиянием факторов окружающей среды, стрессовых воздействий, широкого и бесконтрольного применения антимикробных препаратов, лучевой и химиотерапии. В результате нарушается колонизационная резистентность. Аномально размножившиеся микроорганизмы продуцируют токсичные продукты метаболизма — индол, скатол, аммиак, сероводород. Такое состояние, развивающееся в результате утраты нормальных функций микрофлоры, называется дисбактериозом или дисбиозом. При дисбактериозе происходят количественные и качественные изменения бактерий, входящих в состав микрофлоры. При дисбиозе изменения происходят и среди других групп микроорганизмов — вирусов, грибов и др. Дисбиоз и дисбактериоз считаются эндогенной инфекцией, возникающей чаще всего в результате нарушения антимикробными препаратами нормальной микрофлоры. Для восстановления нормальной микрофлоры назначают препараты пробиотики (эубиотики), полученные из лиофильно высушенных живых бактерий, представителей нормальной микрофлоры кишечника — бифидобактерий, кишечной палочки, лактобактерий и др.

6.2 Санитарная микробиология

Микроорганизмы, и в первую очередь бактерии, распространены в природе гораздо шире, чем другие живые существа. Благодаря исключительному разнообразию усвоения питательных веществ, малым размерам и легкой приспособляемости к различным внешним

условиям бактерии могут быть обнаружены там, где отсутствуют другие формы жизни.

Сложные взаимоотношения микроорганизмов со средой, которые обуславливают их размножение, развитие и выживание, изучает специальная биологическая наука — экология.

Но существует и медицинская наука — санитарная микробиология, которая также занимается изучением микроорганизмов и процессов, вызываемых ими в окружающей среде. Основной задачей санитарной микробиологии является предупреждение возникновения инфекционных заболеваний, т. е. осуществление постоянного контроля за водой, воздухом, почвой, пищевыми продуктами и т. д. с целью выявления патогенных микроорганизмов, либо выявления санитарно-показательных микроорганизмов, которые являются косвенными показателями зараженности окружающей среды. Санитарно-показательные микроорганизмы — это постоянные обитатели поверхностей и полостей тела человека и животных, выделяющихся из организма теми же путями, что и патогенные. Поэтому, чем больше выявлено санитарно-показательных микроорганизмов, тем большая вероятность попадания в объекты внешней среды патогенных микроорганизмов.

Для каждого объекта внешней среды имеются определенные **санитарно-показательные микроорганизмы** — критерии оценки по бактериологическим показателям. Например, в отношении кишечных инфекций роль таких индикаторов принадлежит кишечным палочкам — постоянным обитателям кишечника человека и животных.

Санитарно-бактериологические исследования проводятся в строгом соответствии со специальными государственными общесоюзными стандартами, приказами, методическими рекомендациями, правилами, которые позволяют дать оценку соответствия выявленной в окружающей среде микрофлоры гигиеническим требованиям. В нормативных документах отражены правила отбора проб, количество материала, условия транспортировки, методы и цель исследования, а также критерии оценки полученных результатов.

Распространение микроорганизмов в природе, роль в круговороте веществ.

Все живое на Земле, происшедшее когда-то из неживой материи и качественно отличающееся от последней, находится в теснейшей связи с мертвой природой. Существует постоянное равновесие и взаимосвязь между живой и неживой природой, происходит непрерывная цепь превращений вещества и энергии на земной поверхности, непрерывный процесс созидания и разложения органического вещества.

Этот непрерывный процесс составляет малый биологический круговорот, составляющий часть большого, абиогенного (безжизненного) круговорота, который изучается геохимией и геологией.

В биологический круговорот вовлечены атомы всех химических элементов, составляющих живое вещество. Из них особенно важно рассмотреть круговорот углерода, азота, серы и фосфора.

Зеленые растения и автотрофные микроорганизмы строят органические соединения своего тела, пользуясь только минеральными формами углерода (углекислота атмосферы) и минеральными формами азота (аммиачные и азотно-кислые соли). Они осуществляют первичный синтез органических веществ на Земле из простых неорганических соединений.

Единственным источником углеродного питания для зеленых растений является углекислота. Зеленые растения благодаря солнечной энергии превращают углекислоту, не имеющую никакой энергетической ценности, в углеводы, белки и жиры, имеющие исключительную энергетическую ценность. Все земное царство является огромным аккумулятором солнечной энергии, которую оно переводит в скрытую энергию своих сложных органических соединений.

Подсчитано, что зеленые растения ежегодно извлекают из атмосферы 150 часть всего количества углекислоты атмосферы. Следовательно, лет через пятьдесят вся углекислота могла бы быть переведена в органические соединения растительных и животных организмов. Исчезновение углекислоты сделало бы невозможной жизнь растений, а следовательно, и животных на Земле. Но в действительности этого не наблюдается. Общеизвестно, что содержание углекислоты в атмосфере постоянно и равняется 0,03%. Это постоянство обуславливается тем, что в природе одновременно происходят и обратные процессы — обогащения атмосферы углекислотой. Одновременно с синтезом органического вещества в

природе идет разложение органического вещества до неорганических соединений, таких как CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S и др.

То же самое можно сказать и в отношении азота. Растения не могут усваивать свободный азот из атмосферы и азот, связанный в органических соединениях. Они усваивают только минерализованные азотные соединения — аммонийные и азотнокислые соли. В пахотном слое 1 га почвы содержится 600 кг азота, но усвояемые формы для растений составляют только 1 %. Такое количество усвояемого азота не обеспечило бы и одного хорошего урожая.

Таким образом, жизнь на Земле возможна только при непрерывном разложении органического вещества, синтезированного растениями и животными. Эта грандиозная переработка всех отмерших остатков растительного и животного царства осуществляется микроорганизмами. В ходе своей жизнедеятельности они производят минерализацию органических веществ — белков, жиров, углеводов — с образованием в конечном итоге углекислоты, воды, аммиака, нитратов, неорганических соединений серы и фосфора, усвояемых растениями. Эти вещества вовлекаются в новый круговорот. Чем энергичнее протекают процессы разложения органических веществ, тем больше развивается органическая жизнь, быстрее осуществляется круговорот веществ в природе.

Такая колоссальная работа микроорганизмов обусловливается их чрезвычайно широким распространением в природе, чрезвычайной быстротой размножения, разнообразием типов их питания и ферментных систем.

6.3 Микрофлора воды

Вода является естественной средой обитания многих микробов. Основная масса микробов поступает из почвы. Количество микробов в 1 мл воды зависит от наличия в ней питательных веществ. Чем вода сильнее загрязнена органическими остатками, тем больше в ней микробов. Наиболее частыми являются воды глубоких артезианских скважин, а также родниковые воды. Обычно они не содержат микробов. Особенно богаты микробами открытые водоемы и реки. Наибольшее количество микробов в них находится в поверхностных слоях (в слое 10 см от поверхности воды) прибрежных зон. С удалением от берега и увеличением глубины количество микробов уменьшается. В чистой воде находится 100—200 микробных клеток в 1 мл, а в загрязненной — 100—300 тыс. и больше.

Реки в районах городов часто являются естественными приемниками стоков хозяйственных и фекальных нечистот, поэтому в черте населенных пунктов резко увеличивается количество микробов. Но по мере удаления реки от города число микробов постепенно уменьшается, и через 3—4 десятка километров снова приближается к исходной величине. Это самоочищение воды зависит от ряда факторов: механическое осаждение микробных тел, уменьшение в воде питательных веществ, усвояемых микробами, действие прямых лучей солнца, пожирание бактерий простейшими и др.

Если считать, что бактериальная клетка имеет объем 1 мк^3 , то при содержании их в количестве 1000 клеток в 1 мл, получится около тонны живой бактериальной массы в кубическом километре воды. Такая масса бактерий осуществляет различные превращения в круговороте веществ в водоемах и является начальным звеном в пищевой цепи питания рыб.

Патогенные микробы попадают в реки и водоемы со сточными водами. Возбудители таких кишечных инфекций, как брюшной тиф, паратифы, дизентерия, холера и др., могут сохраняться в воде длительное время. В этом случае вода становится источником инфекционных заболеваний.

Особенно опасно попадание болезнетворных микробов в водопроводную сеть. Поэтому за состоянием водоемов и подаваемой из них водопроводной воды установлен санитарно-бактериологический контроль.

Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды

Отбор пробы воды

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов. Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) пробками и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Многоразовая посуда, в том числе пробки, должны выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

Пробу отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил стерильности. Емкость открывают непосредственно перед отбором,

удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду запрещается.

При исследовании воды из распределительных сетей отбор проб из крана производят после предварительной его стерилизации обжиганием и последующего спуска воды не менее 10 минут при полностью открытом кране. Если отбирают воду после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, до стерилизации вносят натрий серноватистокислый в виде кристаллов или концентрированного раствора из расчета 10 мг на 500 мл воды.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком. Отобранную пробу маркируют и сопровождают актом отбора проб воды с указанием названием пробы, места забора, даты (год, месяц, число, час), цель исследования, куда направляется проба для исследования, подпись лица, взявшего пробу.

6.4 Микрофлора почвы

Почва — это смесь частиц органических и неорганических веществ, воды и воздуха.

Неорганические частицы почвы — это минеральные вещества, окруженные пленкой коллоидных веществ органической или неорганической природы.

Органические частицы почвы — остатки растительных и животных организмов, т.е. гумус. Почва обильно заселена микроорганизмами, так как в ней есть все необходимое для жизни: органические вещества, влага, защита от солнечных лучей.

В почве встречаются все формы микроорганизмов, которые есть на Земле: бактерии, вирусы, актиномицеты, дрожжи, грибы, простейшие, растения.

Общее микробное число в 1 г почвы может достигать 1—5 млрд. В 1 га почвы содержится 1 тонна живого веса бактерий, однако в разных слоях количество микроорганизмов неодинаково. В самом верхнем слое почвы микроорганизмов очень мало (слой « 0,5 см). На глубине 1—2—5 см до 30—40 см число микроорганизмов больше всего. В этом слое ОМЧ в среднем 10—50 млн в 1 г. В относительно чистых почвах этот показатель равен 1,5—2 млн в 1 г. Глубже 30—40 см число микроорганизмов снижается и в более глубоких слоях их опять мало.

Факторы, влияющие на качественный и количественный состав микроорганизмов почвы

На численность и вещевой состав микроорганизмов влияют следующие факторы:

1. Тип почвы (тундровая, подзолистая, черноземная, сероземная).

Наиболее богаты микроорганизмами черноземные почвы, в которых до 10% органических веществ от сухого веса почвы.

В 1 г черноземной почвы более 3,5 млн микробных клеток. На микробный пейзаж в таких почвах влияет обильная растительность с богатой корневой системой. Корни выделяют в почву белковые и азотистые вещества, минеральные соли, органические кислоты, витамины. В результате этого вокруг корней создаются ризосферы, т. е. скопления микроорганизмов.

Микроорганизмы, в свою очередь, влияют на биохимические процессы в почве, на плодородие. Истощенные, гористые и песчаные почвы бедны микроорганизмами. В таких почвах органических веществ 1% от сухого веса почвы.

2. Влажность почвы.

Во влажных почвах микроорганизмы размножаются лучше, чем в сухих, но в почвах торфяных болот, несмотря на большое количество влаги и органических веществ (до 50%), микроорганизмов мало, так как эти почвы имеют кислую реакцию и в них проявляется антагонистическое влияние мхов.

3. Аэрация.

Почвы, богатые влагой, плохо аэрируются. В этих условиях преобладают анаэробы, а песчаные почвы аэрируются лучше, поэтому в них больше аэробов.

4. Температура почвы.

В теплые периоды года микроорганизмов во много раз больше, чем зимой. Зимой развитие микроорганизмов прекращается, и они погибают. Наблюдаются суточные колебания количества микроорганизмов в почве. Наиболее благоприятная температура 20—30°C, а при температуре 10°C и ниже развитие замедляется.

5. Адсорбционная способность почвы.

Наибольшая адсорбирующая способность почв наблюдается у горноземных (гумусовых), она зависит от содержания в почве илистых частиц, количества средней и мелкой пыли, pH почвы. Эти

почвы богаты кальцием. Характер почв влияет и на глубину проникновения микроорганизмов.

В более влажных северных почвах жизнь микроорганизмов как бы «прижата» к поверхности, а в легких, щелочных южных почвах — жизнь микроорганизмов «углубляется». Они могут быть обнаружены на глубине 10 м и более.

Почва как фактор распространения инфекционного заболевания
Микрофлору почв делят на 2 группы:

1) **аутотрофная**, которая питается минеральными веществами.

2) **гетеротрофная** — питается органическими веществами.

Обе группы участвуют в процессах самоочищения почв, минерализации почв, хотя некоторые представители гетеротрофов загрязняют почву — это и патогенная микрофлора.

Основная масса патогенной микрофлоры в почве постепенно отмирает, однако длительность переживания патогенной микрофлоры зависит от следующих факторов:

- * свойств микроба;
- * типа почв;
- * температуры и влажности почв;
- * микробов биоцинеозов;
- * бактериофагов;
- * антагонистов-сапрофитов;
- * микроорганизмов, продуцирующих антибиотики; от токсикоза почв.

В почвах периодически появляются токсические вещества, их природа не совсем изучена, но предполагается, что это метаболиты некоторых микроорганизмов. Токсические вещества почвы губительно действуют на микроорганизмы почвы, в том числе и на полезную микрофлору.

Дизентерийная палочка при 18°C выживает в различных типах почв от 3 до 65 дней, *S. typhi* и *paratyphi* — 19—101 день.

Споровая микрофлора сохраняется дольше, даже годами и, напротив, холерные вибрионы, палочки чумы, бруцеллеза, вирусы полиомиелита — от нескольких часов до нескольких месяцев.

Процессы самоочищения в почве

При попадании в почву органических веществ сразу же повышается общее микробное число (ОМЧ), а также общее число сапрофитов (ОЧС). Обычно в грязных почвах ОМЧ ОЧС, а в чистых

ОМЧ = ОЧС или ОЧС ОМЧ. Сначала размножаются гетеротрофы, обладающие очень высокой ферментативной активностью и представленные семейством кишечных, псевдомонад, аэромонад, аэромобактерий и др. В этот период в почве много фекальных бактерий (бактерий группы кишечной палочки — БГКП, энтерококки, *Cl. perfringens*), много протеолитов, разлагающих белки, пептоны, желатина, много аммонификаторов, т. е. микробов, расщепляющих белки до NH_3 .

В процессе самоочищения почвы все время меняется состав микрофлоры. По мере повышения кислотности в почве появляются кислотолюбивые микроорганизмы: молочнокислые бактерии, дрожжи, грибы, плесени, актиномицеты.

По мере накопления аммиака в почве начинают размножаться нитрификаторы, т. е. микроорганизмы, окисляющие NH_3 до нитритов и нитратов. Эти микроорганизмы завершают цикл превращений органических веществ в неорганические.

За окисление NH_3 до HNO_2 ответственны нитрифицирующие бактерии (*Nitrosomonas*, *Nitrospirillum*), а за окисление HNO_2 в HNO_3 — нитробактерии.

Одновременно с процессами нитрификации идут процессы денитрификации, т.е. восстановление нитратов в нитриты, а далее в газообразный азот. На этом этапе ОМЧ почвы становится низким. Видовой состав и численность микрофлоры стабилизируется. Активные вегетативные формы спорообразующих бактерий и грибов уступают покоящимся спорам бацилл, актиномицетам, грибам.

В чистых почвах всегда доминируют покоящиеся споры. Спорообразование всегда говорит о законченных процессах минерализации почвы.

Сочетание ОМЧ и нитрификаторов используют для распознавания и отличия чистых почв от почв, бывших загрязненными, но находящихся на стадии минерализации. Для них характерно низкое ОМЧ, но высокое число нитрификаторов.

То же самое можно сказать и при сопоставлении общего числа сапрофитов и процентов спорных аэробов. Если процент спорных форм к ОЧС высок (40—60%), то это характерно для чистых почв, если же низок (25%), то почва загрязнена. Если к вышеперечисленным показателям добавить еще определение БГКП, *Cl. perfringens*, термофилы, то для самого свежего загрязнения

характерна большая обсемененность почвы БГКП, *Cl. perfringens*, термофилами и отсутствие нитрификаторов.

Чуть позже, когда начинаются процессы самоочищения, наряду с кишечными бактериями начинает нарастать количество нитрификаторов.

В процессе самоочищения почвы происходят изменения в показателях: наиболее быстро отмирает кишечная палочка. Обнаружено, что в сильно загрязненной почве титр БГКП увеличивается за 4,5 месяца с 10^{5-6} до ЮЛ или 1 г, титры *Cl. perfringens* и нитрификаторов были еще низкими. Такое соотношение показателей говорит об очищении почвы только от кишечных палочек и патогенных бактерий семейства кишечных и об интенсивных процессах самоочищения.

Через 9—11 месяцев в супесчаных почвах ОМЧ уменьшается от нескольких миллионов до нескольких тысяч микробных клеток в 1 г. Титры нитрификсаторов резко увеличивались. Высокие титры всех показателей говорят о законченных процессах самоочищения.

Санитарная характеристика почвы

Почва — одна из главных составляющих природной среды, которая благодаря своим свойствам (плодородие, самоочищающая способность и др.) обеспечивает человеку питание, работу, здоровую среду обитания. Нарушение этих процессов, вызванное загрязнением, может оказать неблагоприятное влияние на здоровье людей и животных. Наблюдается распространение инфекционных и инвазионных заболеваний, ухудшение качества продуктов питания, воды, водоисточников, атмосферного воздуха. Это понимание почвы, как одного из главных компонентов окружающей среды, от которого зависят условия жизни и здоровья населения, требует большого внимания к ее санитарной охране.

Санитарное состояние почвы — совокупность физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношениях.

Опасность загрязнения почв определяется уровнем ее возможного отрицательного влияния на контактирующие среды (вода, воздух), пищевые продукты и прямо или опосредованно на человека, а также на биологическую активность почвы и процессы самоочищения.

Санитарная характеристика почв населенных мест основывается на лабораторных санитарно-химических, санитарно-бактериологических, санитарно-гельминтологических, санитарно-энтомологических показателях.

По эпидемическим показаниям можно проводить индикацию и выделение из почвы патогенных микроорганизмов, в распространении которых почва играет важную роль.

Результаты обследования почв учитывают при определении и прогнозе степени их опасности для здоровья и условий проживания населения в населенных пунктах, разработке мероприятий по их рекультивации, профилактике инфекционной и неинфекционной заболеваемости, схем районной планировки, технических решений по реабилитации и охране водосборных территорий, при решении очередности санационных мероприятий в рамках комплексных природоохранных программ и оценке эффективности реабилитационных и санитарно-экологических мероприятий и текущего санитарного контроля за объектами, косвенно воздействующими на окружающую среду населенного пункта.

Оценка санитарного состояния почвы по микробиологическим показателям

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска (детские сады, игровые площадки, зоны санитарной охраны и т. п.) и в санитарно-защитных зонах по санитарно-бактериологическим показателям:

1) косвенным, которые характеризуют интенсивность биологической нагрузки на почву. Это — санитарно-показательные организмы группы кишечной палочки (БРКП, коли-индекс) и фекальные стрептококки (индекс энтерококков). В крупных городах с высокой плотностью населения биологическая нагрузка на почву очень велика, и как следствие, высоки индексы санитарно-показательных организмов.

2) прямым санитарно-бактериологическим показателям эпидемической опасности почвы — обнаружение возбудителей кишечных инфекций (возбудители кишечных инфекций, патогенные энтеробактерии, энтеровирусы);

3) почву оценивают как чистую без ограничений по санитарно-бактериологическим показателям при отсутствии патогенных

бактерий и индексе санитарно-показательных микроорганизмов до 10 клеток на 1 г почвы.

О возможности загрязнения почвы сальмонеллами свидетельствует индекс санитарно-показательных организмов (БГКП и энтерококков) 10 и более клеток в 1 г почвы.

Наличие кишечной палочки в титрах 0,9 и ниже свидетельствует о несомненном фекальном загрязнении почвы, притом свежем. Одновременно могут быть зарегистрированы низкие титры *Cl. perfringens*, нитрификаторов. Однако следует иметь в виду, что в первое время после имевшего места органического загрязнения, нитрификаторов может быть мало — необходимо время, чтобы они успели размножиться.

В процессе самоочищения на разных этапах возникают различные количественные соотношения этих показателей. Наиболее быстро отмирает кишечная палочка, поэтому при сравнительно высоких ее титрах титры *Cl. perfringens* и нитрифицирующих бактерий низкие. Это показывает, что в почве интенсивно протекают процессы самоочищения как от патогенных микроорганизмов, так и от органического загрязнения.

Высокий титр (1,0 и выше) кишечной палочки при низких титрах остальных 3 показателей характеризует почву как свободную от возбудителей кишечных инфекций, но в которой еще не закончились процессы распада и минерализации органических веществ.

Высокие титры всех показателей свидетельствуют о законченных процессах самоочищения и характеризуют почву как чистую, свободную от патогенных энтеробактерии и органических загрязнений.

6.5 Микрофлора воздуха

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры воды и почвы, над которыми расположены слои воздуха. В почве и воде микробы могут размножаться, в воздухе они не размножаются, а только некоторое время сохраняются. Поднятые в воздух с пылью, они либо оседают с каплями обратно на поверхность земли, либо погибают в воздухе от недостатка питания и от действия ультрафиолетовых лучей. Однако некоторые из них более устойчивые, например, туберкулезная палочка, споры клостридий, грибов и др., могут длительно сохраняться в воздухе.

Наибольшее количество микробов содержится в воздухе промышленных городов. Наиболее чист воздух над лесами, горами, снежными просторами. Верхние слои воздуха содержат меньше микробов. Над Москвой на высоте 500 м в одном метре воздуха содержатся 2—3 бактерии, на высоте 1000 м — в 2 раза меньше. Весьма богат микробами воздух в закрытых помещениях, особенно в лечебно-профилактических, детских дошкольных учреждениях, школах и т.д. Вместе с безвредными сапрофитами в воздухе зачастую находятся и болезнетворные микробы.

При кашле, чихании в воздух выбрасываются мельчайшие капельки-аэрозоли, содержащие возбудителей заболеваний, таких как грипп, корь, коклюш, туберкулез и ряд других, передающихся воздушно-капельным путем от больного человека — здоровому, вызывая заболевание.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

Скопление и циркуляция возбудителей заболеваний в воздухе лечебно-профилактических учреждений является одной из причин возникновения госпитальных гнойно-септических инфекций, которые наносят колоссальный экономический ущерб, увеличивая стоимость лечения в 2 раза.

Вследствие этого в последнее время уделяют большое внимание санитарно-бактериологическому исследованию воздуха в больницах, операционных, родильных домах, детских учреждениях и др. Исследования проводят как в плановом порядке, так и по эпидемиологическим показаниям. Бактериологическое исследование воздушной среды предусматривает:

- определение общего содержания микробов в 1 м³ воздуха;
- определение содержания золотистого стафилококка в 1 м³ воздуха.

Методы отбора проб воздуха

Существуют два основных способа отбора проб воздуха для исследования:

1. **Седиментационный** — основан на механическом оседании микроорганизмов;
2. **Аспирационный** — основан на активном просасывании воздуха (этот метод дает возможность определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий).

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппарата Кротова, который состоит из трех основных частей: основания, корпуса и крышки. В крышке укреплен диск из прозрачного органического стекла с клиновидной щелью для засасывания воздуха. Для определения количества воздуха, прошедшего через прибор, на наружной стенке корпуса помещен ротаметр. В верхней части корпуса расположен вращающийся диск, на который устанавливается чашка Петри. Засасывание воздуха в прибор осуществляется центробежным вентилятором, насаженным на ось электродвигателя. Поступающая в прибор струя воздуха ударяется о поверхность находящейся в чашке питательной среды, оставляя на ней микроорганизмы, и, обтекая электродвигатель, выходит через ротаметр наружу.

Скорость протягивания воздуха составляет 25 л в минуту. Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 литров для определения общего содержания бактерий и 250 литров для определения наличия золотистого стафилококка.

При отборе проб в разных помещениях необходимо обрабатывать поверхность аппарата, столик, внутренние стенки дезинфицирующим раствором 70° спиртом.

Определение микробного числа, патогенных микроорганизмов

Для определения общего содержания бактерий в 1 м³ воздуха забор проб проводят на 2% питательный агар. Посевы инкубируют при температуре 37° С в течение 24 часов, затем оставляют на 24 часа при комнатной температуре, подсчитывают количество выросших колоний и производят перерасчет на 1 м³ воздуха. Если на чашках питательного агара выросли колонии плесневых грибов, их подсчитывают и делают перерасчет на 1 м³ воздуха. В протоколе количество плесневых грибов указывают отдельно.

Для определения наличия золотистого стафилококка забор проб проводят на желточно-солевой агар (ЖСА). Чашки помещают в термостат при температуре 37° С на 24 часа и выдерживают еще 24 часа при комнатной температуре, можно на 48 часов при температуре 37°С. Колонии, подозрительные на стафилококк, подлежат обязательной микроскопии и дальнейшей идентификации.

С желточно-солевого агара снимают в первую очередь колонии стафилококков, которые образуют радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция). Дальнейшему изучению подвергают также пигментированные колонии и с отрицательной

лецитовителлазной реакцией не менее двух колоний различного вида. Подозрительные колонии пересевают на чашки с кровяным или молочным агаром. Дальнейшее изучение их проводят по схеме.

Бактериологическое исследование на стафилококк

1-й день.

Посев на элективные среды (желточно-солевой, молочно-солевой или желточно-солевой агар). Засеянные среды выдерживают в термостате при 37° С в течение 2 суток, либо одни сутки в термостате и дополнительно 24 часа на свету при комнатной температуре.

2—3-й день.

Просмотр чашек, фиксация в журнале характера и массивности роста. На вышеуказанных средах стафилококк растет в виде круглых блестящих, малянистых, выпуклых пигментированных колоний. На средах, содержащих желток, золотистый стафилококк, выделенный от человека, в 60— 70% случаев образует радужный венчик вокруг колонии (положительная лецитовителлазная реакция).

Отсев на скошенный агар для дальнейшего исследования не менее 2 колоний, подозрительных на стафилококк. Для исследования отбирают прежде всего колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию.

Пробирки с посевом помещают в термостат при 37°С на 18—20 часов.

4-й день.

После суточной инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности и хлопьеобразующего фактора.

Под микроскопом окрашенные по Граму стафилококки имеют вид фиолетово-синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими кучками («кружево»).

Плазмокоагулирующую активность проверяют в реакции коагуляции плазмы (РКП). С учетом результатов РКП и лецитовителлазной активности в 70—75% случаев, на четвертый день исследования может быть подтверждена принадлежность выделенного штамма к виду золотистого стафилококка и выдан соответствующий ответ.

Если культура обладает только плазмокоагулирующей или только лецитовителлазной активностью, то для окончательного ответа требуется определение других признаков патогенности —

ферментация маннита в аэробных условиях или ДНКазной активности.

Определение антибиотикограммы проводят только после выделения чистой культуры. Выделенные культуры золотистого стафилококка подлежат фаготипированию.

5-й день.

Учет результатов фаготипирования, определения чувствительности к антибиотикам, ДНКазной активности. Окончательная выдача ответа.

Исследование воздуха седиментационным методом допускается в исключительных случаях.

Чашки Петри с питательной средой (МПА) устанавливают в открытом виде горизонтально, на разном уровне от пола. Метод основан на механическом оседании бактерий на поверхность агара в чашках Петри. Чашки со средой экспонируют от 10 до 20 минут, в зависимости от предполагаемого загрязнения воздуха. Для выявления патогенной флоры используют элективные среды. Экспозиция в этих случаях удлиняется до 2—3 часов. После экспозиции чашки закрывают, доставляют в лабораторию и ставят в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. На следующий день изучают выросшие колонии.

Контрольные вопросы:

1. Микрофлора наружных покровов.
2. Микрофлора воды, почвы, воздуха.
3. Методы санитарно – бактериологического обследования объектов окружающей среды.
4. Посевы отпечатков пальцев на МПА и окрашивание мазков по Граму.
5. Произвести отбор пробы воздуха в учебной комнате седиментационным способом.
6. Произвести отбор пробы воздуха в учебной комнате аспирационным способом (аппаратом Кротова).
7. Определить общее микробное число в 1 м³ воздуха (использовать заранее подготовленные чашки с выросшими колониями).
8. Изучить тинкториальные и ферментативные свойства выросших колоний

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Задача № 7

В родильном доме возникли случаи внутрибольничной инфекции:

нагноение пупочного кольца у новорожденного и послеоперационного шва у роженицы. Из гноя выделены штаммы *St aureus*.

1. Как установить механизм заражения?
2. Назовите методы изучения санитарно-бактериологического состояния воздуха.

Задача № 8

В бактериологическую лабораторию поступил образец испражнений больного с предварительным диагнозом «Дисбактериоз кишечника».

1. Дайте определение «Дисбактериоз».
2. Классификация дисбактериоза по этиологии, по степени компенсации?
3. Назовите интегральный показатель для определения степени микрoэкологических нарушений в кишечнике.

Игра «Кто больше? Кто быстрее?»

Для работы необходимо:

1. Карточки с вопросами по теме (к-во карточек равно числу студентов в группе, в каждой карточке по 5 вопросов).
2. Секундомер.

Ход работы:

1. Игра проводится в устном виде.
2. Студенты поочередно вытягивают карточки с вопросами.
3. В течение нескольких минут каждый студент устно отвечает на серию вопросов, написанных на карточке.
4. Преподаватель считает число правильных ответов.
5. В игре участвуют все студенты.
6. Общее время игры 45 минут.
7. Вопросы, на которые были даны правильные ответы, обсуждаются.

8. Ответы студентов оцениваются по следующей форме:

- правильные 5 ответов-0,9 балла
- правильные 4 ответа-0,7 балла
- правильные 3 ответа-0,5 балла
- правильные 2 ответа-0,3 балла
- правильные 1 ответ-0,1 балла
- правильные 0 ответов-0 баллов

9. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущей оценки занятия.

Перечень вопросов:

1. Микрофлора человека.
2. Санитарная микробиология.
3. Распространение микроорганизмов в природе, роль в круговороте веществ
4. Микрофлора воды.
5. Микрофлора почвы.
6. Факторы, влияющие на качественный и количественный состав микроорганизмов почвы
7. Процессы самоочищения в почве
8. Микрофлора воздуха.
9. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха
10. Методы отбора проб воздуха

2. Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют её самостоятельно, затем 3- 5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают своё мнение. В конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняется правильные ответы.

№ Микрофлора характеристика

Краткая

1. Микрофлора человека	
2. Микрофлора воды	
3. Микрофлора почвы	
4. Микрофлора воздуха	

6.6 Оценка и определение количества и качественного состава нормальной микрофлоры организма человека. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №6:

Оценка и определение количества и качественного состава нормальной микрофлоры организма человека.

Методы определения микрофлоры организма человека

Для изучения нормальной микрофлоры применяются бактериоскопический, бактериологический, генетический (ПЦР) методы.

Бактериоскопический метод имеет большое самостоятельное значение для тех биотопов организма человека, в которых обитает большое количество различных видов микроорганизмов (полость рта, кишечник, влагалище). Он позволяет получить общее представление о составе микрофлоры (преобладание грам+ или грам- бактерий той или иной формы - кокки, диплококки, стрептококки, палочки, бациллы, стрептобациллы, фузиформные бактерии, наличие грибов и т.д.), а также выявить те микроорганизмы, которые не удастся культивировать на питательных средах.

Бактериологический метод для биотопов с широким спектром микроорганизмов (полость рта, кишечник, влагалище) нужно выполнять с учетом данных бактериоскопии.

Основные принципы бактериологического исследования:

- использование качественной (видовой состав) и количественной (количественное соотношение разных видов) оценки микрофлоры;
- первичный посев материала без предварительного обогащения, так как обогащение нарушает количественные соотношения видов;
- использование большого набора различных питательных сред, подбор условий культивирования (аэробные, анаэробные и др.).

Однако следует отметить, что из 1000 различных видов микроорганизмов толстого кишечника культивируется только 10%. В связи с этим актуальным является использование **генетических методов** изучения микрофлоры организма человека, позволяющих

выявить некультивируемые виды и более точно охарактеризовать микрофлору различных биотопов.

ГЛАВА 7. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ. КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

7.1 Инфекция

Термином «инфекция» в настоящее время обозначают процесс проникновения микроорганизма в макроорганизм и размножения в нем. В зависимости от свойств возбудителя и состояния макроорганизма развитие инфекционного процесса – взаимодействия микроба и организма – может проявляться по-разному: от носительства до инфекционного заболевания.

Инфекционные болезни – крайняя форма проявления инфекционного процесса, характеризующаяся рядом особенностей, которые и обуславливают их название. Инфекционные болезни отличаются от других заболеваний тем, что вызываются патогенными микроорганизмами, развиваются после определенного инкубационного периода, с характерными для каждой болезни клиническими симптомами. При инфекционных болезнях наблюдаются изменения в макроорганизме – усиление функций естественной защиты, иммунобиологическая перестройка, развитие аллергических реакций и т.д.

Роль микроорганизмов в развитии инфекции.

Инфекционные болезни человека вызываются микроорганизмами, получившими название патогенных, т.е. болезнетворных. Патогенность является видовым признаком, генетически обусловленным, и характеризуется способностью микроорганизмов приживаться в организме, размножаться и вызывать патологические изменения.

Для патогенных микроорганизмов характерна специфичность, т.е. способность вызвать определенную инфекционную болезнь.

Болезнетворная активность микробов подвержена значительным колебаниям в пределах одного и того же вида и определяется понятием вирулентность.

Факторы патогенности (вирулентности)

Патогенность как биологический признак бактерий реализуется через их три свойства: инфекциозность, инвазивность и токсигенность (или токсичность).

Под **инфекциозностью** (или **инфективностью**) понимают способность возбудителей проникать в организм и вызывать заболевание, а также *«способность микробов передаваться с помощью одного из механизмов передачи, сохраняя в этой фазе свои патогенные свойства и преодолевая поверхностные барьеры (кожу и слизистые)»*. Она обусловлена наличием у возбудителей факторов, способствующих их прикреплению к клеткам организма и колонизации.

Под **инвазивностью** понимают способность возбудителей преодолевать защитные механизмы организма, размножаться, проникать в его клетки и распространяться в нем. Это свойство также связано с наличием у патогенных микроорганизмов большой группы факторов патогенности, которые наделяют их способностью к внедрению в клетки и размножению в них; факторов, подавляющих фагоцитоз и препятствующих ему; большой группы ферментов «агрессии и защиты».

Токсигенность бактерий обусловлена выработкой ими экзотоксинов. **Токсичность** обусловлена наличием эндотоксинов. Экзотоксины и эндотоксины обладают своеобразным действием и вызывают глубокие нарушения жизнедеятельности организма.

Инфекционные, инвазивные (агрессивные) и токсигенные (токсические) свойства относительно слабо связаны друг с другом, они по-разному проявляются у разных микроорганизмов. Существуют микроорганизмы, у которых на первый план выходят агрессивные (инвазивные) свойства. К ним относится, например, возбудитель чумы. Хотя *Y. pestis* и образует экзотоксин («мышинный» токсин), однако основными факторами его патогенности служат те, которые подавляют защитные силы организма, обеспечивая быстрое внутриклеточное размножение возбудителя и распространение его по организму.

В то же время возбудители столбняка, дифтерии и ботулизма, обладая слабыми инфекционными свойствами, продуцируют сильнейшие экзотоксины, которые и обуславливают развитие болезни, ее патогенез и клинику.

Следовательно, такое сложное биологическое свойство, как патогенность, обусловлено наличием у патогенных бактерий конкретных факторов патогенности, каждый из которых ответствен за проявление определенных свойств. К ним относятся следующие факторы:

1. Хемотаксис и подвижность (у бактерий, имеющих жгутики). С помощью хемотаксиса бактерии ориентируются в отношении своих клеток-мишеней, а наличие жгутиков ускоряет их приближение к клеткам.

2. Ферменты, разрушающие субстраты слизи, которая покрывает эпителиальные клетки слизистых оболочек. Протеазы, нейраминидазы, лецитиназы и другие ферменты, разрушая слизь, способствуют высвобождению рецепторов, с которыми взаимодействуют микроорганизмы.

3. Факторы адгезии и колонизации, с помощью которых бактерии распознают рецепторы на мембранах клеток, прикрепляются к ним и колонизируют клетки. У бактерий функцию факторов адгезии выполняют различные структуры клеточной стенки: фимбрии, белки наружной мембраны, ЛПС и другие компоненты. **Адгезия** является пусковым механизмом реализации патогенности. Бактерии могут размножаться либо в клетках, либо на поверхности клеток слизистой (на их мембранах) либо проходить через них и далее распространяться по организму. Поэтому ни один возбудитель, в том числе и вирусы, не может реализовать свою патогенность, если он не способен прикрепиться к клетке (адсорбироваться на ней). В свою очередь и токсины, до тех пор, пока они не свяжутся с рецепторами мембран клеток-мишеней, также не смогут реализовать токсические функции. Поэтому адгезия и колонизация – начальные, пусковые механизмы развития болезни.

4. Факторы инвазии, т. е. факторы, с помощью которых бактерии проникают в клетку. Обычно они сопряжены с факторами, подавляющими клеточную активность и способствующими внутриклеточному размножению бактерий. Факторы инвазии у грамотрицательных бактерий обычно представлены белками наружной мембраны.

5. Факторы, препятствующие фагоцитозу, т. е. защищающие от фагоцитоза. Они также связаны с компонентами клеточной стенки и либо маскируют бактерии от фагоцитов, либо подавляют их активность. Такие факторы есть у многих бактерий. Они

представлены либо капсулой из гиалуроновой кислоты, которая не распознается фагоцитами как чужеродная, так как химически не отличается от таковой организма, либо капсулами другой химической природы (у *B. anthracis*, *Y. pestis* и т. д.); различными белками, тормозящими фагоцитоз, – белок А (у стафилококков), М-белок (у стрептококков), антиген FraI у возбудителя чумы; пленка из фибрина, образующаяся у стафилококков, имеющих плазмокоагулазу; к их числу относятся также пептидогликан, теиховые кислоты и другие компоненты клеточной стенки.

6. Факторы, подавляющие фагоцитоз, например V-W-антигены у *Y. pestis*. Наличие таких факторов обуславливает незавершенный характер фагоцитоза. Чаще всего он связан с образованием бактериями веществ, которые подавляют «окислительный взрыв» фагоцитов. Незавершенный фагоцитоз – одна из важных причин хронизации течения болезни (хронioseпсис).

7. Ферменты «защиты и агрессии» бактерий. С помощью таких ферментов, как фибринолизин, лецитиназа, гиалуронидаза, протеазы и т. п., бактерии реализуют (наряду с факторами, подавляющими фагоцитоз и защищающими от него) свои агрессивные свойства. Эти ферменты способствуют их распространению в тканях организма. Одним из главных ферментов защиты (например, у стафилококков) является плазмокоагулаза. Превращая фибриноген в фибрин, этот фермент образует своеобразную белковую пленку вокруг клеток, которая и защищает их от фагоцитоза. Патогенность может быть связана и с другими ферментами бактерий, например с аминопептидазами, подавляющими хемотаксис фагоцитов, а также с продуктами жизнедеятельности бактерий, обладающими токсическими свойствами (птомаины и т. п.).

8. Токсины микробов. Различают эндотоксины и экзотоксины. **Эндотоксины** имеются только у грамотрицательных бактерий. Они представлены липополисахаридами и связанными с ними белками. Особенность эндотоксинов в том, что они термостабильны и высвобождаются из бактериальных клеток после их разрушения. Эндотоксины, в отличие от экзотоксинов, не обладают специфичностью действия. Их токсичность и пирогенность обусловлены липидом А, входящим в состав ЛПС и имеющим сходную структуру у разных грамотрицательных бактерий. Пирогенное действие эндотоксинов не связано с их непосредственным действием на терморегулирующие центры

головного мозга. Они индуцируют выброс какого-то пирогенного вещества из полиморфно-ядерных лейкоцитов. Эндотоксины являются воспалительными агентами: они увеличивают проницаемость капилляров и оказывают разрушающее действие на клетки. Их воспалительное и пирогенное действие неспецифично. Многообразие проявлений отравления эндотоксином обусловлено не только самим ЛПС, но и высвобождением многочисленных биологически активных соединений, синтез которых он индуцирует в организме человека и животных (гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены и др., всего более 20). Эти вещества и обуславливают нарушения в различных органах и тканях.

Все три компонента ЛПС – липид А, ядро полисахарида и его боковая цепочка из повторяющихся сахаров – обладают выраженными антигенными свойствами. ЛПС стимулирует синтез интерферонов, активизирует систему комплемента по классическому пути, оказывает митогенное действие на лимфоциты, а также аллергенное действие. Его токсические свойства, в отличие от экзотоксинов, не снимаются при обработке формалином, и ЛПС не превращается в анатоксин.

Экзотоксины. Их продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. У грамположительных бактерий экзотоксины активно секретируются через ЦМ и клеточную стенку в окружающую среду с использованием специальных секретирующих систем. У грамотрицательных бактерий (холерный вибрион, токсигенные кишечные палочки, сальмонеллы) некоторые экзотоксины (энтеротоксины) синтезируются только при определенных условиях непосредственно в инфицированном организме и нередко сохраняются в цитоплазме, освобождаясь из клетки только после ее разрушения.

Характерные черты инфекционной болезни. Течение инфекционных болезней характеризуется определенной цикличностью, последовательной сменой периодов: инкубационного, продромального, наивысшего развития, реконвалесценции, или выздоровления, а также другого исхода (переход в хроническое заболевание, смерть).

7.2 Формы проявления инфекционных болезней.

Классификация инфекций

1. По этиологии:

1) бактериальные; 2) вирусные; 3) протозойные; 4) микозы; 5) микст-инфекции.

2. По количеству возбудителей:

1) моноинфекции; 2) полиинфекции.

3. По тяжести течения:

1) легкие; 2) тяжелые; 3) средней тяжести.

4. По длительности:

1) острые; 2) подострые; 3) хронические; 4) латентные.

5. По путям передачи:

1) горизонтальные:

а) воздушно-капельный путь;

б) фекально-оральный;

в) контактный;

г) трансмиссивный;

д) половой;

2) вертикальные:

а) от матери к плоду (трансплацентарный);

б) от матери к новорожденному в родовом акте;

3) искусственные (искусственные) парентеральные – при инъекциях, обследованиях, операциях и т. д.

В зависимости от локализации возбудителя различают:

1) очаговую инфекцию, при которой микроорганизмы локализуются в местном очаге и не распространяются по всему организму;

2) генерализованную инфекцию, при которой возбудитель распространяется по организму лимфогенным и гематогенным путем. При этом развивается бактериемия или вирусемия. Наиболее тяжелая форма – сепсис.

Выделяют также:

1) экзогенные инфекции; возникают в результате заражения человека патогенными микроорганизмами, поступающими из окружающей среды с пищей, водой, воздухом, почвой, выделениями больного человека, реконвалесцента и микробоносителя;

2) эндогенные инфекции; вызываются представителями нормальной микрофлоры – условно-патогенными микроорганизмами самого индивидуума.

Разновидность эндогенных инфекций – аутоинфекции, они возникают в результате самозаражения путем переноса возбудителя из одного биотопа в другой.

Выделяют следующие периоды инфекционных болезней:

1) инкубационный; от момента проникновения возбудителя в организм до появления первых признаков заболевания. Продолжительность – от нескольких часов до нескольких недель. Больной не заразен;

2) продромальный; характеризуется появлением первых неясных общих симптомов. Возбудитель интенсивно размножается, колонизирует ткань, начинает продуцировать ферменты и токсины. Продолжительность – от нескольких часов до нескольких дней;

3) разгар болезни; характеризуется появлением специфических симптомов. Возбудитель продолжает интенсивно размножаться, накапливаться, выделяет в кровь токсины и ферменты. Происходит выделение возбудителя из организма, поэтому больной представляет опасность для окружающих. В начале данного периода в крови обнаруживаются специфические антитела;

4) исход. Могут быть разные варианты:

а) летальный исход;

б) выздоровление (клиническое и микробиологическое). Клиническое выздоровление: симптомы заболевания угасли, но возбудитель еще находится в организме. Этот вариант опасен формированием носительства и рецидивом заболевания. Микробиологическое – полное выздоровление; в) хроническое носительство.

Реинфекцией называют заболевание, возникающее после перенесенной инфекции в случае повторного заражения тем же возбудителем.

Суперинфекция возникает, когда на фоне течения одного инфекционного заболевания происходит заражение еще одним возбудителем.

Эпидемический процесс обуславливается непрерывностью взаимодействия трех составных элементов: источником инфекции, механизмом и путями передачи и восприимчивостью населения.

7.3 Методы диагностики инфекционных болезней:

1. Бактериоскопический (микроскопия), вирусоскопический (электронная микроскопия)

2. Бактериологический (выделение чистой культуры).

3. Биологический метод (заражение животных).

4. Вирусологический (выделение вирусов и токсинов):

5. Серологический (идентификация при помощи иммунной диагностической сыворотки):

6. Иммунологическая диагностика (идентификация антигенов и антител):

7. Метод генной диагностики:

полимеразная цепная реакция (ПЦР)

8. Алергологическая диагностика:

Кожные пробы со специфическими аллергенами (тулярин, туберкулин, бруцеллин, дизентерии).

Определение вирулентности

Для характеристики вирулентности микроорганизмов служат такие показатели, как DLM, DL₅₀. DLM – это минимальная смертельная доза, т.е. наименьшее количество микробных клеток, вызывающее гибель подопытных животных. Для ее установления различные количества микроорганизмов вводят восприимчивым животным, причем способ введения (подкожное, внутрибрюшинное т.п.) установлен заранее. DL₅₀ – это количество микробных клеток,

Таблица 4. Определение DLM клебсиеллы пневмонии

Метка мышь №	Способ примене- ния	Доза (число микробных тел в 1 мл)	Результат		
			выжив а- емость	Бактериоско- пическое исследовани е	Бактерио- логическо е исследова- ние
1		1млрд			
2	По	500 млн			
3	0,5 мл	250 млн			
4	Под	125 млн			
5	кожу	62,5 млн			
Заключение:					

введение которого вызывает гибель 50% подопытных животных. Эта доза вычисляется обычно статистическим путем.

Дозы, определяющие вирулентность, зависят не только от вида и штамма микроорганизма, но и от вида и возраста подопытного животного, а также от способа заражения. Поэтому для получения сравнимых результатов исследования проводят на животных одного вида, пола и массы (таб.4) При работе с бактериями используют 18-24 – часовую культуру, так как в более старых культурах присутствует много погибших клеток. Результаты определения DLM можно представить в виде таблицы.

Контрольные вопросы:

1. Болезнетворные микроорганизмы. Факторы вирулентности.
2. Патогенность и вирулентность.
3. Инфекция, инфекционный процесс.
4. Источники инфекционных болезней
5. Пути заражения инфекционных болезней
6. Формы инфекционных болезней.
7. Периоды инфекционных болезней
8. Методы диагностики инфекционных болезней

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Тренинг «Бумеранг»

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается своё задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов высказывает своё мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Понятие инфекции и инфекционного процесса
2. Серологический метод диагностики
3. Формы инфекционных заболеваний

Задание для 2-ой группы

1. Аллергический метод диагностики
2. Отличие суперинфекции от реинфекции
3. Характерные черты инфекционной болезни

Задание для 3-ой группы

1. Воспаление и фагоцитоз
2. Формы проявления инфекционных болезней
3. Биологический метод диагностики

Задание для 4-ой группы

1. Бактериологический метод диагностики
2. Отличие зоонозных болезней от антропонозных
3. Действие внешнего фактора на течение инфекционного процесса

Задание для 5-ой группы

1. Воспаление и фагоцитоз
2. Формы проявления инфекционных болезней

3. Элементы эпидемического процесса

Задание для 6-ой группы

1. Формы проявления инфекционных болезней
2. Серологический метод диагностики
3. Формы инфекционных заболеваний

Методика проведения деловой игры «Кот в мешке»

Для работы необходимо:

1. Наборы вариантов заданий
2. Номерки для жеребьевки по числу студентов в группе
3. Чистые листы бумаги

Ход работы:

1. Все студенты группы жеребьевкой делятся на подгруппы по 3 студента.
2. Каждая подгруппа садится за отдельный стол, готовит чистый лист бумаги и ручку
3. На листе пишется дата, номер группы, факультет, ФИ студентов – участников данной подгруппы деловой игры «Кот в мешке».
4. Один из участников каждой подгруппы подходит к преподавателю и берет из конверта вариант задания, для каждой подгруппы отдельный вариант, но уровень сложности заданий для всех групп примерно одинаков
5. Студенты переписывают на лист свое задание, и засекается время – 15 мин на выполнение работы.
6. Все подгруппы, каждая в своем кругу, обсуждает задание и записывает ответ, по возможности полный, аккуратно
7. Преподаватель обязан строго следить, чтобы студенты не списывали (это главное условие) и не общались с другими подгруппами
8. По окончании 15 мин листы ответов собираются
9. Преподаватель в течение занятия проверяет правильность, полноту и аккуратность выполнения задания
10. Всем участникам подгруппы выставляется одинаковый балл:

Максимально 100%

71 – 85% - «4»

56 – 70% - «3»

0 – 55% - «2»

11. На листе ответов преподаватель ставит балл и подпись

12. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущего итогового занятия в качестве оценки за теоретическую часть

13. В нижней свободной части журнала делается отметка о проведении дополнительной деловой игры, староста ставит подпись

14. Протоколы работ сохраняются педагогом

Примерный перечень вопросов деловой игры:

1. Понятие об инфекции, инфекционном процессе.
2. Объясните понятия: «патогенность», «вирулентность»
3. Понятие об источнике инфекции, назовите известные вам источники инфекции
4. Классификация инфекционных заболеваний по источникам инфекции
5. Пути распространения инфекционных заболеваний
6. Понятие о спорадической заболеваемости, эпидемии, пандемии, эндемической заболеваемости

7.4 Посещение вивария института. Изучение биологических методов диагностики. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №7



Рис.20

Вскрытие и микробиологическое исследование погибших животных

Вскрытие производят непосредственно после гибели животного во избежание

проникновения микроорганизмов из кишечника в кровь и другие органы.

Животное вскрывают на операционном столике, используя стерильные инструменты. Все наблюдения, сделанные во время вскрытия, протоколируют.(рис.20)

За зараженными мышами наблюдают в течение 3 дней, после чего производят учет результатов. Трупы мышей подвергают бактериологическому и бактериоскопическому исследованиям.

Для этого фиксируют на специальном столике; вскрытие производят послойно: разрез кожи по средней линии, а затем стерильным инструментом, погруженным в спирт и обожженным над пламенем горелки, вскрывают грудную полость. Стерильной пастеровской пипеткой собирают каплю крови и тут же засевают в пробирку с МПБ и в чашку с МПА, одновременно готовят на предметном стекле препарат для бактериоскопии и мазков.

Препараты подсушивают, фиксируют над пламенем горелки, окрашивают водным фуксином и микроскопируют. Посевы помещают в термостат, результаты учитывают на следующем занятии.

ГЛАВА 8. ИММУНИТЕТ, ВИДЫ ИММУНИТЕТА. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА.

8.1 Иммуитет

Различают два основных вида иммунитета – наследственный и приобретенный. (рис.21)

Наследственный иммунитет присущ определенному виду животных или человеку и передается из поколения в поколение, как и другие генетические признаки.

Виды иммунитета



Естественный врожденный - организм получает по наследству;

Естественный приобретенный пассивный - при получении антител с молоком матери или через плаценту.

Естественный приобретенный активный — при получении после болезни, когда образуются собственные антитела против возбудителей.

Вакцина - препарат, содержащий убитые или ослабленные микробы или их токсины.

Лечебная сыворотка – препарат, содержащий готовые антитела.

Прививка – процедура введения вакцины

Рис.21

Приобретенный иммунитет развивается вследствие перенесенной инфекции или в результате иммунизации.

Факторы и механизмы, обуславливающие естественную резистентность организма. Ареактивность клеток является главным фактором видового иммунитета против вирусов и токсинов, также неповрежденные, нормально функционирующие кожа и слизистые оболочки защищают организм от внедрения патогенных бактерий и вирусов. Защитную функцию несет лимфоидная ткань –

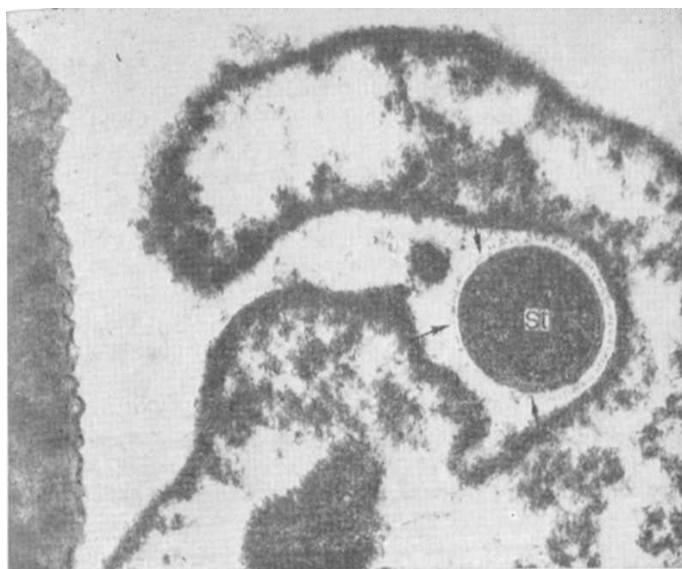


Рис. 22. Фагоцитоз стафилококка макрофагом. Стрелками указана полость формирующейся фагосомы со стафилококком (st) (электроннограмма А. С. Быкова).

лимфатические узлы подкожной клетчатки, слизистых оболочек, печени, селезенки. Особую роль в естественном иммунитете играет комплемент – сложная система сывороточных белков, обладающих ферментативными свойствами. К естественным факторам защиты относятся нормальные антитела. Воспаление и фагоцитоз представляют собой важные факторы защиты

организма.(рис.22)

Антигенами

В

инфекционной иммунологии было принято называть чужеродные для организма вещества, которые при попадании в его внутреннюю среду способны вызывать образование специфических антител и соединяться с ними. Существуют полноценные антигены, которые способны вызвать в организме синтез иммуноглобулинов и реагировать с ними. Кроме полноценных антигенов существуют и неполноценные, которые называют гаптенами.

Антитела – иммуноглобулины. Это группа структурно родственных белков с характерными химическими и биологическими свойствами. Одним из важнейших свойств антител является их специфичность, которая выражается в том, что антитела полнее и активнее взаимодействуют с тем антигеном, которым организм был стимулирован.

8.2 Аллергия

Термином «аллергия» обозначают все явления, связанные с измененной реактивностью организма к различным внешним воздействиям, которая постоянно меняется в зависимости от возраста, условий труда, питания, быта, климатических и других явлений.

Аллергия – резкое повышение специфической реактивности различных систем организма, которая может привести к повреждению тканей или гибели организма в результате осуществления иммунных реакций, направленных на антиген – аллерген. Различают два типа аллергии: гиперчувствительность немедленного типа – ГНТ и гиперчувствительность замедленного типа – ГЗТ.

Аллергены – вещества со свойствами антигенов, способные вызывать аллергические реакции у человека и животных.

Развитие аллергических реакций. Начальные этапы аллергических реакций соответствуют закономерностям развития иммунитета. Существуют два типа иммунологических реакций: 1) связанные с циркулирующими в крови антителами; 2) связанные со специфическими клетками – клеточные иммунологические реакции.

Аллергические антитела делятся на две группы: 1) фиксированные, или клеточные антитела, тесно связанные с клетками, участвующие в аллергических реакциях замедленного типа; 2) свободные, или циркулирующие антитела – реагины, обнаруживаемые в крови и других биологических жидкостях организма.

8.3 Реакции иммунитета

Одним из проявлений реакции иммунной системы организма на антиген, нарушивший постоянство его внутренней среды, служит синтез иммуноглобулинов. Взаимодействие антител с антигенами называют иммунной реакцией, а поскольку взаимодействующие антитела находятся в сыворотке – серологическими реакциями.

Реакция взаимодействия антитела с антигеном осуществляется в две фазы: специфическую и неспецифическую. Специфическая фаза характеризуется соединением детерминантной группы антигена с активным центром антитела. В механизме этого соединения участвуют электростатические и межмолекулярные силы. В результате такого соединения образуется комплекс, утрачивающий растворимость в изотонических растворах. Так как антигены поливалентны, а антитела двух- или более валентны, то из

соединение приводит к образованию макроконгломератов, выпадающих в осадок – неспецифическая фаза.

Реакция нейтрализации токсина антитоксином

Антитоксины – антитела, нейтрализующие ядовитые свойства соответствующего экзотоксина. Внешнее проявление реакции *in vitro* представляется феноменом флоккуляции – помутнением, характеризующим образование комплекса токсин + антитоксин в оптимальных количественных соотношениях ингредиентов.

Реакция агглютинации

Агглютинины – антитела, способные вызывать образование макроконгломера, в котором скучены соответствующие микробы или какие-либо клетки. Скучивание микробов и выпадение в осадок в виде хлопьев или зерен, наблюдаемое *in vitro* – реакция агглютинации.

Реакция преципитации

Преципитины – антитела, вызывающие образование осадка при взаимодействии с высокодисперсными антигенами. Взаимодействие антигена и антитела дает видимое проявление в растворе электролита.

Реакция преципитации сыворотки высокоспецифична и чувствительна. Используется для определения антигенов, выявляет очень малые количества.

Реакция лизиса

Лизинами называют антитела, растворяющие тело – является одной из существенных к защите организма от микробов, поскольку приводит к их гибели.

Реакция иммунного гемолиза – растворение эритролементом, активированным комплексом антиген – антитело – является одной из существенных в защите организма от микробов, поскольку приводит к их гибели.

Реакция связывания комплемента

Комплекс, образующийся при взаимодействии антитела с антигеном, всегда адсорбирует на себе комплемент. Ставят РСК в два приема: 1) соединяют антиген с испытуемой сывороткой, в которой предполагаются специфические антитела, а затем добавляют комплемент; 2) после времени, отводимого для прохождения реакции, присоединяют гемолитическую систему. Выдержав в термостате 30 мин, учитывают наступление гемолиза. Он произойдет в том случае, если комплемент, не связавшийся в первой стадии

останется свободным и присоединится к гемолитической системе. Связывание комплемента в первой фазе реакции – отсутствие гемолиза – свидетельствует о наличии антител в испытуемой сыворотке.

Реакция иммунофлюоресценции

Для постановки реакции иммунофлюоресценции необходимо иметь меченные флюорохромными красителями иммунные сыворотки.

Существует метод прямой и непрямой иммунофлюоресценции, носящей еще название метода Кунса. В прямом методе приготовленный из исследуемого материала препарат-мазок обрабатывают флюоресцирующей сывороткой, содержащей антитела к искомому антигену.

При непрямом методе мазок сначала обрабатывают несветящейся иммунной сывороткой к искомому антигену, а затем выявляют адсорбировавшиеся антитела антигаммаглобулиновой сывороткой, меченной флюорохромом.

8.4 Методы оценки иммунного статуса организма человека.

А. Определение специфических антител к микробным антигенам, аутоантигенам, аллоантигенам, аллергенам.

Б. Иммунохимические исследования: количественная и качественная оценка иммуноглобулинов, их фрагментов, иммунных комплексов в плазме и биологических жидкостях, определение цитокинов и растворимых рецепторов для цитокинов в плазме и биологических жидкостях, продуктов эффекторных клеток и воспалительных реакций, компонентов комплемента, белков острой фазы, других белков.

В. Клеточные исследования. Определение субпопуляций лимфоцитов и фенотипических маркеров, характеризующих изменение функционального состояния клеток, клональности лимфоидных клеток, функциональной активности лимфоцитов *in vitro*, пролиферативного ответа, продукции иммуноглобулинов, определение цитотоксичности лимфоцитов и других эффекторных клеток, оценка функциональной активности макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов.

Г. Иммуногистологические исследования.

Д. Иммуногенетические исследования: HLA-типирование с помощью серологической и молекулярно-биологической технологии,

фенотипическое и генотипическое определение аллотипов сывороточных белков, пренатальная диагностика и наследование генетически детерминированных дефектов иммунной системы.

Набор методов для первичного скрининга иммунной системы (тесты 1-го уровня) включает определение популяций и субпопуляций лимфоцитов по кластерам дифференцировки (CD-3 – Т-лимфоциты, CD-4 – Т-хелперы, CD-8 – цитотоксические Т-киллеры/супрессоры, CD-16 – естественные киллеры, CD-19 – В-клетки и т.д.) методами цитофотометрии или иммунофлюоресцентного анализа, определение содержания иммуноглобулинов классов А, М, G_c помощью метода радиальной иммунодиффузии по Манчини или нефелометрическими методами, уровня циркулирующих иммунных комплексов спектрофотометрическим методом, показателей фагоцитоза. Эти исследования позволяют выявить нарушения в основных звеньях иммунитета (гуморальном, клеточном, фагоцитарном). Уточняющие методы (тесты 2-го уровня), требующие специальной аппаратуры, реактивов и обученного персонала, позволяют оценить функции клеток иммунной системы, вспомогательных клеток, продукцию цитокинов и т.д. Для объективизации и стандартизации данных иммунологических исследований используется специальная аппаратура (иммуноферментные анализаторы, спектрофотометры и фотоэлектроколориметры, счетчики радиоактивности, лазерные нефелометры и проточные цитофлюориметры, хемилюминометры).

В частности, определение количества лимфоцитов разных популяций и субпопуляций по поверхностным маркерам проводится с помощью автоматического подсчета клеток с использованием специального прибора - проточного цитофлюориметра (рис. 41, см. приложение). Для этого образец цельной крови инкубируют с моноклональными антителами, меченными флюоресцентным красителем, пропускают через тонкую трубочку, на выходе из которой формируется струя из капель, содержащих только одну клетку, проходящую перед лазерным лучом. При попадании лазерного луча в клетку происходит его отклонение, а также свечение поверхностного антигена клетки в результате его соединения с соответствующим флюоресцирующим моноклональным антителом. Фотоумножитель проточного цитофлюориметра регистрирует оба сигнала, при этом светорассеяние дает информацию о размерах и гранулярности клетки, а флюоресценция - о количестве связанных

клеткой меченых антител, позволяя судить об экспрессии поверхностных маркеров. При использовании двух разных моноклональных антител, конъюгированных с разными флюорохромами (например, флюоресцеина, дающего зеленое свечение, и фикоэритрина, обладающего красным свечением), клетки оцениваются по интенсивности зеленого и красного типов флюоресценции.

Оценка иммунного статуса организма человека при различных патологических состояниях имеет важное практическое значение для диагностики, лечения, прогнозирования, оценки эффективности проводимой терапии при многих заболеваниях. Иммунограмма здорового человека представлена в таблице 6.

Иммунотропные препараты для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы, подразделяются на следующие группы:

- иммуномодуляторы – лекарственные средства, восстанавливающие функции иммунной системы;
- иммунокорректоры – иммуномодуляторы точечного действия, нормализующие конкретное нарушенное звено иммунной системы (фагоцитарное, клеточное, гуморальное);
- иммуностимуляторы – лекарственные препараты, усиливающие функции иммунной системы;
- иммунодепрессанты – средства подавляющие иммунную систему.

Таблица 6 . Иммунограмма здорового человека

Показатели	Норма	Показатели	Норма	П ров еде ние реа кц ии агг лю тин аци и на сте кле В озь мит е обе зжи рен ное пре дме тно е сте кло . Пас тер овс
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты) %%	50-80	HLA-DR ⁺ %%		
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты) кл/л	1000-2200	HLA-DR ⁺ кл/л	300-600	
CD4 ⁺ (Т-хелперы) %%	30-60	IgG г/л	9,0-16,0	
CD4 ⁺ (Т-хелперы) кл/л	600-1600	IgM г/л	0,7-1,5	
CD8 ⁺ (Т-киллеры) %%	10-40	IgA г/л	1-2,5	
CD8 ⁺ (Т-киллеры) кл/л	100-1200	IgE г/л	0-150 МЕ/мл	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (ИРИ)	1,0-2,0	ЦИК усл.ед.	18-65	
CD19 ⁺ (В-лимфоциты) %%	10-20	Фагоцитарная активность %%	50-74	
CD19 ⁺ (В-лимфоциты) кл/л	100-600	Фагоцитарное число	5-9	
CD16 ⁺ (NK)%%	9-16	ХЛ фагоцитов спонтанная	1,0-1,8	
CD16 ⁺ (NK) кл/л	200-400	ХЛ стимулированная	3-12	
ХЛ- хемилюминесценция нейтрофилов (спонтанная, стимулированная);				

кой пипеткой наберите диагностическую брюшнотифозную сыворотку. Нанесите. Между каплями должно быть расстояние 1,5-2,0 см. Бактериальной петлей возьмите каплю, культуры из бактерий брюшного тифа и внесите в раствор хлорида натрия и в одну из них

каплю сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси.

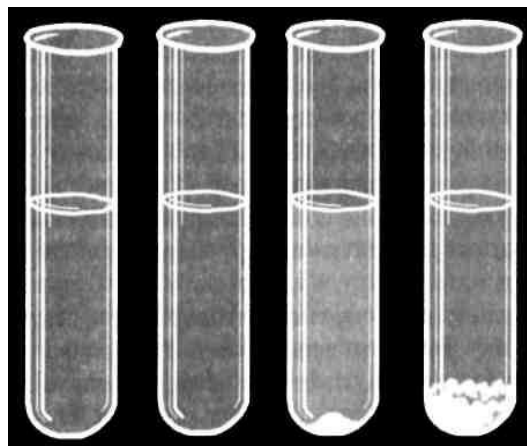
Капля сыворотки, в которую не нанесена культура, является контролем сыворотки.

Нельзя переносить культуру в каплю изотонического раствора, которая является контролем антигена.

Развернутая реакция агглютинации

Готовят последовательные, чаще двукратные разведения сыворотки. В реакции

агглютинации сыворотку больного обычно разводят в соотношении от 1:50 до 1:1600, а иммунную диагностическую сыворотку до титра или до половины титра (титр сыворотки указан на этикетке). В каждой пробирке должен



содержаться 1 мл сыворотки в соответствующем разведении. В качестве контроля сыворотки используют сыворотку в максимальной концентрации. В эту пробирку антиген не вносят. В качестве контроля антигена используют пробирку, содержащую 1 мл изотонического раствора хлорида натрия и антиген. Антиген (диагностикум или свежеприготовленную взвесь микроорганизмов) вносят во все пробирки, кроме контроля сыворотки, в объеме 0,1 мл (2 капли). В пробирках при этом должно появиться небольшое равномерное помутнение. Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37*С. Через 18-20 ч учитывают результат. Учет реакции агглютинации можно производить только при безукоризненных результатах в контроле: равномерное помутнение в контроле антигена и полная прозрачность в контроле сыворотки.(рис.23)

Учет реакции производят невооруженным глазом с помощью лупы или в агглютиноскопе. При положительном результате реакции в пробирках появляются хлопья склеивающихся клеток, которые оседают на дно пробирок. Жидкость над осадком при этом просветляется. При встряхивании осадка (агглютината) видны хлопья, плавающие в прозрачной жидкости (таб. 7).

Таблица 7. Схема постановки развернутой РА.

Ингредиенты, мл	Пробирки						
	опыт					контроль	
	1	2	3	4	5	сыворотка	антигена
Изотонический раствор хлорида натрия	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Сыворотка больного 1:25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Полученные разведения	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:25	-
Диагностикум О	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Диагностикум Н	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Результат О Н							

Контрольные вопросы:

1. Иммунитет. Его виды.
2. Антигены.
3. Антитела.
4. Аллергия.
5. РНТ.
6. ГЗТ.
7. Применение серологических реакций: постановка реакции преципитации.
реакции агглютинации, иммунофлюоресценции, нейтрализации
8. Постановка реакции связывания комплемента.
9. Постановка реакции лизиса.
10. Интерпритация результатов серологических реакций

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Реакции иммунитета	Краткая характеристика
1	Реакция нейтрализации токсина с антитоксином	
2	Реакция агглютинации	
3	Реакция гемагглютинации	
4	Реакция Кумбса	
5	Реакция преципитации	
6	Реакция иммунофлюоресценции	
7	Реакция лизиса	
8	Реакция связывания комплемента	

Ручка на середине стола Для работы необходимо:

1. Вопросы, распечатанные на отдельных листах
2. Чистые листы бумаги, ручки
3. Рабочая тетрадь

Ход работы:

1. Все студенты группы жеребьевкой делятся на 3 подгруппы по 4 студента в каждой
2. Каждая подгруппа садится за отдельный стол, готовит чистый лист бумаги и ручку
3. На листе пишется дата, номер группы, факультет, ФИ студентов – участников данной подгруппы (название деловой игры)
4. Предлагается задание: ответить на один конкретный вопрос всей подгруппе
5. Каждый студент записывает на листе свою фамилию и один вариант ответа и передает лист соседу, а свою ручку передвигает на середину стола.
6. Педагог контролирует работу группы и участие в ней каждого. Общий правильный вариант записывается в тетради.

7. Студенты, которые дали правильные варианты ответов, получают максимальный балл – 100%, от рейтинга теоретической части. Студенты, занявшие 2-е место – 85,9% рейтинга; занявшие 3-е место – 70,9%. Не ответившие или ответившие неверно – 0 баллов.
8. На листе преподаватель ставит балл и подпись
9. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущего итогового занятия в качестве оценки за теоретическую часть
10. В нижней свободной части журнала делается отметка о проведении дополнительной деловой игры, староста ставит подпись
11. Протоколы работ сохраняются педагогом

Примерный перечень вопросов для проведения деловой игры:

1. Иммунитет. Его виды.
2. Антигены.
3. Антитела.
4. Аллергия.
5. РНТ.
6. ГЗТ.
7. Применение серологических реакций: постановка реакции преципитации.
реакции агглютинации, иммунофлюоресценции, нейтрализации
8. Постановка реакции связывания комплемента.
9. Постановка реакции лизиса.
10. Интерпритация результатов серологических реакций.

**ГЛАВА 9. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.
ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ. ПРИМЕНЕНИЕ
ИЗМЕНЧИВОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ. ВАКЦИНЫ И СЫВОРОТКИ.**

9.1 Генетика бактерий

Генетика (от греч. *genos* — рождение) — это наука, изучающая наследственность и изменчивость. Микроорганизмы обладают способностью изменять свои основные признаки:

морфологические (строение); культуральные (рост на питательных средах); биохимические или ферментативные признаки (добавление определенных веществ в питательную среду может вызвать

активацию фермента, который до этого находится в латентном состоянии); биологические свойства — может меняться степень патогенности, на этом основаны способы приготовления живых вакцин.

Например, при 12—14-дневном культивировании возбудителя сибирской язвы при t° — 42—43 $^{\circ}$ С микробы потеряли способность вызывать заболевание у животных, но сохранили свои иммуногенные свойства.

БЦЖ (бацилла Кальмета-Герена) снизила болезнетворность бычьего вида микобактерий туберкулеза путем длительных пассажей на картофельной среде с желчью и глицерином при t° 38 $^{\circ}$ С. Пересевы через каждые 14 дней получили ослабленный штамм микобактерий туберкулеза, который назван «вакциной» БЦЖ, используемой для профилактики туберкулеза.

Наследственность — это способность организмов сохранять определенные признаки на протяжении многих поколений.

Изменчивость — это приобретение признаков под влиянием различных факторов, отличающих их от предыдущих поколений.

Генетическая информация в клетках бактерий заключена в ДНК (у некоторых вирусов РНК). Молекула ДНК состоит из двух нитей, каждая из которых спирально закручена относительно другой. При делении клетки спираль удваивается. И вновь образуется двунитчатая молекула ДНК. В состав молекулы ДНК входят 4 азотистых основания — аденозин, гуанин, цитозин, тимин. Порядок расположения в цепи у разных организмов определяет их наследственную информацию, закодированную в ДНК.

9.2 Формы проявления изменчивости

1. Ненаследственная, фенотипическая изменчивость, или модификация, микроорганизмов возникает как ответ клетки на неблагоприятные условия ее существования. Эта адаптивная реакция на внешние раздражители не сопровождается изменением генотипа и поэтому не передается по наследству. Могут измениться морфология (удлиняется), культуральные свойства (стафилококки без пигмента при недостатке кислорода) биохимические или ферментативные свойства, вырабатываются адаптивные ферменты *E. coli*, фермент лактаза на среде — с лактозой.

2. Наследуемая генетическая изменчивость возникает в результате мутаций и генетических рекомбинаций.

Фенотипическая изменчивость (ненаследуемая модификация)

Генотипическая изменчивость наследуемая

Мутации (от лат. mutatio — изменять) — это передаваемые по наследству структурные изменения генов. При мутациях изменяются участки геномов (т. е. наследственного аппарата).

Бактериальные мутации могут быть спонтанными (самопроизвольными) и индуцированными (направленными), т. е. появляются в результате обработки микроорганизмов специальными мутагенами (хим. веществами, температурой, излучением и т.д.).

В результате бактериальных мутаций могут отмечаться:

- * изменение морфологических свойств; изменение культуральных свойств; возникновение у микроорганизмов устойчивости к лекарственным препаратам;

- * ослабление болезнетворных свойств и др.

К генетическим рекомбинациям относятся рекомбинации генов, которые происходят вследствие трансформации, от донора трансдукции и конъюгации.

Трансформация, трансдукция, конъюгация бактерий.

Трансформация — передача генетического материала реципиенту при помощи изолированной ДНК другой клетки. Клетки, способные воспринимать ДНК другой клетки, называются компетентными.(рис.24)

Состояние компетентности часто совпадает с логарифмической фазой роста. Для трансформации необходимо создавать особые условия, например, добавляя неорганические фосфаты, повышается частота трансформации.

Трансдукция — это перенос наследственного материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту, который осуществляет фаг. Например, с помощью фага можно воспроизвести трансдукцию жгутиков, ферментативные свойства, резистентность к антибиотикам, токсигенность и

другие признаки.

Конъюгация бактерий — передача генетического материала от

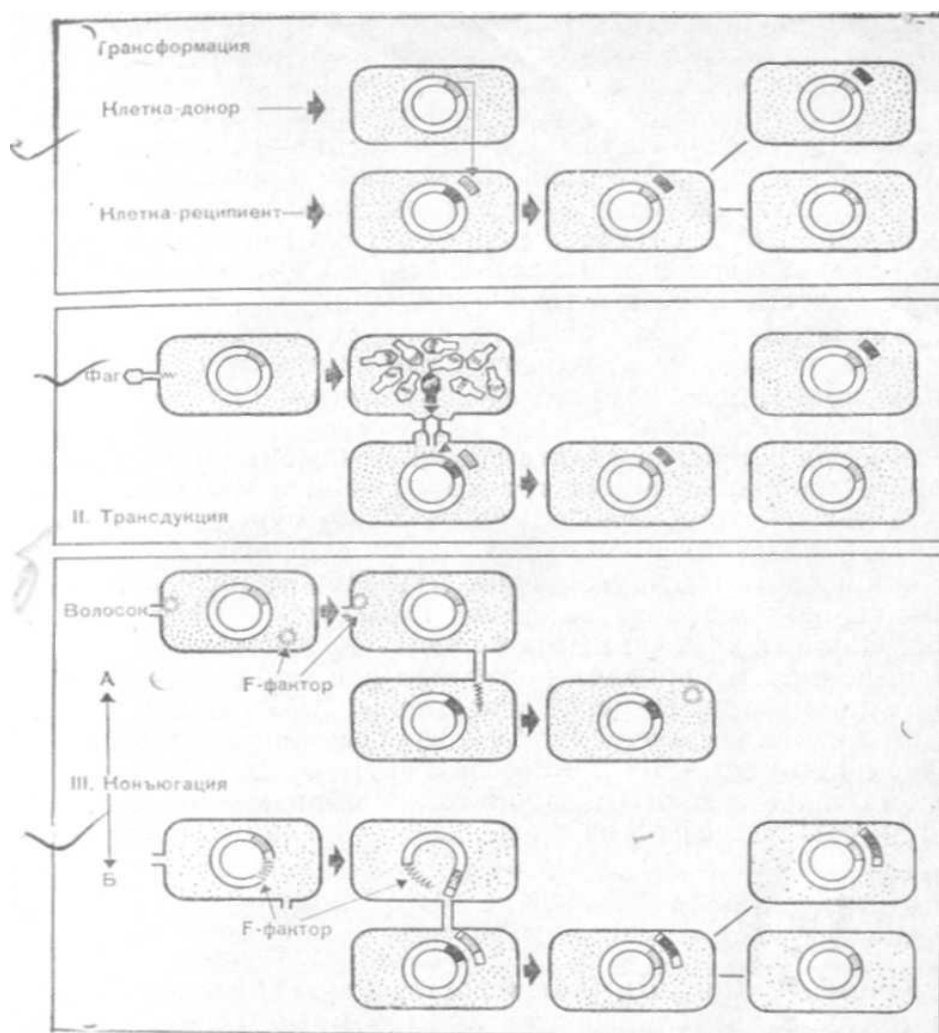


Рис. 24. Типы передачи наследственного вещества.

одной клетки другой путем непосредственного контакта. Причем происходит односторонний перенос генетического материала — от донора реципиенту. Необходимым условием для конъюгации является наличие у донора специфического фактора плодовитости F. У грамотрицательных бактерий обнаружены половые F-волоски, через них происходит перенос генетического материала. Клетки, играющие роль донора, обозначают F⁺, а реципиенты — F⁻.

F-фактор находится в цитоплазме клеток, причем он не один. При конъюгации происходит перенос только ДНК без РНК и белка.

Практическое значение изменчивости: с помощью генетических методов получены специальные культуры дрожжей и других микробов, используемые в технологии изготовления пищевых продуктов, производстве анатоксинов, вакцин, антибиотиков, витаминов;

* большое научное и практическое значение имеет генная инженерия, методы которой позволяют изменять структуру генов и включать в хромосому бактерий гены других организмов, ответственных за синтез важных и нужных веществ, которые получить химическим путем очень трудно, — инсулин, интерферон и др.;

* при использовании мутагенных факторов (УФ-лучей, рентгеновские лучи, диэтилсульфат и др.) были получены мутанты — продуценты антибиотиков, которые в 100—1000 раз активнее исходных.

Нуклеоид содержит до 5 миллионов нуклеотидных пар. Он включает в себя до 4х тысяч генов. Бактериальные гены выполняют функции питания, дыхания, роста и размножения.

Плазмидная ДНК представляет собой 2х цепочечную кольцевую молекулу ДНК. плазмиды находятся автономно от нуклеоида. По размерам плазмиды составляют до 5% ДНК нуклеоида. Они несут 40-50 генов. Клетка содержащая плазмиды обладает дополнительными свойствами (селективным преимуществом).

Наиболее изученные бактериальные плазмиды:

1. F плазида / половой фактор / плазида фертильности
2. R плазида - фактор множественной лекарственной устойчивости
3. Тох плазмиды - плазмиды токсигенности. Наиболее распространены ent плазида - энтерогенность и Hly плазида - синтез гемолизина
4. Col - плазмиды - факторы бактериоциногенности.

По количеству молекул ДНК плазмид в клетке выделяют однокопийные и многокопийные плазмиды.

По способности присутствовать в одной клетке нескольких видов плазмид они подразделяются на совместимые и несовместимые. Некоторые плазмиды могут встраиваться в бактериальную хромосому. Такие плазмиды - интегративные.

Подвижные генетические элементы (мобильные элементы генома):

1. Вставочные или инсерционные последовательности
2. Транспозоны

IS элементы это участки ДНК, которые могут целиком перемещаться из одного участка репликона в другой участок либо из хромосомы в плазмид (между хромосомой и плазмидой). IS элементы

содержат гены, необходимые для перемещения то есть ген транспозазы, и ген репрессора.

Транспозоны - сегменты ДНК, способные также к перемещению, но по сравнению с IS элементами они содержат дополнительно структурные гены, придающие клетки дополнительные признаки. Например - устойчивость к антибиотикам, токсичность.

Информация в геноме бактерий закодирована в последствии нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, углевода и остатка фосфорной кислоты. Азотистые основания представлены пуриновыми и пиримидиновыми. В структуре ДНК соблюдается принцип комплиментарности АДГЦ. **НУКЛЕОТИДЫ ФОРМИРУЮТ ГЕНЫ.** Каждый ген отвечает за свой признак. Совокупность генов - генотип. Основными признаками бактерий являются:

Морфологические - размер и форма клеток, наличие жгутиков и капсул

Тинкториальные - способность окрашиваться

Культуральные

Биохимические - способность синтезировать белки, угле; липиды

Антигенные - наличие антигенов, вызывающих синтез антител

Биологические - способность вызывать заболевания

Резистентность - к антибиотикам, бактериофагам

Эти признаки проявляются в результате действия ферментов. Если фермент работает, признак проявляется, если нет, то не проявляется. Фермент может не работать в 2х случаях : отсутствие условий для его нормальной работы или поломка гена, кодирующего синтез. В результате этих нарушений у бактерий могут возникать изменчивости:

Методы рекомбинации широко используются в генной и генетической инженерии. При конструировании генетически измененных или генетически модифицированных организмов. С этой целью используют рекомбинантную ДНК.

Принципы геноиндикации возбудителей инфекционных заболеваний (полимеразноцепная реакция (ПЦР)).

ПЦР - один из наиболее точных способов выявления инфекций. В основе метода лежит принцип многократного увеличения микроскопических концентраций фрагментов ДНК возбудителя в

биологической пробе пациента в искусственных условиях. В результате сложного процесса, называемого амплификацией, под воздействием ферментов и изменения температуры (от 50 до 95°C) из одной молекулы ДНК образуется две. При этом происходит копирование участка ДНК, который присутствует только у того вида патогенного микроорганизма, который интересует врача. Цикл образования новой молекулы ДНК занимает всего около 3 минут, а тридцати-сорока циклов вполне достаточно, чтобы получить количество молекул, необходимое для достоверного визуального определения методом электрофореза. Кроме амплификации, то есть простого увеличения числа копий молекулы ДНК, с помощью ПЦР можно производить и другие манипуляции с генетическим материалом, например, сращивать фрагменты ДНК, вводить мутации и т.д. Это позволяет использовать ПЦР не только для диагностики инфекционных и генетических заболеваний, но и для установления отцовства, клонирования и выделения новых генов.

9.3 Медицинские биологические препараты для профилактики и лечения инфекционных заболеваний

Развитие иммунологии привело к созданию раздела – практической, или прикладной иммунологии, занимающейся разработкой получения и применения бактериальных или вирусных препаратов для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний. Для создания активного искусственного иммунитета при профилактике и, реже, лечении инфекционных болезней применяются вакцины и анатоксины. Пассивный иммунитет создается введением иммунных сывороток (антитоксических, антимикробных, противовирусных) или иммуноглобулинов, выделенных из сывороток активных фракций.

Вакцины

Вакцины – препараты, применяемые для создания активного искусственно приобретенного иммунитета. В зависимости от характера входящих в их состав антигенов различают: живые вакцины, представляющие собой различные микроорганизмы с ослабленной вирулентностью; убитые, содержащие инактивированных возбудителей заболеваний; химические, состоящие из растворимых антигенов бактерий, извлеченных

химическими методами; анатоксины – обезвреженные формалином экзотоксины возбудителей токсинемических инфекций.

Живые вакцины представляют собой мутанты, т.е. штаммы микроорганизмов с остаточной вирулентностью, неспособные вызывать специфические заболевания, но сохранившие способность размножаться и находиться в организме, приводя к развитию бессимптомной вакцинной инфекции.

Вакцинные штаммы для приготовления живых вакцин были получены различными путями: методом отбора (селекция) мутантов с ослабленной вирулентностью, методом экспериментального направленного изменения вирулентных свойств возбудителя, длительным пассированием в организме животных, методом генетического скрещивания (получение рекомбинатов).

Живые вакцины, как правило, вводятся однократно более простым способом (перорально, интраназально, накожно, реже подкожно). Способность вакцинного штамма размножаться в организме, оказывать длительное антигенное раздражение обеспечивает напряженный, стойкий и длительный иммунитет.

К вакцинным штаммам предъявляются определенные требования: наличие остаточной вирулентности, достаточная иммуногенность, отсутствие возможности реверсии к исходным свойствам – обладание стойкими, наследственно закрепленными аттенуированными свойствами.

Убитые (корпускулярные) вакцины содержат взвеси бактерий, вирусов или риккетсий, инаktivированных повышенной температурой или различными химическими веществами.

Для получения убитых вакцин используют высокопатогенные штаммы, полноценные в отношении вирулентности и антигенного строения.

К убитым вакцинам, применяющимся для профилактики, относятся брюшнотифозная, холерная, коклюшная, лептоспирозная и др.

Преимуществом убитых вакцин является относительная простота их получения, не требующая длительного выделения и изучения штаммов, большая устойчивость при хранении и более длительный срок пригодности. К недостаткам вакцин из убитых микробов следует отнести их меньшую иммуногенность и необходимость дву- или трехкратных прививок. Иммунитет после введения убитых вакцин

менее продолжителен по сравнению с иммунитетом, развивающимся после вакцинации живыми вакцинами.

Вакцины из убитых бактерий вводятся при недостаточной эффективности лекарственных препаратов, что часто бывает, связано с антибиотикоустойчивостью возбудителей. Действующим началом таких вакцин является микробная клетка с входящими в ее состав антигенами, которые стимулируют иммуногенез. При лечении убитыми вакцинами активируются фагоцитарные свойства лейкоцитов и клеток макрофагальной системы.

Для лечебных целей иногда применяются так называемые аутовакцины, которые получают в каждом случае специально из убитых бактерий, выделенных от данного больного.

Химическими вакцинами принято называть препараты, содержащие наиболее активные по иммунобиологическим свойствам антигены, извлекаемые из микробных клеток различными методами.

Преимущества химических вакцин: 1) из микробных клеток выделяются иммунологически активные субстанции – изолированные антигены; 2) они менее реактогенны; 3) стабильны и лучше подвергаются стандартизации, что дает возможность более точной дозировки; 4) вводятся в больших дозах и в виде ассоциированных препаратов.

Анатоксины – препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов, полностью лишенные токсических свойств, но сохранившие антигенные и иммуногенные свойства.

Для приготовления анатоксинов культуры бактерий, продуцирующих экзотоксины, выращивают в жидких питательных средах для накопления яда, а затем фильтруют через бактериальные фильтры для удаления микробных тел. К фильтрату добавляют 0,3-0,4% раствора формалина и помещают в термостат при температуре 37-40 С на 3-4 недели до полного исчезновения токсических свойств. Полученный анатоксин проверяют на стерильность, безвредность и иммуногенность.

Такие препараты получили название нативных анатоксинов, так как они содержат большое количество веществ питательной среды, которые являются балластными и могут способствовать развитию нежелательных реакций организма при введении препарата. Поэтому в настоящее время применяются преимущественно очищенные анатоксины, для чего нативные анатоксины подвергают обработке различными физическими и химическими методами, чтобы

освободить от всех балластных веществ и сконцентрировать препарат в меньшем объеме. Однако уменьшение размеров частиц анатоксина вызвало необходимость адсорбировать препарат на адьювантах. Таким образом, применяющиеся анатоксины являются адсорбированными высокоочищенными концентрированными препаратами. Специфическую активность анатоксина определяют в реакции флоккуляции, в так называемых единицах флоккуляции, или в реакции связывания анатоксинов, выражающейся в единицах связывания (ЕС).

Анатоксины применяются для профилактики и, реже лечения токсинемических инфекций (дифтерия, газовая гангрена, ботулизм, столбняк). Анатоксины выпускаются в виде монопрепаратов и в составе ассоциированных вакцин, предназначенных для иммунизации против нескольких заболеваний.

Сыворотки

Для специфического лечения и экстренной специфической профилактики ряда инфекционных болезней применяют сыворотки искусственно иммунизированных животных (в основном лошадей). В качестве лечебно – профилактических сывороток используют и сыворотки крови людей, переболевших инфекционным заболеванием или иммунизированных соответствующими вакцинными препаратами.

Иммунные сыворотки применяют также в лабораториях с диагностическими целями при идентификации выделенных микроорганизмов

Преимущество лечебных сывороток перед вакцинными препаратами заключается в быстроте создаваемого пассивного иммунитета. Введенные иммуноглобулины способны немедленно нейтрализовать патогенные микроорганизмы и токсические продукты их жизнедеятельности. Однако гетерогенные сыворотки (т.е. чужеродные) сыворотки обладают недостатком – обусловленный ими иммунитет кратковременен. Быстрое выведение (через 1-2 недели) иммуноглобулинов из организма связано с естественным процессом распада белков и действием образовавшихся антител к введенным белкам – иммуноглобулинам.

По своей направленности и особенности действия лечебные сыворотки можно разделить на антитоксические, антибактериальные

и антивирусные, гетерогенные (сыворотки или иммуноглобулины) и гомологичные (получаемые из крови человека).

Антитоксические сыворотки (противодифтерийная, противостолбнячная, противоботулиническая, противогангренозная) получают иммунизацией лошадей возрастающими дозами анатоксинов, а затем и соответствующими токсинами.

Антибактериальные сыворотки получают гипериммунизацией лошадей соответствующими убитыми бактериями; они содержат антитела с агглютинирующими, литическими и опсонизирующими свойствами. Антибактериальные сыворотки относятся к нетитруемым препаратам, так как общепринятой единицы измерения их лечебного действия не существует. Эффективность таких сывороток мала, поэтому широкого применения они не нашли.

Для очистки и концентрации антибактериальных сывороток и некоторых антивирусных используют метод, основанный на разделении белковых фракций нативных сывороток и выделении активных иммуноглобулинов этиловым спиртом при низкой температуре (метод водно – спиртового осаждения на холоду).

Антивирусные сыворотки также получают из сыворотки крови животных, иммунизированных вакцинными штаммами вирусов или соответствующими вирусами. Выпускают антивирусные сыворотки, очищенные методом водно – спиртового осаждения. Иммуноглобулины (гомологичные), получаемые из крови человека, готовят двух видов – противокоревой (или нормальной) и иммуноглобулины направленного действия. Преимущество этих иммуноглобулинов перед гетерогенными в том, что они практически нереакторны и циркулируют в организме более продолжительное время.

Противокоревой (или нормальный) иммуноглобулин получают из донорской, плацентарной или абортной крови, которая содержит антитела против вируса кори, а также против вирусов гриппа, гепатита, полиомиелита и некоторых других вирусных и бактериальных инфекций.

Иммуноглобулины направленного действия готовят из сыворотки крови добровольцев, подвергшихся специальной иммунизации против определенной инфекции. Такие препараты содержат повышенные концентрации специфических антител и используются с лечебной целью.

Применение гомологичных иммуноглобулинов предпочтительнее, так как они, как правило, не вызывают побочных реакций. При введении гетерогенных сывороток могут наблюдаться реакции в виде анафилактического шока или сывороточной болезни.

Определение титра анитоксической сыворотки

Определение титра анитоксической сыворотки проводят при помощи реакции флоккуляции. В этой реакции в качестве антигена участвует анатоксин и антитела – анитоксическая сыворотка. Механизм реакции флоккуляции аналогичен механизму реакции агглютинации и преципитации, однако эта реакция имеет то преимущество, что позволяет произвести количественное определение реагирующих компонентов. Начальная, или так называемая инициальная флоккуляция происходит при строгом количественном соответствии антигена и антитела. Для проведения этого исследования необходимо иметь:

а. Дифтерийный анатоксин в 1 мл содержится 60 If флоккулирующих единиц.

б. Исследуемая противодифтерийная сыворотка. Разведение 1:10. в ряд пробирок наливают по 2 мл этого анатоксина и исследуемую противодифтерийную сыворотку в количествах 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и т.д. Если сыворотки имеют высокий титр, их предварительно следует развести. Штативы с пробирками помещают в водяную баню при температуре 40°C. Через 2-10 мин в одной из пробирок, в которой количество анатоксина строго соответствует количеству анитоксина, произойдет флоккуляция – появится опалесценция, переходящая в помутнение.

Таблица. Схема постановки реакции.

Номера пробирок	1	2	3	4
Количество анатоксической сыворотки	0,1	0,2	0,3	0,4
Содержание МЕ				
Анатоксин	2,0	2,0	2,0	2,0
Результат				

Через несколько минут флоккуляция может появиться и в соседних пробирках, поэтому очень важно уловить инициальную – начальную флоккуляцию. Зная титр анатоксина 60 If, определяют

титр антитоксической сыворотки. Полученные результаты титрования анатоксина следует записать в таблицу.

Пример расчета: титр анатоксина 60 lf. Реакция флоккуляции произошла во второй пробирке, содержащей 0,2 мл сыворотки. В 1 мл исследуемой сыворотки содержалось:

1) 1мл дифтерийного анатоксина – 60 lf

2 мл дифтерийного анатоксина – 120 lf

2) 0,2 мл сыворотки – 120 МЕ

1 мл сыворотки – 600 МЕ

Разведение сыворотки 1:10

Значит, в неразделенной сыворотке содержится:

$600 \text{ МЕ} \cdot 10 = 6000 \text{ МЕ}$

Задание №2

Просмотрите образцы различных иммунных сывороток, разобрать способы их приготовления, очистки и концентрации, титрования и применения.

Демонстрируются: а) антитоксические сыворотки: противодифтерийная, противостолбнячная; б) антимикробные – гамма-глобулины: противокоревой, противогриппозный и др. Студентам следует ознакомиться с наставлениями по их применению.

Определение активности анатоксина

Активность анатоксина определяют по его способности реагировать со специфической антитоксической сывороткой. Для этой цели применяют реакцию флоккуляции: при смешивании токсина или анатоксина в определенных соотношениях с антитоксической сывороткой (антитоксином) образуется помутнение, а затем выпадает рыхлый осадок (флоккулят). В зоне эквивалентности, т.е. при строгом соответствии количества сыворотки и антигена реакция флоккуляции наступает раньше (так называемая начальная флоккуляция).

Схема постановки реакции флоккуляции

Ингредиенты, мл	Пробирки				
	1	2	3	4	5
Дифтерийный анатоксин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Антитоксическая	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24

сыворотка, титр....					
Водяная баня 40-45*с 45 мин					
Результат					
Титр анатоксина					

Эта реакция применяется и для титрования противодифтерийной сыворотки.

Контрольные вопросы:

1. Понятие о генотипической и фенотипической изменчивости микроорганизмов
2. Плазмиды и их роль в генетике микроорганизмов
3. Что такое конъюгация, трансдукция и трансформация?
4. Практическое значение учения о генетике микроорганизмов и генная инженерия в медицинской микробиологии
5. Понятие о медицинских биологических препаратах
6. Вакцины
7. Живые вакцины
8. Убитые вакцины
9. Химические вакцины
10. Анатоксины
11. Общие представления о сыворотках
12. Антитоксические сыворотки
13. Антибактериальные сыворотки

Иновационные методы, применяемые на занятии:

Тренинг «Бумеранг»

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается своё задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов высказывает своё мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

- 1.Виды мутаций
- 2.Нативные анатоксины
- 3.Фенотипическая изменчивость

Задание для 2-ой группы

- 1.Живые вакцины
- 2.Очищенные анатоксины
- 3.Генотипическая изменчивость

Задание для 3-ой группы

- 1.Убитые вакцины
- 2.Получение анатоксинов
- 3.Генетические рекомбинации

Задание для 4-ой группы

- 1.Химические вакцины
- 2.Конъюгация
- 3.Сыворотки

Задание для 5-ой группы

- 1.Применение сывороток
- 2.Способы приготовления вакцин
- 3.Трансдукция

Задание для 6-ой группы

- 1.Очистка иммунных сывороток
- 2.Химические вакцины
- 3.Факторы способствующие изменчивости

«Вертушка»

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют

ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Препараты для создания искусственного активного иммунитета	Краткая характеристика. Получение и применение.
1	Живые вакцины	
2	Убитые вакцины	
3	Химические вакцины	
4	Нативные анатоксины	
5	Очищенные анатоксины	
6	Антитоксические сыворотки	
7	Антимикробные сыворотки	
8	Комбинированные препараты	

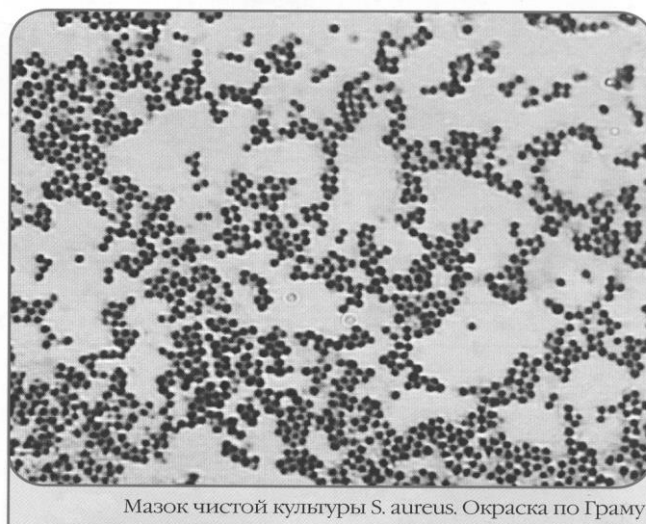
ГЛАВА 10. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ (СТАФИЛОКОККИ И СТРЕПТОКОККИ) И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОККИ (МЕНИНГОКОККИ И ГОНОКОККИ).

10.1 Патогенные кокки

Патогенные кокки относятся к трем семействам: Micrococcaceae, Streptococcaceae и Neisseriaceae, включающим патогенные, условно-патогенные и сапрофитические формы.

Стафилококки

Стафилококки вызывают различные по своим проявлениям гнойно-воспалительные процессы, обладая способностью поражать любой орган и любую ткань. Ста-



филококковые инфекции занимают одно из первых мест среди бактериальных инфекций, что связано с развитием у возбудителей устойчивости к антибиотикам. Значительна роль **Рисунок 25.**

стафилококков в возникновении внутрибольничных инфекций, гнойных поражений у новорожденных и матерей в родовспомогательных учреждениях.

Таксономия. Стафилококки относятся к семейству Micrococcaceae, роду *Staphylococcus*. Различают три вида: *Staphylococcus aureus*, считающийся патогенным представителем, *Staphylococcus epidermidis*, также способный вызывать заболевания, и *Staphylococcus saprophyticus*, относящийся к сапрофитам.

Морфология и тинкториальные свойства. Стафилококки имеют шаровидную форму от 0,6 до 1 мкм в диаметре. В чистой культуре располагаются в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда (рис.25). В мазках из гноя встречаются одиночные кокки, иногда диплококки и небольшие скопления. Стафилококки неподвижны, не образуют капсул и спор. По Граму окрашиваются положительно.

Культивирование и ферментативные свойства. Стафилококки относятся к факультативным анаэробам, нетребовательны к питательным средам. На мясо-пептонном бульоне дают диффузный рост, на плотных средах образуют колонии диаметром 2—3 мм, круглые, с ровными краями, слегка выпуклые. Цвет колоний различен в зависимости от образуемого пигмента: золотистый, лимонно-желтый, палевый.

При выделении стафилококков из исследуемого материала, содержащего различные микроорганизмы, используются элективные среды: молочно-солевой агар, желточно-солевой агар Чистовича. Повышенные концентрации хлорида натрия (5—10%), не мешая росту стафилококков, подавляют размножение сопутствующей флоры.

Стафилококки обладают значительной биохимической активностью: расщепляют глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, маннит с образованием кислоты. Ферментация маннита в анаэробных условиях характеризует вид *Staph.aureus*. Протеолитическая активность стафилококков проявляется в способности выделять сероводород при разложении белков и

разжижать желатину в течение 4—5 сут. в виде воронки по ходу укола.

Стафилококки выделяют ряд ферментов, характеризующих их патогенные свойства: лецитовителлазу, плазмокоагулазу, гиалуронидазу, фибринолизин, нуклеазу.

Токсинообразование. Патогенные стафилококки выделяют экзотоксины, обладающие различными свойствами: гемолизины (обнаруживаемые по способности стафилококков давать зоны гемолиза при росте на кровяном агаре); лейкоцидины, разрушающие лейкоциты; эксфолиатин, обуславливающий развитие пузырчатки новорожденных; энтеротоксины, вызывающие пищевые интоксикации.

Резистентность. Стафилококки довольно устойчивы к действию физических и химических факторов: нагревание до 70—80°C выдерживают в течение часа; 5% раствор фенола убивает их за 15—30 мин; чувствительны к некоторым анилиновым красителям (например, к бриллиантовому зеленому).

Патогенность для животных. К стафилококкам наиболее чувствительны кролики. Внутрикожное введение исследуемой культуры приводит к некрозу (дермонекротическая проба). Внутривенное введение вызывает гибель кроликов (летальное действие токсина). Для обнаружения энтеротоксина стафилококков при пищевых отравлениях используют котят, у которых через полчаса после перорального введения культуры наблюдаются симптомы гастроэнтерита.

Патогенез и клиника. Входными воротами для стафилококков являются любые повреждения кожных покровов, слизистых оболочек рта, верхних дыхательных путей, мочеполовой системы и др. Стафилококки вызывают гнойные поражения кожи и слизистых оболочек: пиодермии, фурункулы, панариции, гидрадениты, флегмоны, абсцессы, ангины, циститы и т. д. В последние годы отмечаются стафилококковые пневмонии среди новорожденных, а также менингиты. Распространяясь из местных гнойно-воспалительных очагов, стафилококки могут вызывать сепсис, септикопиемию. Инкубационный период при стафилококковых инфекциях длится от нескольких часов до 3—5 дней.

Заболевания протекают остро, но могут принимать и хроническое течение.

Иммунитет. После перенесенной стафилококковой инфекции непродолжительный; нередко наблюдаются повторные заболевания, протекающие как рецидив или результат реинфекции.

Лабораторная диагностика. В зависимости от клинической формы инфекции материалом для исследования служат гной, отделяемое зева и носоглотки, мокрота, спинномозговая жидкость, при подозрении на кровь.

Гной, отделяемое ран, мокроту и другой подобный материал для выделения чистой культуры засевают на элективные среды (молочно-солевой агар) и кровяной агар. Кровь (10—15 мл) засевают в колбы с сахарным мясо-пептонным бульоном.

При идентификации патогенных стафилококков определяются гемолитические свойства (наличие зоны гемолиза вокруг колонии на кровяном агаре), способность коагулировать плазму и выделять лецитовителлазу (обнаруживается при росте на желточно-солевом агаре).

Обязательным является определение антибиотикограммы. Для выявления источника инфекции и установления эпидемиологических связей при так называемых госпитальных стафилококковых инфекциях, при пищевых токсикоинфекциях проводится фаготипирование штаммов стафилококков, выделенных при вспышке.

Эпидемиология. Источником стафилококковых инфекций является больной человек или здоровый носитель. Пути передачи стафилококковых инфекций являются воздушно-капельный, воздушно-пылевой, контактный, пищевой.

Восприимчивость к инфекции зависит от общего состояния организма и возраста. Наиболее восприимчивы дети, особенно новорожденные и грудного возраста.

Специфическое лечение и профилактика. Специфическое (этиотропное) лечение проводится антибиотиками широкого спектра действия, используются полусинтетические пенициллины (метициллин, оксациллин), цефпорины с обязательным учетом антибиотикограммы. Для лечения больных сепсисом и особенно новорожденных рекомендуются антистафилококковая гомологичная плазма и иммуноглобулин. При хронических формах вводят стафилококковый анатоксин, применяют вакцинотерапию, чаще — аутовакцину.

Специфическая профилактика не проводится.

10.2 Стрептококки

Таксономия. Стрептококки относятся к семейству Streptococcaceae, роду Streptococcus, включающему патогенные виды: Streptococcus pyogenes и Streptococcus pneumoniae.

Str. pyogenes вызывают местные гнойные процессы, ангину, хронические тонзиллиты, фарингиты, остеомиелиты и, проникая внутрь организма,— сепсис, септикопиемию. Они являются возбудителями рожи — гнойного воспаления лимфатических путей кожи или слизистых оболочек и скарлатины — детского инфекционного заболевания. Значительна роль стрептококков в развитии таких хронических заболеваний, как ревматизм, эндокардит, нефрит.

Морфология и тинкториальные свойства. Str. pyogenes представляет собой цепочки круглых или слегка овальных кокков, имеющих диаметр от 0,6 до 1 мкм. (рис.27) Спор и жгутиков не образует, патогенные штаммы имеют капсулу, по Граму окрашиваются положительно.

Культивирование и ферментативные свойства. Стрептококки являются факультативными анаэробами и аэробами. На кровяном агаре образуют мелкие полупрозрачные колонии. В зависимости от способности разрушать эритроциты стрептококки делятся на три группы: тип β — гемолитические (вызывают лизис эритроцитов и образуют зону гемолиза вокруг колонии), тип α — зеленящие (не полностью разрушают эритроциты, образуют зеленоватые зоны вокруг колоний) и тип γ — негемолитические (не изменяют кровяного агара). Наиболее патогенными для человека являются стрептококки типа β .

На сахарном мясо-пептонном бульоне стрептококки растут пристеночно и придонно в виде мелкокрошковатого осадка. Среда остается прозрачной. Стрептококки обладают сахаролитическими свойствами, разлагают с образованием кислоты лактозу, сахарозу, глюкозу.

Антигенная структура и токсинообразование. Стрептококки имеют поверхностно расположенный полисахарид (субстанция С), являющийся гаптеном, различная структура которого дала возможность Ленсфилд разделить стрептококки на 17 серологических групп (от А до 5). Определение принадлежности к серогруппе проводится с помощью групповых иммунных

сывороток в реакции преципитации с гаптеном из исследуемых культур. Наличие белковых антигенов (Т и М), также отличающихся большим разнообразием, позволило выделить и серологические варианты. М-антиген является строго специфическим, обуславливает вирулентность стрептококков и подавляет фагоцитарную активность лейкоцитов. Этот антиген также устанавливается в реакции преципитации. При определении сероваров с помощью реакции агглютинации обнаруживают Т-антиген, который может быть общим у разных сероваров. Патогенные для человека стрептококки включают 53 серовара (49 относятся к группе А).

Стрептококки выделяют экзотоксины, обуславливающие общую интоксикацию и специфическое действие: так, эритрогенин (при скарлатине) вызывает расширение мелких сосудов кожи и слизистой оболочки зева, развитие сыпи, стрептолизин-О обладает гемолитическими свойствами и оказывает повреждающее действие на ткани (главным образом сердца), лейкоцидин разрушает лейкоциты. Ферменты, продуцируемые стрептококками (гиалуронидаза, стрептокиназа, дезоксирибонуклеаза, протеиназа), являются ферментами агрессии, облегчают проникновение и распространение микробов в тканях.

Резистентность. К действию физических факторов стрептококки относительно устойчивы. Нагревание при 60 °С выдерживают в течение 30 мин. Хорошо переносят высушивание и могут месяцами сохранять жизнеспособность в высохшем гное, мокроте. Под действием дезинфицирующих веществ погибают в течение 15 мин.

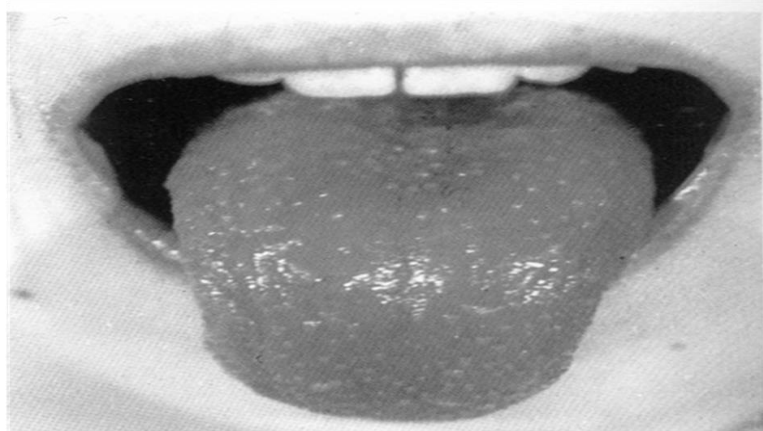
Патогенность для животных. Чувствительны к стрептококкам кролики. В зависимости от вирулентности культуры, от метода введения у животных развивается местный воспалительный процесс или сепсис.

Патогенез и клиника. Патогенные для человека стрептококки группы А вызывают разнообразные заболевания, отличающиеся по патогенезу и клиническому течению. Стрептококки, так же как и стафилококки, могут поражать любую ткань, любой орган.

Входными воротами инфекции являются миндалины, лимфоидная ткань верхних дыхательных путей, поврежденная кожа. Развитие процесса в значительной степени зависит от состояния макроорганизма и от преобладающей роли одного из трех

основных синдромов патогенеза: инфекционного, токсического и аллергического.

Инфекционный синдром связан с размножением стрептококков, которые в месте проникновения вызывают катаральное воспаление, переходящее в гнойное и некротическое. Благодаря выделяемым ферментам они могут легко распространяться из очага в окружающие ткани, а затем и в кровь, приводя к генерализации процесса. Выделяемые стрептококками экзотоксины всасываются в кровь и вызывают интоксикацию. Аллергическое состояние при стрептококковых инфекциях обусловлено аллергизирующим действием протеиновых антигенов, приводящим к развитию хронических процессов— ревматизма, пиелонефрита, коллагенозов и др. Инкубационный период при острых стрептококковых инфекциях — от нескольких часов до 4—5 дней. Клинические проявления разнообразны.



Скарлатина. Малиновый язык

Скарлатина — острое детское инфекционное заболевание, характеризующееся общей интоксикацией, ангиной и развитием мелкоточечной сыпи с последующим шелушением (рис.26).

Вызывать скарлатину может любой стрептококк группы А, обладающий способностью выделять эритрогенный токсин.

Источником инфекции является больной скарлатиной; основной путь передачи воздушно-капельный. После инкубационного периода (1—6 дней) заболевание начинается остро: повышается температура, возникает ангина, как результат общей интоксикации возможна рвота. Сыпь может появиться в конце первого дня заболевания или на 2-й день с характерной локализацией сначала на коже шеи, верхней части туловища, затем по всему телу. Высыпание происходит в течение 3 дней, затем наблюдаются побледнение сыпи и шелушение.

В настоящее время течение скарлатины в 80—90% случаев бывает легким: редко наблюдаются осложнения (отиты, гломерулонефриты, лимфадениты и др.).

Иммунитет. После перенесенных стрептококковых инфекций остается антибактериальный иммунитет, отличающийся нестойкостью и непродолжительностью. Антитоксический иммунитет возникает после перенесенной скарлатины и при достаточной напряженности повторное заболевание скарлатиной не возникает. Стрептококки вызывают сенсibilизацию организма, что способствует развитию хронических стрептококковых инфекций.

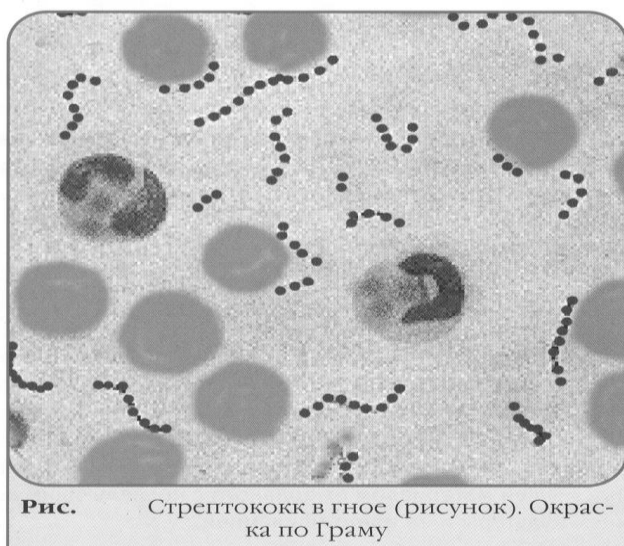


Рис. Стрептококк в гное (рисунок). Окраска по Граму

Лабораторная диагностика.

Материалом для исследования служат слизь с миндалин, гной, экссудат, моча, кровь. Основным методом диагностики стрептококковых инфекций является выделение чистой культуры стрептококков. Исследуемый материал, кроме крови, засевают в чашки Петри с 3% кровяным агаром. Кровь

(5—7 мл) вносят в колбы с сахарным мясо-пептонным бульоном и выдерживают в термостате более месяца, делая каждые 3 дня высева на кровяной агар. Наличие характерного вида колоний и грамположительных цепочек кокков в приготовленном мазке дает возможность сделать вывод об обнаружении стрептококка. Выделенная культура стрептококка при решении эпидемиологических задач идентифицируется по антигенным свойствам: определяют серологическую группу и серологический вариант. При некоторых стрептококковых инфекциях проводится диагностическое исследование сывороток больных с целью обнаружения антител к стрептолизину-О, гиалуронидазе.

Эпидемиология. Источником инфекции при стрептококковых заболеваниях является только человек — больной или носитель патогенных стрептококков. Основной путь передачи воздушно-капельный; возможна передача через предметы, загрязненные больным, а также через третьих лиц, соприкасавшихся с больным. Восприимчивость к стрептококковым инфекциям всеобщая, к скарлатине — зависит от возраста и степени напряженности антитоксического иммунитета. Наличие антитоксического иммунитета определяется реакцией Дика. С этой целью детям

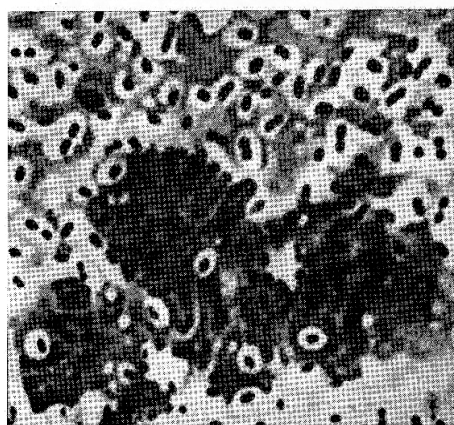
строго внутривенно на предплечье вводят скарлатинозный (эритрогенный) токсин в дозе 0,1 мл. При отсутствии иммунитета в месте введения образуется эритема размером от 20—30 мм.

Заболеемость характеризуется сезонностью — большинство случаев приходится на осенне-зимний период, что объясняется погодными условиями и скученностью людей в помещениях (особенно детей в школах, детских садах).

Специфическое лечение и профилактика. Лечение стрептококковых инфекций проводится препаратами группы пенициллина благодаря сохранившейся чувствительности к этому антибиотику и высокой активности его в отношении стрептококка. Другие антибиотики применяются в случае непереносимости пенициллина.

Специфическая профилактика не разработана, поэтому все профилактические мероприятия направлены на выявление и изоляцию источника инфекции (особенно при скарлатине).

Str. pneumoniae (пневмококки) являются возбудителями специфической крупозной пневмонии, ползучей язвы роговицы, а также могут вызывать гнойные заболевания — отит, бронхит, бронхопневмонии, менингит, ринит, сепсис. **Морфология и тинкториальные свойства.** Пневмококки являются грамположительными диплококками (размером 0,5—1,5 мкм), имеют несколько удлинённую форму, причем стороны, обращенные друг к другу, плоские, а концы заостренные. Такой внешний вид пневмококков напоминает ланцет, поэтому их называют еще ланцетовидными диплококками. Нередко в мазках



можно увидеть цепочки, состоящие из нескольких диплококков. Спор, жгутиков не имеют. Характерным свойством является капсулообразование: капсула окружает оба кокка или цепочку кокков, обнаруживается в мазках из патологического материала, в отпечатках органов и утрачивается пневмококками при культивировании

в лабораторных условиях (рис.28).

Культивирование и ферментативные свойства. Пневмококки размножаются в аэробных условиях на средах, содержащих

сыворотку или кровь. В жидкой среде пневмококк дает диффузный рост с небольшим

осадком, на кровяном агаре образует мелкие нежные колонии, напоминающие рост стрептококков типа а. Пневмококки также не полностью разрушают гемоглобин, а превращают его в метгемоглобин, который обуславливает зеленоватую зону вокруг колоний. Пневмококки обладают сахаролитическими свойствами. Дифференциально-диагностическое значение имеет способность пневмококков разлагать инулин.

Антигенная структура и токсинообразование. В капсулах пневмококков содержатся полисахариды, отличающиеся большим разнообразием химической структуры, что и обуславливает разделение на серологические типы. В настоящее время определено около 80 типов пневмококков. Патогенными для человека являются I, II и III типы. Пневмококки экзотоксина не образуют, их вирулентность связана с эндотоксином.

Резистентность. Попадая во внешнюю среду с мокротой, пневмококки могут в течение 2 мес сохранять жизнеспособность, так как засохшая слизь защищает их от действия солнечных лучей. Однако нагревание до 55 °С и дезинфицирующие вещества убивают пневмококки в течение нескольких минут. При дифференциации пневмококков от зеленающих стрептококков используется высокая чувствительность пневмококков к желчи и оптохину.

Патогенность для животных. К пневмококкам чрезвычайно чувствительны белые мыши. При введении патологического материала или культуры пневмококков уже через 6 ч. в мазках-отпечатках из органов забитых мышей можно обнаружить пневмококки, окруженные капсулой. Естественная гибель мышей наступает в течение суток от септицемии.

Патогенез и клиника. Пневмококки, вызывающие воспаление легких, могут попадать в дыхательные пути из окружающей среды. Часто пневмония возникает как результат аутоинфекции при понижении сопротивляемости организма. В настоящее время только 20% всех случаев пневмоний этиологически связаны с пневмококком, чаще выявляются стафилококки, *Klebsiella pneumoniae*, кишечная палочка; возможны и смешанные инфекции. Пневмония начинается остро, с подъемом температуры, ознобом.

Заболевание может сопровождаться септициемией, осложняться абсцессом легких.

Иммунитет. Особенность течения пневмококковых пневмоний такова, что они не только не оставляют постинфекционного иммунитета, но вызывают сенсibilизацию организма — повышенную чувствительность, что обуславливает повторные неоднократные заболевания.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служит мокрота больного пневмонией, при других поражениях — гной, кровь, спинномозговая жидкость. Основным методом диагностики является выделение чистой культуры возбудителя путем заражения белых мышей. Обнаружение в мазках-отпечатках пневмококков в капсулах, наличие характерных колоний на кровяном агаре при высеве крови погибших мышей достаточно для положительного ответа.

Эпидемиология. Источником инфекции является больной пневмонией. Механизм передачи воздушно-капельный. Однако следует помнить о возможности аутоинфекции. Заболевания носят спорадический характер, но при большой скученности людей могут быть и эпидемические вспышки. В осенне-зимний период заболеваемость повышается.

Специфическое лечение и профилактика. Для лечения пневмоний рекомендуются антибиотики широкого спектра действия, так как часто этиология их не определяется.

Специфическая профилактика не проводится.

10.3 Менингококки

Менингококки вызывают менингококковую инфекцию. Под этим названием в настоящее время регистрируют клинические формы, различающиеся по проявлению и тяжести заболевания: эпидемический цереброспинальный менингит, менингококкемия, острый назофарингит и др.

Таксономия. Менингококки *Neisseria meningitidis* принадлежат к семейству *Nisseriaceae*, роду *Neisseria*. На слизистой оболочке носоглотки обнаруживаются непатогенные представители рода *Neisseria* (*N. catarrhalis*, *N. sicca*), дифференциация которых от *N. meningitidis* представляет трудности.

Морфология и тинкториальные свойства. Менингококки относятся к диплококкам, имеют овальную форму, напоминая кофейные зерна, вогнутой поверхностью обращенные друг к другу,

размером от 0,8 до 1 мкм. Они неподвижны, спор не образуют, в мазках из патологического материала выявляется нежная капсула, граммотрицательны.

Культивирование и ферментативные свойства. Менингококки выращиваются в аэробных условиях, на средах, содержащих нативный белок животного или человеческого происхождения. На плотной среде (сывороточный агар, кровяной агар и др.) менингококки образуют мелкие прозрачные колонии с ровными краями, вязкой консистенции. Они очень требовательны к условиям культивирования: температурный оптимум 37°C (повышение до 39°C вызывает гибель).

Менингококки ферментируют с образованием кислых продуктов только глюкозу и мальтозу, что служит дифференциально-диагностическим признаком.

Антигенная структура и токсинообразование. Менингококки содержат протеиновый антиген, общий для всего вида, и полисахарид, различная структура которого дала возможность разделить кокки на серологические типы, обозначаемые также как серологические группы: А, В, С, D, (Х, Y, Z, N -редко встречающиеся). Токсическое воздействие менингококков связано с эндотоксином.

Резистентность. Менингококки относятся к числу очень нестойких микроорганизмов. Повышение температуры до 39°C задерживает размножение кокков, а до 50°C — вызывает гибель в течение 5 мин. Понижение температуры до 22°C и ниже также губительно. При высушивании менингококки погибают в течение нескольких часов.

Дезинфицирующие вещества уничтожают менингококки почти моментально.

Патогенность для животных. В естественных условиях менингококковыми инфекциями болеет только человек. У белых мышей можно вызвать интоксикацию при подкожном введении.

Патогенез и клиника. Входными воротами для менингококков служат слизистые оболочки носоглотки, размножаясь на которых, кокки вызывают местное катаральное воспаление. Затем гематогенным путем распространяются по организму, вызывая менингококкемию, менингит или другую форму. Основные симптомы менингита связаны со специфическим поражением мозговых оболочек и развитием общей интоксикации (действие

эндотоксина). Инкубационный период в среднем длится 5—7 дней. Начало заболевания внезапное: быстрый подъем температуры, озноб, сильная головная боль, рвота. Затем появляются менингеальные симптомы.

Иммунитет. После перенесенного заболевания стойкий, однако только типоспецифический, поэтому возможность повторной инфекции не исключена.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат спинномозговая жидкость, кровь и носоглоточная слизь. Весь исследуемый материал доставляют в лаборатории как можно быстрее, тщательно предохраняя от охлаждения. Спинномозговую жидкость центрифугируют, из осадка готовят мазок, окрашивают метиленовым синим или по Граму. Обнаружение типичных диплококков, находящихся как в лейкоцитах, так и вне, достаточно для положительного ответа. В надосадочной прозрачной жидкости в реакции преципитации обнаруживается менингококковый антиген. В качестве селективной среды (при исследовании слизи из носоглотки) применяется среда с ристомисином — антибиотиком, подавляющим рост сопутствующей флоры, затем проводится идентификация подозрительных колоний.

Эпидемиология. При менингококковых заболеваниях источником инфекции является только человек—больной или носитель менингококков (как переболевший, так и здоровый). Основной путь передачи воздушно-капельный. Восприимчивость к менингококку всеобщая: большинство заразившихся переносят бессимптомное заболевание или легкие формы (назофарингит) и остаются носителями, меньшая часть — клинически выраженную менингококковую инфекцию. Заражению способствует скученность людей в закрытых помещениях (общежития, казармы, школы и т. п.). Для менингококковой инфекции характерна сезонность, — чаще заболевания регистрируются в зимне-весенний период.

Специфическое лечение и профилактика. Наиболее эффективным специфическим средством лечения является пенициллин, введение которого в массивных дозах уже в течение нескольких часов вызывает

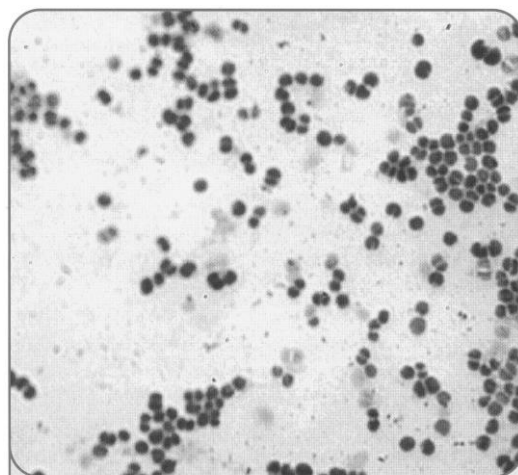


Рис. Чистая культура *N. gonorrhoeae*. Окраска по Граму

улучшение состояния больного и при правильном применении приводит к полному выздоровлению. Рекомендуются также полусинтетические пенициллины: ампициллин, метициллин, оксациллин.

10.4 Гонококки

Гонококки вызывают гонорею — венерическое заболевание человека, выражающееся в гнойном поражении слизистых оболочек мочеполовых органов, и бленнорею—специфическое гнойное воспаление конъюнктивы глаз.

Таксономия. Гонококк *Neisseria gonorrhoeae* относится к семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*.

Морфология и тинкториальные свойства. Гонококки морфологически идентичны менингококкам — диплококки бобовидной формы, размером от 1 до 1,5 мкм, неподвижны, не образуют спор, капсула не обнаруживается (рис.28).

Культивирование и ферментативные свойства. Гонококки очень чувствительны к питательным средам: их культивирование проводится при

добавлении нативного человеческого белка — крови, сыворотки или асцитической жидкости. Среда должны быть свежеприготовленными, с сохраненной влажностью. Строго выдерживается температурный режим 36—37°C; при повышении до 39°C наблюдается гибель гонококков. Гонококки дают мелкие колонии до 1—2мм в диаметре, круглые, прозрачные. Биохимически гонококки малоактивны — разлагают только глюкозу.

Антигенная структура и токсинообразование. В антигенном отношении гонококки неоднородны; различают несколько серологических вариантов, однако практического значения это деление не имеет. Гонококки содержат эндотоксин, который обуславливает общую интоксикацию.

Резистентность. Гонококки малоустойчивы в окружающей среде вне человеческого организма. Повышение температуры до 40°C приводит к отмиранию кокков, а нагревание до 60°C вызывает гибель в течение получаса. Гонококки очень чувствительны к высушиванию. Дезинфицирующие вещества убивают их быстро; особенно чувствительны гонококки к нитрату серебра, который губит

их уже в разведении 1 : 1000. Этот антисептик используется для обработки конъюнктивы глаз новорожденных с целью профилактики бленнореи.

Патогенность для животных. В естественных условиях животные гонореей не болеют. У лабораторных животных вызывают гоносептицемию внутрибрюшинным введением культуры. Эта модель и используется для экспериментального исследования новых лекарственных препаратов против гонококков.

Патогенез и клиника. Входными воротами для гонококков служит цилиндрический эпителий уретры, шейки матки, конъюнктивы глаз. От места внедрения гонококки распространяются по слизистой оболочке, вызывая гнойное воспаление. При отсутствии лечения острая форма гонореи переходит в хронический процесс, приводя к образованию рубцов в месте поражения и нарушению функции соответствующего органа. Хроническая гонорея у женщин приводит к бесплодию в результате облитерации маточных труб.

Бленнореей заражаются новорожденные при прохождении через родовые пути матери, больной гонореей. Заболевание опасно: поражение роговицы приводит к слепоте.

Иммунитет. Особенностью иммунитета к гонорее является отсутствие как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Человек, переболевший гонореей, может заболеть вновь в результате реинфекции.

Лабораторная диагностика. При острой форме основным методом исследования является бактериоскопия. Из гноя, взятого из уретры, влагалища, шейки матки, готовят два мазка: один окрашивают метиленовым синим, второй — по Граму. Характерное расположение гонококков внутри лейкоцитов — явление незавершенного фагоцитоза, грамотрицательная окраска их достаточны для положительного ответа. Выделение чистой культуры необходимо в том случае, если гонококки не обнаруживаются микроскопически. При острой гонорее, но уже леченной, резко снижается количество гонококков и меняется их морфология. Для диагностики хронической гонореи используется серологический метод: реакция связывания комплемента (РСК) по Борде — Жангу.

Эпидемиология. Источником инфекции является только человек, больной гонореей. Заражение происходит половым путем в результате прямого контакта, значительно реже — через предметы

домашнего обихода (влажные губки, полотенца), причем таким путем могут заражаться маленькие девочки, у которых поражается многослойный плоский эпителий и развиваются вульвовагиниты. Заболеваемость гонореей связана с социальными условиями: война, безработица, проституция способствуют распространению инфекции.

Специфическое лечение и профилактика. Острая гонорея поддается лечению препаратами пенициллина, стрептомицина, тетрациклинами и сульфаниламидами, раннее применение которых обеспечивает излечение. Хронические формы гонореи и различные осложнения (гонорейные артриты, аднекситы, бартолиниты и др.) плохо поддаются лечению. С целью специфической терапии при хронической форме используется убитая гонококковая вакцина, состоящая из взвеси не менее 12 свежевыделенных штаммов, убитых нагреванием. Вакциноterapia усиливает иммунологическую перестройку организма, активируются фагоцитарные свойства лейкоцитов.

Специфическая профилактика не проводится.

10.5 Определение чувствительности культуры стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков.

Для определения чувствительности культуры стафилококка: наносят при помощи стерильной пипетки на всей поверхности агара культуру. Засеянную чашку делят на части карандашом по дну чашки, соответственно числу антибиотиков; на каждый надписанный сектор стерильным пинцетом помещают бумажный цветной диск, пропитанный определенным антибиотиком. Посевы помещают на сутки в термостат. Результаты учитывают на следующем занятии.

Изучение культурально-биохимических свойств патогенного стафилококка (наличие золотистого пигмента) и реакцию плазмокоагуляции (демонстрация)

Золотистый стафилококк является наиболее частым возбудителем гнойных процессов, генерализованных септических заболеваний, особенно новорожденных и рожениц, тяжелых пищевых отравлений. Этот вид стафилококка продуцирует ряд экзотоксинов, обладающих различными свойствами: гемолизины (дающие зону гемолиза на кровяном агаре); лейкоцидины, разрушающие лейкоциты; эксфолиатин, обуславливающий

развитие пузырчатки новорожденных; энтеротоксины, вызывающие пищевые интоксикации. Ферменты патогенности: плазмокоагулаза, гиалуронидаза, фибринолизин, нуклаза и др. Биохимическая активность: расщепляет глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, манит с образованием кислоты. Ферментация маннита в анаэробных условиях характеризует вид *staph. aureus*. Протеолитическая активность – выделение сероводорода, разжижение желатина. Стрептококки разлагают с образованием кислоты лактозу, сахарозу, глюкозу.

Streptococcus pneumoniae (пневмококки) – обладают сахаролитическими свойствами, на кровяном агаре образуют мелкие с зоной позеленения вокруг колонии рост. Дифференциальное диагностическое значение имеет способность пневмококков разлагать инсулин.

Ознакомление с препаратами для профилактики и лечения (демонстрация).

Специфическое лечение проводится антибиотиками широкого спектра действия, используя полусинтетические пенициллины (метациклин, оксацилин), цефоспорины с обязательным учетом степени чувствительности. Для лечения больных сепсисом, особенно новорожденных, рекомендуется антистафилококковая гомологичная плазма и иммуноглобулин. При хронических формах вводят стафилококковый анатоксин, аутовакцину. Специфическая профилактика не проводится. Лечение стафилококковых инфекций проводится препаратами группы пенициллина. Специфическая профилактика не разработана.

Для лечения пневмоний рекомендуется антибиотики широкого спектра действий. Специфическая профилактика не проводится.

Схема бактериологического диагноза при стафило- и стрептококковых (пневмококковых) инфекциях.

МАТЕРИАЛ	МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ
Гной Мазок зева	из БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ Приготовление мазка, окрашенного по Грамму	Грамположительные кокки
Гной Мазок зева	из БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ 1. Посев на кровяной и желточно – солевой агар	Колонии с гемолизом или без него. Колонии с пигментом.
Кровь	2. Посев на сахарный бульон. Пересев на кровяной агар 1 и 2. Микроскопия мазков из колоний. При выделении стафилококка определение патогенности. а) лецитовителлазная активность б) плазмокоагулаза в) сбраживание манннита Определение чувствительности к антибиотикам	Помутнение Колонии с гемолизом или без него Стафилококки или стрептококки + или – + или – + или – зона отсутствия роста бактерий

Посмотреть и зарисовать готовые демонстрационные препараты-менингококки в спинномозговой жидкости, гонококк в гное (незавершённый фагоцитоз).

Возьмите готовые мазки, установите в иммерсионной системе микроскопа. В первом мазке обратите внимание на окраску (грамотрицательные диплококки), на морфологию (бобовидные парные кокки). Зарисуйте. Во втором мазке рассмотрите крупные овальные клетки лейкоциты, заполненные парными кокками.

Незавершенный фагоцитоз, гонококков очень много, а лейкоциты разрушены.

Зарисуйте в тетрадь.

Изучить и записать схему бактериологического диагноза при менингите и гонорее.

Изучите по таблице схему диагноза при менингите и гонорее. Запишите в тетрадь.

Диагноз менингита. Здесь необходимо выяснить две цели:

1. Поставить диагноз заболевания.
2. Выявить бактерионосителей.

Материалом для исследования служит слизь из зева, спинномозговая жидкость у больного. У больного менингитом спинномозговая жидкость мутная, вытекает струей, у здорового – она прозрачная, вытекает по каплям. Материал микроскопируют. Для получения чистой культуры материал засеивают на асцитический агар. Затем определяют морфологию микробов (гр-диплококки бобовидной формы), биохимические свойства (расщепляют глюкозу, мальтозу), чувствительность к антибиотикам и наиболее сильнодействующий антибиотик вводят в спинномозговой канал.

Диагностика гонореи: при острой гонорее материалом для исследования служит гной из половых органов. В гное обнаруживают огромное количество лейкоцитов, расположенных внеклеточно и внутриклеточно. Фагоцитоз незавершенный.

Знать серологические методы диагностики.

Для диагностики менингита ставят реакцию преципитации, где антигеном является спинномозговая жидкость больного, антитела готовые в ампулах.

При хронической гонорее используют серологические методы диагноза: реакцию связывания комплемента (РСК). У больного берут кровь для обнаружения антител. Антигеном служит культура гонококков, комплемент сыворотка морской свинки, бараньи эритроциты и гемолитическая сыворотка кролика. Появление красного осадка из эритроцитов расценивается как положительная реакция: у больного гонореей (таблица в демонстрации) чистую культуру выделяют на специальном асцитическом агаре. Гонококки разлагают только глюкозу, с образованием кислоты без газа.

Посмотреть цветные слайды по менингиту и гонорее.

- a. Менингококковый менингит
- b. Менингококковая инфекция. Ликвор. Внутриклеточное расположение менингококков.
- c. Ригидность затылочных мышц.
- d. Менингококкоцемия. Некрозы в стадии заживления.
- e. Спинномозговая пункция.
- f. Спинномозговая жидкость. Ликвор прозрачный.
- g. Спинномозговая жидкость. Ликвор мутный (у больного).

Ознакомиться с их лечением и диагностикой:

Рассмотрите и изучите витрину с лечебными и диагностическими препаратами.

ГОНОКОККОВАЯ ВАКЦИНА

Представляет собой взвесь гонококков (свежевыделенные штаммы) в изотоническом растворе хлорида натрия, убитых нагреванием. В 1 мл вакцины содержится 1 млрд. микробных тел. Срок годности 1 год. Вакцину применяют с лечебной целью, вводят в/м или в/к. Терапевтическую дозу вакцины устанавливают индивидуально в зависимости от степени реакции на начальную дозу вакцины (150 – 300 млн. микробных тел).

Для лечения менингита и гонореи применяют: бензилпенициллин, эритромицин, сульфаниламидные препараты.

Контрольные вопросы:

1. Лабораторная диагностика стафилококков
2. Резистентность стрептококков
3. Антигенная структура и токсинообразование менингококков
4. Эпидемиология менингококков
5. Иммунитет стрептококков
6. Тинкториальные свойства пневмококков
7. Иммунитет стафилококков
8. Таксономия стрептококков
9. Резистентность пневмококков
10. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых гонококками.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 9

У больного, поступившего в урологическое отделение с высокой температурой, была взята для исследования моча, засеянная на кровяной агар и в сахарный бульон. Через сутки в посевах на плотную среду выявили небольшие выпуклые колонии с зоной гемолиза, в бульоне появился рост в виде скудного хлопьевидного осадка. Врач-бактериолог сделал вывод о стрептококковой инфекции.

1. Обоснованно ли такое заключение?
2. Какие методы нужно дополнительно использовать?

Ситуационная задача № 10

У больного после чистой плановой операции из отделяемого послеоперационной раны выделена культура стафилококка.

1. Можно ли считать этот микроорганизм возбудителем нагноения осложнившего заживление раны?
2. Как это проверить?
3. Какие препараты нужно использовать для лечения

Ситуационная задача № 11

Бактериолог, обнаружив на чашке с ристомициновым сывороточным агаром характерные для менингококков колонии, отсек одну из них на сывороточный скошенный агар. Пробирки с ним, заготовленные впрок, хранились в теч. недели. Однако, после выдерживания в термостате при 37⁰С, роста на скошенном агаре не оказалось. Почему?

Ситуационная задача № 12

Из зева больного подозрением на эпидемический менингит была выделена культура грамотрицательных диплококков, выросшая на сывороточном агаре при 37⁰С, на бессывороточном агаре при 37⁰С и на сывороточном агаре при комнатной температуре / 22⁰С /.

1. Патогенный менингококк ли это?

2. О каких микробах следует подумать в этом случае?
3. Что предпринять?

Ситуационная задача № 13

Больной обратился к врачу с симптомами острого гнойного уретрита, появившегося через 3 дня после полового акта.

1. Какие микроорганизмы могли вызвать это заболевание?
2. Как доказать этиологию заболевания?

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Виды патогенных кокков	Таксономия патогенных кокков
1	Стафилококки	
2	Стрептококки	
3	Пневмококки	
4	Менингококки	
5	Гонококки	

10.6 Приготовление нативного препарата из посева патологического материала на бульонные и агаровые культуры.

Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №8

Посев гноя на чашки с кровяным агаром.

Возьмите гной в пробирке у преподавателя и петлей засейте на 5% кровяной агар в чашках Петри. Поставьте в термостат на 24 часа при температуре 37 °C. Стафилококки, образуют круглые колонии с золотистым (*st. aureus*), белым (*st. epidermitis*), лимонно – желтым пигментом(*st. saprophyticus*). Наличие золотистого пигмента характеризует патогенный вид стафилококка, и на кровяном агаре вокруг колонии отмечается зона гемолиза. Из части вида колонии готовят мазки, окрашивают по методу Грама. Под микроскопом видны грамположительные кокки, расположенные гроздьями. Оставшуюся часть колоний на кровяном агаре пересевают на косой агар для выделения чистой культуры. Гной, слизь из зева при скарлатине для обнаружения стрептококков также засевают на кровяной агар, на котором вырастут мелкие колонии с зоной гемолиза (*str.pyogenes*) или гемолитический стрептококк, образующий различные токсины и ферменты (фибринолизин, гиалуронидаза, стрептолизин и др.). Еще различают гемолитический стрептококк при росте на кровяном агаре, вызывающий позеленение среды вокруг колоний и, наконец, третий вид – негемолитический стрептококк, который не вызывает изменений кровяного агара. Дальнейшие исследования проводят как для стафилококков.

Помните, что при диагностике пневмококковых заболеваний материал (кровь, мокрота) вводят белой мыши, а затем вскрывают мышь, готовят мазки отпечатки (ланцетовидные, диплококки, грамположительные, в организме образующие капсулу) и высевают на кровяной агар из внутренних органов белой мыши.

ГЛАВА 11. КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ.МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ.ПИЩЕВАЯ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯ: (САЛЬМОНЕЛЛЁЗ, БОТУЛИЗМ).

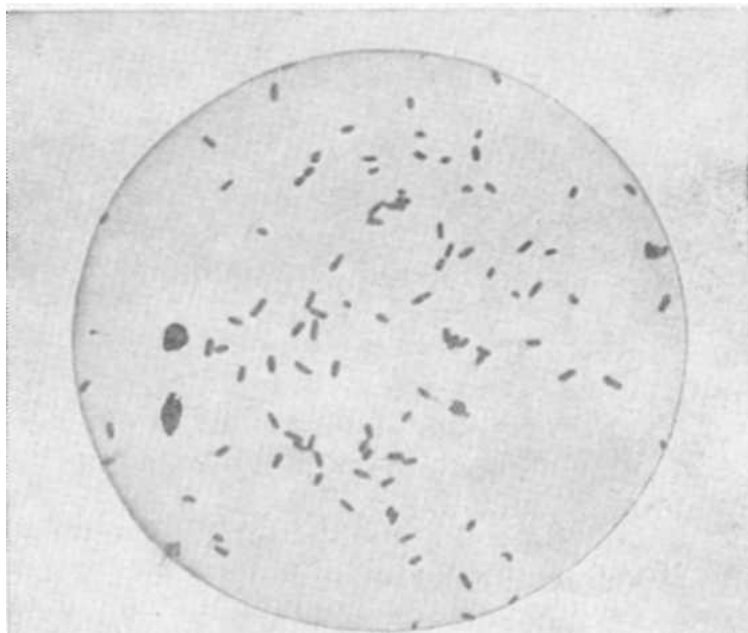
11.1 Возбудители кишечных инфекций

К кишечным бактериальным инфекциям относятся эшерихиозы, брюшной тиф, паратифы, сальмонеллезы, дизентерия и холера. Возбудители этих заболеваний (кроме холеры) составляют семейство Enterobacteriaceae. Среди представителей данного семейства есть монопатогенные виды бактерий, т. е. обладающие патогенностью в отношении определенного вида (человека или животного). Брюшнотифозные и дизентерийные бактерии вызывают заболевание только у человека (антропонозные инфекции), другие представители — только у животных (зоонозные инфекции). В семейство входят большая группа полипатогенных видов, т. е. вызывающих заболевания как у человека, так и у животных, и непатогенные виды, значительная часть которых составляет нормальную микрофлору организма человека и животных.

Предполагают, что все патогенные виды семейства Enterobacteriaceae произошли в процессе эволюции паразитизма от нормального обитателя кишечника — кишечной палочки.(рис.29) В то же время у разных представителей возникли и закрепились свои собственные признаки. Эти различия (и общность обуславливают

большую сложность в идентификации возбудителя при постановке микробиологического диагноза.

Род *Escherichia* (назван в честь немецкого ученого Т. Эшериха) включает большое количество серовариантов эшерихий, ведущих как сапрофитический, так и паразитический образ жизни.



100

Род *Salmonella* (назван в честь американского ученого Д. Сальмона) самый обширный: включает монопатогенные и полипатогенные бактерии, роль в патологии их очень велика.

Род *Shigella* (назван в честь японского исследователя К. Шига), очевидно, произошел от неподвижных форм кишечных палочек, так как составляющие этот род дизентерийные бактерии являются неподвижными.

Общие свойства представителей семейства: локализация бактерий в кишечнике человека и животных; выделение во внешнюю среду с фекалиями; фекально-оральный механизм передачи возбудителей. Морфологические свойства: палочки длиной 0,5—2 мкм, грамотрицательные, некоторые виды имеют капсулы, не образуют спор, подвижны — являются перитрихами (за исключением шигелл). Многие штаммы энтеропатогенных эшерихий, шигеллы и сальмонеллы обладают ресничками, которые, по-видимому сообщают бактериям селективные преимущества в естественных условиях обитания. Культуральные свойства характеризуются тем, что бактерии растут на простых питательных средах. Все бактерии этого семейства являются факультативными анаэробами. Биохимические свойства различны. Наибольшей биохимической активностью обладают наименее патогенные виды семейства, т. е. кишечные палочки. Все представители семейства отличаются сахаролитическими свойствами, причем, если бактерии обладают ярко выраженными сахаролитическими свойствами, то, как правило, они протеолитически малоактивны (не разжижают желатин).

Бактерии имеют соматический О-антиген — липополисахаридно-протеиновый комплекс, располагающийся в стенке клетки. У некоторых видов сальмонелл (тифозных, паратифозных) поверхностнее соматического располагается Vi-антиген полисахаридной природы. У подвижных представителей семейства есть Н-антиген. Таким образом, бактерии кишечного тифозного семейства имеют сложную антигенную структуру, и основным методом дифференциации является изучение антигенных свойств с помощью диагностических сывороток в реакции агглютинации. Некоторые виды семейства имеют оболочечный, поверхностно расположенный К-антиген.

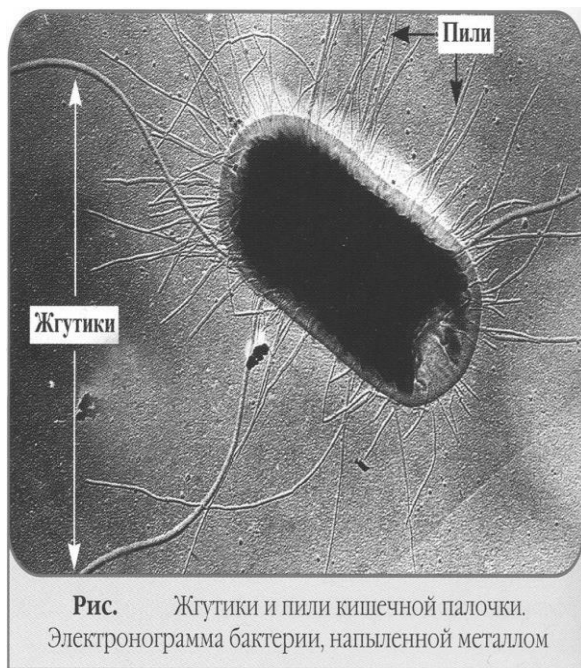
Возбудители кишечных инфекций содержат в основном эндотоксины, которые по своей химической природе и структуре

отличаются строгой специфичностью, но по патофизиологическому действию эндотоксины одинаковы: обладают пирогенным свойством (вызывают повышение температуры), обуславливают лейкопению, изменение сахара в крови (гипергликемия), оказывают энтеротропное и нейротропное действие. Наблюдающееся во время течения инфекции тяжелое общее состояние больного, обозначаемое термином *typhus* (туман, бредовое состояние), обусловлено действием эндотоксина, который освобождается при массовой гибели микробных

Микробы кишечной группы, попадающие с фекалиями в окружающую среду, загрязняют ее. Однако бактерии во внешней среде длительно не сохраняются. Они довольно чувствительны к препаратам хлора, который используется как дезинфицирующее средство.

Общим для всех кишечных инфекций является отсутствие эффективных средств специфической профилактики, сложность организации необходимого комплекса противоэпидемических мероприятий.

11.2 Эшерихии



Основной представитель рода — *Escherichia*, постоянный обитатель кишечника человека и всех теплокровных животных, птиц, насекомых, является бактерией нормальной микрофлоры. Выделена из испражнений человека в 1885 г. Т. Эшерихом. В этот род входит большое количество кишечных палочек, отличающихся друг от друга по антигенным свойствам, включая группу энтеропатогенных.

Морфология и тинкториальные свойства. *E. coli* (рис.30) является

30
представителем семейства *Enterobacteriaceae*; некоторые штаммы способны образовывать капсулу.

Культивирование и ферментативные свойства. При посеве на дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина)

кишечные палочки дают окрашенные в цвет индикатора колонии, так как способны разлагать лактозу, входящую в эти среды. *E. coli* обладают выраженными сахаролитическими свойствами — разлагают лактозу, глюкозу,

маннит с образованием кислоты и газа и протеолитическими — разлагают белки до индола и сероводорода, но не разжижают желатин.

Антигенная структура и токсинообразование. У энтеропатогенных кишечных палочек (ЭПКП) обнаружены три группы антигенов, отличающихся большим разнообразием.

О-антиген представляет собой липополисахаридный комплекс (насчитываются 163 разновидности эшерихий по О-антигену).

К-антиген, оболочечный, капсульный, являющийся полисахаридом, делится на три типа: L, B, A (L — термолабильный, разрушается при 60 °С, B — при 100 °С, A — при 120 °С).

При постановке реакции агглютинации для определения О-антигена нужно помнить, что антигены L, B, A, составляющие К-антиген, тормозят агглютинацию живых кишечных палочек в гомологичной О-сыворотке. Это явление получило название феномена О-инагглютинабельности. Устранить это можно инаktivацией оболочечно-комплексных антигенов посредством длительного прогревания культуры.

Н-антиген имеет белковую природу, термолабилен (известно 56 серологических разновидностей по Н-антигену).

ЭПКП выделяют экзотоксин, обладающий нейротоксическими свойствами и являющийся общим для серовариантов. Некоторые штаммы эшерихий способны продуцировать гемолизин и экзотоксин с энтеротропным действием, причем было показано, что эти свойства связаны с присутствием плазмид: Hly-фактор (контролирующий гемолитические свойства) и Ent-фактор (контролирующий продукцию энтеротоксина). ЭПКП образуют эндотоксин, который обладает энтеротропным и пирогенным свойствами.

Резистентность. Кишечные палочки более устойчивы во внешней среде по сравнению с другими представителями семейства. Прямой солнечный свет убивает их в течение нескольких минут, температура 60 °С и 1% раствор карболовой кислоты — в течение 15 мин.

Патогенность для животных. При парентеральном введении эшерихий у кроликов, морских свинок и белых мышей развивается септический процесс и животные погибают. Патогенные серовары эшерихий вызывают специфический энтерит у телят.

Патогенез и клиника. Кишечная палочка является комменсалом, т. е. постоянно находится в кишечнике человека. Роль кишечной палочки как комменсала-сожителя достаточно велика, так как в результате эволюции сложились взаимовыгодные отношения: она участвует в процессе пищеварения, обладает антагонистическими свойствами в отношении патогенных бактерий кишечной группы, дрожжеподобных грибов рода *Candida*, стафилококков и др. Наблюдающийся в результате длительной антибиотикотерапии и связанный с подавлением жизнедеятельности *E.coli* дисбактериоз влечет за собой тяжелые патологические процессы. Примером может служить псевдомембранозный энтероколит, вызываемый устойчивыми к антибиотикам стафилококками. Учитывая высокоантагонистические свойства кишечной палочки, ее широко используют при лечении некоторых кишечных инфекций. Такой препарат получил название «колибактерин». Кишечные палочки участвуют в выработке витаминов комплекса В и, хотя роль *E. coli* в витаминном балансе не так велика, при дисбактериозах это ухудшает течение процесса.

Кишечная палочка, являясь условно-патогенным микроорганизмом, при попадании из кишечника в другие органы и ткани, может вызывать холециститы, циститы, пиелиты, перитониты и другие воспалительные процессы вплоть до сепсиса. Колисепсис, как правило, протекает тяжело.

Определенную роль условно-патогенная флора, особенно кишечная палочка, играет в исходе лучевой болезни. Это эндогенные, незаразные инфекции.

Самостоятельную группу заболеваний составляют эшерихиозы, вызываемые ЭПКП, различающиеся как по клинике, так и по свойствам возбудителей. Возбудители, условно обозначенные как ЭПКП I категории, способны вызывать заболевания типа колиэнтеритов у грудных детей. Патогенез колиэнтеритов в значительной степени зависит от состояния организма. У детей первых месяцев жизни бактерицидность крови по отношению к ЭПКП понижена, что связано с отсутствием IgM, обус-

ловливающих основную защиту при кишечных инфекциях,— эти иммуноглобулины не проходят через плаценту.

Клинически диагноз колиинфекции поставить нельзя, несмотря на наличие определенных характерных симптомов заболевания. Это связано с тем, что нет дифференциально-диагностических признаков, позволяющих исключить другую острую кишечную инфекцию.

ЭПКП II категории вызывают заболевания с дизентерийным синдромом у взрослых и детей старше года; сальмонеллезоподобные и холероподобные, протекающие с синдромом острого гастроэнтерита. Эшерихий последней группы отличаются способностью вырабатывать термолабильный энтеротоксин, сходный по механизму патогенного действия с холерным (заболевание напоминает по клинике легкую холеру).

Различные патогенетические, клинические и эпидемиологические особенности заболеваний, вызываемых ЭПКП II категории, а также отличия самих возбудителей от ЭПКП I требуют отдельной регистрации этих заболеваний и эпидемиологического анализа.

Лабораторная диагностика. Основным в лабораторной диагностике эшерихиозов является бактериологический метод: выделение возбудителя, его дифференциация от условно-патогенных кишечных палочек и идентификация с помощью поливалентных и отдельных ОК-сывороток.

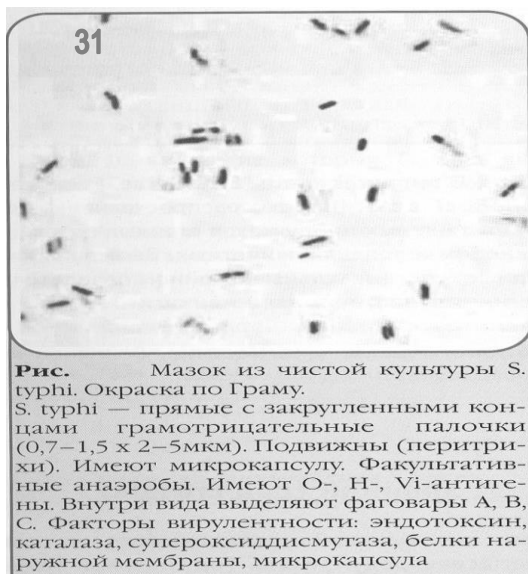
Микробиологическая диагностика иногда сложна, поэтому (особенно для эпидемиологических исследований) нередко приходится пользоваться ретроспективным диагнозом, т. е. исследовать сыворотку переболевшего с выделенной от него культурой в реакциях агглютинации и реакциях пассивной гемагглютинации (РПГА).

Специфическое лечение и профилактика. Лечение эшерихиозов проводят антибиотиками, действующими на грамотрицательную флору (левомицетин, неомицин и др.).

Специфическая профилактика не проводится. При дисбактериозах рекомендуется применение колибактерина, бифидумбактерина и бификола.

11.3 Сальмонеллы

К роду *Salmonella* относятся возбудитель брюшного тифа *S. Typhi* (рис.31), паратифов — *S. paratyphi* А, *S. schottmuelleri* и возбудители пищевых токсикоинфекций, получивших название сальмонеллезов.



Возбудители сальмонеллёзов

Сальмонеллезы, или пищевые токсикоинфекции, вызываются микроорганизмами рода *Salmonella*, характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта и сопровождаются общей интоксикацией.

Таксономия.

Возбудители

сальмонеллезов относятся к роду *Salmonella*, который в настоящее время насчитывает более 2000 представителей, способных вызывать

заболевания у животных и человека. В разные эпидемические периоды выделяются и различные виды сальмонелл. Наиболее часто — групп В, С, D, E: *S. typhimurium*, *S. anatum*, *S. newport*, *S. derby*, *S. heidelberg*, *S. enteritidis*, *S. cholerae suis* и др.

Морфология и тинкториальные свойства. Сальмонеллы — мелкие, до 2 мкм длиной, палочки с закругленными концами, подвижные, грамтрицательные.

Культивирование и биохимические свойства. Все сальмонеллы — факультативные анаэробы, размножаются на простых питательных средах, давая диффузный рост на мясо-пептонном бульоне и бесцветные колонии на дифференциально-диагностических средах (Эндо, Левина). Сальмонеллы не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют мальтозу, маннит и глюкозу до кислоты и газа.

Антигенное строение и токсинообразование. Сальмонеллы имеют О-соматический антиген, Н-жгутиковый (первой фазы — специфической и второй фазы — неспецифической) и К-антиген — поверхностный или капсульный; идентификация их по антигенным свойствам проводится по схеме Кауфмана — Уайта.

Сальмонеллы обладают эндотоксином, который играет значительную роль в патогенезе заболевания, способствуя

быстрому проникновению сальмонелл из кишечника в лимфатическую систему и кровь.

Резистентность. Сальмонеллы сравнительно устойчивы к действию факторов окружающей среды: при температуре 70 °С гибнут лишь через 5—10 мин. Хорошо переносят низкие температуры, в мясе при 5°С (в условиях холодильника) могут размножаться. Размножаясь

в молоке и других продуктах, не изменяют их органолептических свойств.

Патогенность для животных. Сальмонеллы являются полипатогенными, вызывают заболевания у человека и животных. У белых мышей, зараженных через рот. *S. typhimurium*, *S. enteitidis*, *S. dublin*, развивается общий инфекционный процесс, приводящий их к гибели.

Патогенез и клиника. Патогенез сальмонеллезных заболеваний очень сложен и еще недостаточно изучен. Наблюдающиеся при сальмонеллезах разнообразные по своей патогенетической сущности процессы связаны с многообразием клинических форм. Заражение человека происходит в результате употребления в пищу продукта (ведущее место занимают мясо и мясные изделия), инфицированного сальмонеллами. Возбудители попадают в тонкую кишку, а эндотоксины, содержащиеся в продукте и появляющиеся при распаде микробов в кишечнике, оказывают действие на сосудисто-нервный аппарат, повышая проницаемость стенок сосудов, вызывают нарушение терморегуляции, обуславливают рвоту и понос.

Заболевание характеризуется чертами, общими для всех токсикоинфекции: короткий инкубационный период (от нескольких часов до 2 сут), острое начало и непродолжительное течение болезни.

Различают четыре формы сальмонеллезной инфекции: 1) локализованная — гастроэнтеритическая, сопровождается рвотой и поносом, непродолжительная (1—3 дня); 2) генерализованная — с проникновением возбудителя в кровь. Длительная ремиттирующая лихорадка, возможны осложнения со стороны почек, печени и других органов; 3) субклиническая, т. е. бактерионосительство; 4) нозопаразитическая — присоединение сальмонеллезной инфекции к другому инфекционному заболеванию (холецистит, дизентерия и др.).

Иммунитет. После перенесенного сальмонеллеза нестойкий и непродолжительный.

Лабораторная диагностика. Основным методом диагностики является бактериологический: выделение чистой культуры и ее идентификация. Исследованию подлежат рвотные массы, испражнения, промывные воды желудка, кровь, моча, а также остатки пищи.

В целях диагностики (особенно ретроспективно) используются серологические методы: реакция агглютинации и РНГА. Последняя более чувствительна и специфична.

Диагноз сальмонеллезных заболеваний основывается в первую очередь на клинических данных с учетом эпидемиологической обстановки, бактериологического и серологического подтверждения.

Эпидемиология. Основным резервуаром и источником сальмонеллезных инфекций являются здоровые и больные животные (коровы, овцы, лошади, свиньи, кошки, собаки и др.). Источником инфекции может быть и человек — бактерионоситель.

Инфицирование мяса и мясных продуктов может происходить различными путями: 1) при жизни животных; 2) после убоя, при разделывании туш; 3) в процессе приготовления пищи — в случае нарушения технологии или недостаточной термической обработки; 4) при неправильном и длительном хранении приготовленных блюд.

Механизм передачи фекально-оральный. Пути передачи — пищевой, водный и контактно-бытовой, особенно среди детей.

Специфическое лечение и профилактика. Лечение симптоматическое, направленное на снижение токсикоза и восстановление функции сердечно-сосудистой системы. Специфическое лечение: при легких формах — энтеросептол, фурадонин, бактериофаг, при тяжелых — антибиотики (левомецетин, ампициллин).

Основными профилактическими мероприятиями являются ветеринарно-санитарный надзор на бойнях и других предприятиях, выявление и санирование бактерионосителей.

11.4 Возбудители ботулизма

Ботулизм (от *botulus* — колбаса) — пищевое отравление, протекающее в виде токсикоинфекции и сопровождающееся поражением ядер продолговатого мозга.

Таксономия. Возбудитель ботулизма *Clostridium botulinum* относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Clostridium*. Открыт в 1896 г. Э. Ван-Эрменгемом.

Морфология и тинкториальные свойства. Возбудитель ботулизма — крупная палочка длиной 4—9 мкм, шириной 0,6—0,9 мкм, с закругленными концами. Споры расположены субтерминально (в виде теннисной ракетки), имеют перитрихальные жгутики, грамположительны. (рис.32)



Ферментативные свойства. Возбудители ботулизма — строгие анаэробы. Оптимальная температура для роста и токсинообразования от 28 до 35 °С. На среде Китта-Тароцци образуют помутнение и газообразование; культура может издавать запах прогорклого масла. При посевах в высокий столбик агара вырастают колонии, имеющие форму чечевиц или комочков ваты. На кровяном агаре — прозрачные колонии, окруженные зоной гемолиза. Микробы вырабатывают сахаролитические ферменты, разлагающие глюкозу, мальтозу, глицерин до кислоты и газа; выделяют протеолитические ферменты — разжижают желатин, свернутую сыворотку, обладают лецитиназной активностью.

Антигенная структура и токсинообразование. Возбудители ботулизма имеют Н- и О-антиген, являющийся общим для всех семи серологических вариантов возбудителя: А, В, С, D, Е, F, G. Каждый серовар обладает специфической иммуногенностью, оказывая одинаковое патогенетическое действие на организм человека и животных. Наиболее сильными для человека являются токсины сероваров А, В, Е. Они выделяются клостридиями ботулизма при размножении в пищевых продуктах, в организме человека и животных, на питательных средах. Ботулинический экзотоксин получен в сухом и кристаллическом виде; в 1 мг его со-

держится до 100 млн. смертельных доз для белой мыши. Это самый сильный из всех известных биологических ядов.

Ботулинический экзотоксин устойчив к действию желудочного сока, солнечного света, высушиванию, замораживанию, выдерживает кипячение до 10 мин, в консервах сохраняется 6—8 мес. Разрушается токсин при кипячении через 10 мин или при нагревании до 90 °С в течение 40 мин.

Резистентность. Споры клостридий ботулизма длительно сохраняются в почве, воде, на фруктах и овощах; прорастают в пищевых продуктах, консервах, где есть анаэробные условия, устойчивы к воздействию высоких концентраций хлорида натрия, замораживанию, действию солнечного света. При кипячении погибают через 6 ч, при 120°С — через 20 мин, при действии 40% формалина — через сутки.

Патогенность для животных. К экзотоксину наиболее чувствительны лошади, рогатый скот, птицы, морские свинки, кролики, белые мыши. Смерть у экспериментальных животных наступает через 1—3 дня после введения им токсина.

Патогенез и клиника. Ботулизм — пищевая токсикоинфекция, возникающая у человека при употреблении продуктов, содержащих токсин или возбудителей. В развитии заболевания основную роль играет ботулинический экзотоксин, который быстро всасывается в кровь и поражает в первую очередь ядра продолговатого мозга, сердечно-сосудистую систему. Инкубационный период обычно длится от 6 до 24 ч, но может быть до 8 дней, что зависит от количества токсина и клостридий ботулизма, попавших в организм. Заболевание начинается обычно внезапно: появляются боли в области желудка, тошнота, головная боль. В дальнейшем в результате поражения ядер продолговатого мозга наступает паралич глазных мышц, нарушение аккомодации, птоз век, двоение предметов, расстройство речи и глотания. Смерть наступает от паралича дыхания или остановки сердца.

Иммунитет. Перенесенное заболевание не оставляет иммунитета. Для человека характерна высокая чувствительность к экзотоксину ботулизма.

Лабораторная диагностика. Для исследований берут рвотные массы, промывные воды желудка, кровь, испражнения, мочу, а также пищевые продукты. Исследование проводится одновременно с целью обнаружения ботулинического экзотоксина и возбудителя

ботулизма. Выделение ведется по общей методике выделения анаэробных культур. Для обнаружения токсина экстракт, приготовленный из исследуемого материала, вводят внутривентрально или подкожно белым мышам или морским свинкам. Для определения серовара токсина трем животным вводят фильтрат с антитоксической сывороткой А, фильтрат с антитоксической сывороткой В и фильтрат с антитоксической сывороткой Е. Наблюдение за животными ведут в течение 4 дней. При наличии в исследуемом материале токсина выживает только та мышь, которой введен токсин, нейтрализованный антитоксической сывороткой соответствующего серовара.

Эпидемиология. Возбудители ботулизма широко распространены в природе; больше всего их находится в почве и воде, где они длительное время сохраняются в виде спор. Споры обнаруживаются также в кишечнике человека, животных и рыб. Человек заболевает в результате употребления консервированных продуктов, содержащих экзотоксин или возбудителя. В последнее время наиболее частой причиной заболевания являются продукты домашнего консервирования (маринованные или соленые грибы, овощные консервы, рыба и др.). По внешнему виду и органолептическим свойствам продукты, инфицированные возбудителем ботулизма и содержащие токсин, не отличаются от доброкачественных.

Специфическое лечение. Главным в специфическом лечении ботулизма является своевременное введение противоботулинических антитоксических сывороток с целью нейтрализации ботулинического экзотоксина. Вначале вводится антитоксическая сыворотка четырех сероваров (А, В, С, Е) в равных дозах, после установления серовара—сыворотка соответствующего серовара. Одновременно больным вводится полианатоксин (А, В, С и Е) для стимуляции выработки антител.

Изучение морфологии сальмонелл и эшерихий.

Брюшной тиф относится к антропонозным инфекциям. Источником инфекции является больной и бактерионоситель. Брюшнотифозные и паратифозные А – и В – бактерии (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. schottmulleri*) представляют собой небольшие, подвижные грамотрицательные палочки. Они могут

быть дифференцированы на основании изучения ферментативных и антигенных свойств

Изучение ферментативной активности сальмонелл и эширихий

Брюшнотифозная палочка разлагает некоторые углеводы (глюкоза, маннит, мальтоза) только до образования кислоты, тогда как при разложении этих углеводов паратифозными бактериями образуются кислота и газ. Бактерии паратифа В отличаются от бактерий паратифа А способностью вызывать при росте на молоке щелочеобразование – резкое посинение лакмусового молока. Однако основным методом идентификации тифо – паратифозных бактерий является реакция агглютинации со специфическими сыворотками. Она легко дифференцируется от тифозно – паратифозных и дизентерийных бактерий по способности ферментировать лактозу, для чего пользуются дифференциально – диагностическими средами (среды Эндо, Левина и др.). На среде Эндо, содержащей лактозу, и в качестве индикатора фукцин, обесцвеченный сульфитом натрия, колонии кишечной палочки имеют фуксиново – красный цвет с металлическим блеском, тогда как колонии патогенных представителей кишечно – тифозного семейства бесцветны.

Ферментативные свойства различных представителей семейства энтеробактерий.

Таб.№8

Вид микро ба	гл ю- коз а	ла к- тоз а	сахароза	маль- тоза	ман- нит	мо- лок о	индо л	подв и- жнос ть	колонии на среде Эндо
Брюш ной тиф									
Парат иф А									
Парат иф В									

Кишечная палочка									
------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Для постановки микробиологического диагноза брюшного тифа и паратифов исследуют кровь (бактериемия в течение всего лихорадочного периода) и испражнения больного, а также широко используют серологический метод (реакция Видаля). В основу серологического метода положено исследование сыворотки больного на наличие специфических антител. Реакция Видаля дает положительные результаты начиная с конца первой недели заболевания. При брюшном тифе в сыворотке больного обнаруживаются агглютинины к брюшнотифозной палочке. Реакция Видаля считается положительной начиная с разведения 1:200 и выше.

Постановка реакции агглютинации Видаля

Ингредиентами для реакции агглютинации являются:

1. антиген в виде взвеси живых или убитых (диагностикум) микробных клеток.
2. антитела – агглютинины в сыворотке больного.
3. электролит в виде изотонического раствора хлорида натрия, которым пользуются для разведения сыворотки и антигена.

Из сыворотки больного сначала готовят основное или рабочее разведение сыворотки (1:50), из которого получают дальнейшие двукратные разведения. В ряд пробирок разливают по 0,5мл изотонического раствора хлорида натрия, затем в первую пробирку вносят равный объем сыворотки в рабочем разведении и после перемешивания 0,5мл переносят во вторую пробирку и т.д. В последнюю пробирку сыворотку не вносят – контрольная пробирка. Затем во все разведения и контрольную пробирку прибавляют по две капли диагностикума или микробной взвеси.

После встряхивания штатива помещают на 2 часа в термостат при температуре 37 С, а затем выдерживают в течение суток при комнатной температуре. Н – агглютинацию учитывают через 2 часа

невооруженным глазом или при помощи агглютиноскопа. Окончательный результат регистрируют на следующий день.

При наличии агглютинации на две пробирки появляется хлопьевидный осадок. Степень реакции оценивается крестами, которые необходимо учесть в нижеследующей таблице.

Результаты учёта реакции агглютинации Видаля

Ингредиент	№ пробирок
	1 : 2 : 3 : 4 :
Разведения сыворотки в объеме 0,5мл	По две капли в каждую пробирку
Диагностикум	
Результаты	

Схема лабораторных исследований при брюшном тифе и паратифах.

Материал	Метод исследования	Результаты
Кровь	<u>1.</u> <u>Бактериологический</u>	Помутнение бульона
	1.а) Посев на желчный бульон	Бесцветные колонии
	б) Посев на среду Эндо	Грамотрицательные палочки
	в) Микроскопия колоний и выделение чистой культуры	Ферментация глюкозы, маннита и мальтозы с образованием газа или без него
	г) Посев на среде Гисса	

Испражнения, моча	д) Изучение антигенных свойств с помощью диагностических сывороток р-агглютинации на предметном стекле	
Сыворотка	2. а) Посев на среду Эндо и в среду накопления б) Далее выделение культуры и ее дальнейшее изучение (см. выше) <u>2. Серологический</u> 1. а) Постановка реакции Видаля б) РНГА	Положительная реакция с одним из диагностиков

11.6 Препататы, применяемые для профилактики и лечения сальмонеллёзов

1. Тифо – паратифозно – столбнячная вакцина химическая, сорбированная (TABLE). Вакцина состоит из самотических брюшнотифозных, паратифозных А и В бактерий и очищенного концентрированного столбнячного анатоксина. Антигены сортированы на геле гидрата окиси алюминия. Применяется однократно, подкожно для профилактики столбняка, брюшного тифа, паратифов А и В.

2. Брюшнотифозная спиртовая вакцина, обогащенная Vi – антигеном. Вакцина состоит из взвеси брюшнотифозных бактерий, обезвреженных этиловым спиртом, обогащенной Vi – антигеном, извлеченным из микробной клетки химическим методом.

3. Брюшнотифозная вакцина с анатоксином. В состав вакцины входят О и Vi – антигены брюшнотифозных бактерий и очищенные концентрированные анатоксины возбудителей столбняка, ботулизма и газовой гангрены, сортированные на гидроксид алюминия.

Применяют подкожно, двукратно и интервалом 25 – 30 дней. Ревакцинацию проводят через 6 - 9 месяцев.

4. Брюшнотифозный поливалентный сухой бактериофаг с кислотоустойчивым покрытием. Препарат представляет собой фильтрат фаголизата брюшнотифозных бактерий в сухой таблетированной форме. Для приготовления этого препарата используют типичные штампы брюшнотифозных бактерий и все наиболее распространенные фаготипы. Брюшнотифозный бактериофаг применяют для профилактики брюшного тифа в очагах этой инфекции. Применяют внутрь до еды.

5. Для лечения больных применяются антибиотики широкого спектра действия, группа тетрациклина и левомицетина. Успех лечения тесно связан со степенью развития специфического иммунитета. Поэтому кроме антибиотиков рекомендуется лечение корпускулярными вакцинами и антигенами при комплексной иммуноантибиотикотерапии (антибиотики и отдельно моновакцина и Vi-антиген), обеспечивает отсутствие формирования бактерионосительства и сокращает частоту рецидивов.

11.7 Постановка биологической пробы для обнаружения ботулинистического токсина в пищевом продукте.

В анаэробных условиях в пищевых продуктах (консервы, особенно домашнего приготовления, рыбы и др.) возбудитель ботулизма может образовывать очень сильный экзотоксин, обладающий нейротропным действием. При употреблении в пищу продукта, содержащего этот токсин, наступает тяжёлое отравление с преимущественным поражением центральной нервной системы. Для определения наличия ботулинистического токсина в пищевом продукте или в материалах, полученных от больного, ими кормят белую мышь, морскую свинку, вследствие этого животные становятся беспокойными, мечутся, и в большинстве случаев это отравление заканчивается смертельным исходом.

11.8 Препараты для профилактики и лечения ботулизма

Противоботулиническая сыворотка, типов А, В, С, Е, (очищенная, концентрированная). Препарат представляет собой сыворотку крови лошадей, гипериммунизированных анатоксинами и токсинами типов А, В, С, Е, Противоботулиническая сыворотка выпускается в виде поливалентных и моновалентных препаратов, очищенных и концентрированных методом ДИАФЕРМ-3.В 0,1 г. белка содержится: для типа А не менее 400 МЕ, для типа С - 400 МЕ и для типа Е также 400 МЕ. По внешнему виду эти сыворотки прозрачны или слегка опалесцируют и имеют желтоватый цвет, Противоботулиническая сыворотка применяется для лечения, её вводят внутримышечно и внутривенно по 10000 МЕ типов А, С, Е и 500С типа В. Срок годности 2 года.

Ботулинические анатоксины типов А, В, Е входят в состав брюшнотифозной вакцины с секста анатоксином.

Контрольные вопросы:

1. Характеристика возбудителей кишечных инфекций.
2. Характеристика сальмонеллёзов.
3. Ферментативные свойства возбудителей кишечных инфекций.
4. Методы диагностики возбудителей кишечных инфекций.
5. Профилактика ботулизма.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 14

У группы рабочих, которые обедали в одной и той же столовой, появились признаки острой пищевой токсикоинфекции.

1. Дайте определение понятиям «пищевая токсикоинфекция», «пищевая интоксикация».
2. Назовите возможных возбудителей пищевой токсикоинфекции и интоксикации.

Ситуационная задача № 15

При росте капрокультуры на среде Ресселя наблюдаются изменение цвета всей среды и разрывы агара. Посев исследуемой культуры производили уколом в столбик и на поверхность среды.

1. Назовите основные компоненты среды.
2. Какие бактерии дают такие изменения среды и почему?

Ситуационная задача № 16

При посеве на среду Эндо испражнений больного ребенка с подозрением на колиэнтерит получены колонии красного цвета с металлическим блеском.

1. Назовите основные компоненты среды Эндо.

Какие бактерии на этой среде дают цветные колонии и почему?

Ситуационная задача № 17

После употребления в пищу грибов домашнего консервирования в семье отмечено два случая острого отравления с неврологическими симптомами.

1. С помощью какого лабораторного исследования может быть выяснена этиология данного заболевания?
2. Какие экспресс-методы нужно применить?
3. Какой препарат необходимо экстренно назначить больному?

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Возбудители кишечных	Морфология и тинкториальные
----------	-----------------------------	------------------------------------

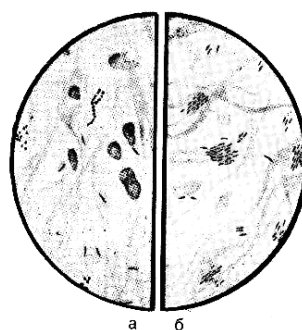
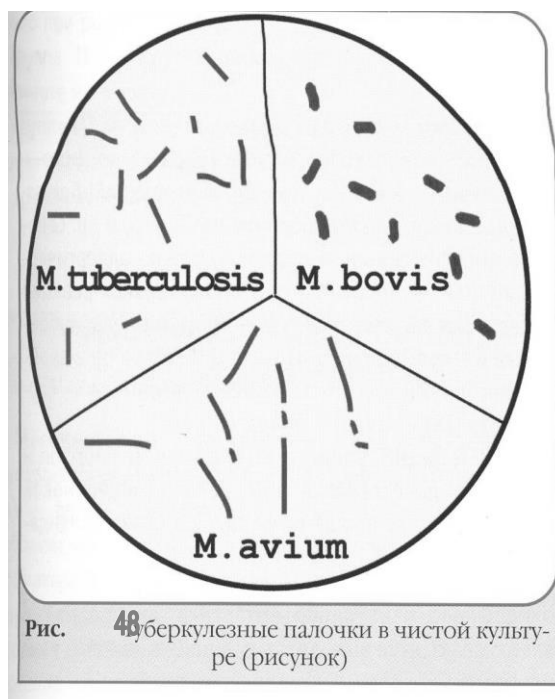
	инфекций	свойства
1	Эшерихии	
2	Возбудители ботулизма	
3	Возбудители сальмонеллезов	

ГЛАВА 12. ВОЗДУШНО КАПЕЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ (КОРИНЕБАКТЕРИИ, МИКОБАКТЕРИИ).

12.1 Патогенные микобактерии.

Семейство *Mycobacteriaceae* включает большую группу микобактерий, среди которых встречаются патогенные и непатогенные. Для бактерий этого семейства характерны полиморфизм (имеют форму тонких палочек, но встречаются ветвистые формы, короткие зернистые палочки), кислотоустойчивость, способность в отличие от других микроорганизмов выживать в 5-10% растворе кислот, щелочей и в спирте (рис.33,34).

К семейству микобактерий относятся возбудители туберкулеза, проказы и так называемые нетуберкулезные (атипичные) микобактерии, которые способны вызвать заболевания



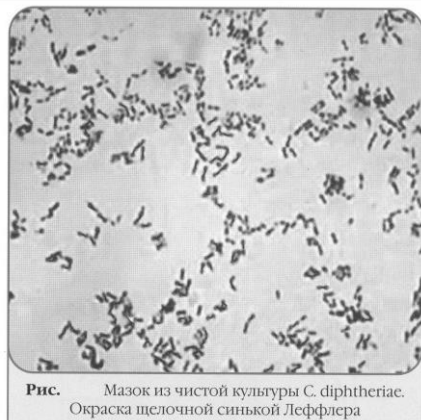
Mycobacterium tuberculosis в мокроте (а) и *Mycobacterium leprae* в ткани (б). Окраска по Цилю — Нельсену.



рис. 47. Микрокультура микобактерий туберкулеза.

у человека и животных (*Myc.paratuberculosis*, *Myc.africanum*, *Myc.kansasii* и др.). Некоторые из атипичных микобактерий имеют общие антигены с *Myc.bovis*.

Имеется большое количество кислотоустойчивых сапрофитов,



которые встречаются в окружающей среде(вода,почва), некоторых пищевых продуктах(масло,молоко),а также на коже и слизистых оболочках человека. У человека и складок кожи, смегмы (отделяемое препуциальной складки) выделяется *Myc.smegmatis*.

Морфология и культуральные свойства туберкулезных палочек

Морфология и культуральные свойства туберкулезных палочек -это тонкие слегка изогнутые палочки, полиморфны - могут быть колбовидной, кокковидной, зернистой и фильтрующейся формы, Микобактерии туберкулеза аэробы, не имеют капсул и опор, неподвижны, грамположительны, плохо воспринимают анилиновые красители, поэтому окрашиваются с применением протравы и подогревания (метод Циля-Нильсена) Растут на яичных средах Петраньяни, Левенштейна и др. через 20-25 дней после посева, Микобактерии туберкулёза биохимически мало активны.

Микобактерии туберкулёза образуют эндотоксин. Это белковое вещество впервые выделил Кох и назвал его туберкулином. Туберкулин обладает свойствами аллергена. Он не оказывает токсического действия на здоровых людей, его патогенное действие проявляется только в заражённом организме. Поэтому туберкулин вводят и с диагностической целью.

Типы микобактерий туберкулёза, пути заражения, иммунитет.

Различают следующие типы микобактерий туберкулёза:

- 1) Человеческий тип *Mycobacterium tuberculosis*
- 2) Бычий тип: *Mycobacterium bovis*
- 3) Птичий тип: : *Mycobacterium avium*
- 4) Мышиный тип
- 5) Микобактерий, вызывающие заболевание холоднокровных.

Пути заражения - воздушно-капельный,воздушно-пылевой и алиментарный. Различают туберкулёз лёгких, желудка и кишечника, почек, туберкулёз мозговых оболочек, костей и других органов, генерализованный туберкулёз.

Посттуберкулёзный иммунитет является инфекционным. В создании невосприимчивости к туберкулёзной инфекции имеет значение сочетание нескольких механизмов (действие иммуноглобулинов, медиаторов, которые разрушают микобактерии туберкулёза).

Разобрать методику приготовления мазка и сущность окраски кислотоустойчивых микроорганизмов по методу Циля-Нильсена.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля—Нильсена, Бактерии, содержащие большое количество жиров и воскоподобных веществ (микобактерии туберкулёза), не могут быть окрашены простыми методами. Для окраски этих бактерий необходимо применять концентрированные растворы красителей, содержащие протравы (фенол), и вести окрашивание при подогревании. Метод Циля-Нильсена состоит в следующем: на поверхность фиксированного препарата накладывают кусочек фильтровальной бумаги, на который наливают несколько капель карболового фуксина Циля. Предметное стекло берут пинцетом Корнэ и осторожно подогревают над пламенем горелки до появления паров, дают остыть и затем повторяют подогревание 2-3 раза. Если краска при подогревании подсыхает, то её необходимо добавлять. После остывания препарата снимают фильтровальную бумагу и обесцвечивают препарат, погружая его в стаканчик с 5% раствором серной кислоты. После тщательного промывания препарат докрашивают метиленовым синим по Леффлеру.

При окраске по методу Циля-Нильсена кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, а остальные после обесцвечивания кислотой докрашиваются метиленовым синим.

При микроскопии препаратов мокроты больного туберкулёзом, окрашенных по методу Циля-Нильсена, следует искать мелкие, иногда зернистые, красные микобактерии туберкулёза, расположенные одиночно или в виде небольших скоплений на синем фоне.

Демонстрация характера роста микобактерий туберкулёза.

На жидкой питательной среде микобактерии туберкулёза образуют грубую морщинистую, ломкую плёнку кремового цвета. На плотных средах вырастают сухие морщинистые колонии желтого цвета (R - форма)

Основные методы исследования туберкулёза:

-Таблицы по лабораторной диагностике туберкулёза. Основные методы исследования:

- 1) Микроскопический
- 2) Биологический

- 3) Бактериологический
- 4) Аллергический
- 5) Люминесцентно - серологический метод (ускоренный).

Туберкулёз сопровождается развитием аллергического состояния которое может быть выявлено при помощи кожных аллергических проб, Доступы, но имеют ограниченное диагностическое значение, кожные аллергические пробы - реакции Пирке и Манту. Для постановки пользуются туберкулином. При постановке реакции Пирке туберкулин наносят на кожу и через каплю туберкулина производят неглубокие кожные насечки. При реакции Манту различные разведения туберкулина вводят внутрикожно в объёме 0,1 мл. При туберкулёзе на месте введения туберкулина возникает воспалительная реакция (краснота и припухлость). Реакцию учитывают через 24-48 часов.

Профилактика и специфическое лечение туберкулеза.

Для профилактики туберкулёза применяют живую вакцину: БЦЖ. Вакцинируют всех детей в перинатальном периоде (5-7-й день жизни) внутрикожным методом.

Ревакцинация проводится в возрасте 7, 12 и 17 лет детям, отрицательно реагирующим на туберкулин.

Для специфического лечения туберкулеза пользуются антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами. Сюда относятся: стрептомицин, ПАСК (парааминосалициловая кислота) и препараты гидразид изоникотиновой кислоты - фтивазид и тубазид.

При недостаточной эффективности вышеперечисленных препаратов применяют циклосерин, канамицин, зиомицин, рифампицин и др.

12.2 Возбудитель дифтерии.

Таксономия. Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae*, относится к роду *Corynebacterium*, семейству Actinomycetaceae. Род *Corynebacterium* включает также ложнодифтерийные бактерии и дифтероиды, непатогенные для человека, обнаруживаемые на слизистых оболочках и кожных покровах.

Морфология и тинкториальные свойства. Дифтерийные бактерии – тонкие слегка изогнутые палочки длиной 3-5 мкм, шириной 0.3 мкм с характерным расположением в мазках: попарно,

под углом друг к другу, напоминая V. Концы палочек имеют булабовидные утолщения, содержащие зерна волютина (рис.35). Эти зерна, являющиеся запасными питательными веществами, служат одним из дифференциально-диагностических признаков при идентификации дифтерийных палочек. Бактерии дифтерии грамположительны, неподвижны, не образуют спор некоторые штаммы имеют микрокапсулу. Для возбудителя дифтерии характерен полиморфизм.

Изучение морфологии *Corynebacterium diphtheriae* под микроскопом (по Граму и Нейссеру).

Дифтерийная палочка *Corynebacterium diphtheriae* неподвижна, не образует спор и капсул, положительно окрашивается по методу Грама. Отличительной особенностью является наличие в его цитоплазме зерен волютина, которые красятся интенсивнее, чем цитоплазма, методом Нейссера - цитоплазма в жёлтый цвет, а волютиновые зёрна в темно-коричневый цвет.

Обратите внимание на расположение дифтерийных палочек под углом. При окраске по Леффлеру (метиленовой синью), включения окрашиваются в тёмно-, а тело - в светло-синий цвет.

Определение токсигенности дифтерийной палочки в агаровом геле (демонстрация).

Дифтерийная палочка продуцирует сильный экзотоксин, который обладает избирательным действием на мышцу сердца, надпочечники и периферическую нервную систему. Для определения степени токсигенности можно пользоваться биологическим методом (заражение морской свинки) и более доступным методом - реакцией преципитации в агаровом геле. Последний метод состоит в следующем: по диаметру чашки Петри с мясопептонным агаром накладывают полоску стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную дифтерийной антитоксической сывороткой (500 МЕ в 1 мл). Испытуемые культуры засевают штрихами перпендикулярно бумажке с антитоксической сывороткой. Посевы помещают в термостат и учитывают результаты через 24 и 48 часов. Антитоксическая сыворотка и токсин продуцируемый дифтерийной культурой, диффундируют в агар. При встрече токсина с антитоксином возникают белые линии преципитаций ("стрелки"), появление которых указывает на токсигенность испытуемой культуры. Дифтерийный

токсин под влиянием формалина в условиях его длительного воздействия (3-4 недели при температуре 37-40°C) может быть переведён в анатоксин. Этот препарат лишённый токсичности, но полностью сохранивший свои антигенные свойства, используют для создания невосприимчивости к дифтерии у детей и для гипериммунизации лошадей с целью получения противодифтерийной антитоксической сыворотки. Сила дифтерийного анатоксина выражается в флоккулирующих единицах (Lf).

Препараты, применяемые для профилактики и лечения дифтерии.

Основные мероприятия в борьбе с дифтерией заключаются в полном охвате детей профилактическими прививками. С этой целью используют:

Адсорбированный дифтерийный анатоксин. Фильтрат бульонной культуры токсигенного штамма дифтерийных бактерий, обезвреженный формалином, очищенный от балластных веществ, сконцентрированный и адсорбированный на гидрате окиси алюминия. По внешнему виду мутная беловатая жидкость. Анатоксин применяют для ревакцинации детей, препарат вводят подкожно в дозе 0,5 мл, Срок годности 3 года.

Анатоксин дифтерийно — столбнячный — представляет смесь дифтерийного и столбнячного анатоксинов, очищенных, концентрированных и адсорбированных гидратом окиси алюминия. Применяют для вакцинации детей, переболевших коклюшем или привитых коклюшной моновакцинацией или имеющих противопоказание к прививкам АКДС, Препарат вводят подкожно двукратно в дозе 0,5 мл с интервалом 30-40 дней. Срок годности 1 год.

Адсорбированная коклюшно — дифтерийно — столбнячная вакцина — представляет собой смесь дифтерийного и столбнячного анатоксинов, очищенных, концентрированных, адсорбированных на гидроокиси алюминия и коклюшных микробов, убитых формалином или мертиолатом. Вакцина используется для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка. Вакцину вводят внутримышечно в верхне-наружный квадрат ягодицы трёхкратно в возрасте 5-6 месяцев, ревакцинация в 2 года и в 6 лет. Срок годности 1,5 года.

Сыворотка, противодифтерийная (очищенная, концентрированная)

Препарат представляет собой сыворотку крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином. Сыворотку очищают и концентрируют методом ДИАФЕРМ (диализа-осаждения и ферментации). В 0,1 г белка должно содержаться не менее 1200 МЕ. По внешнему виду прозрачная или опалесцирующая жидкость желтоватого цвета. Применяют для лечения дифтерии, вводят внутримышечно или подкожно в количестве от 5000 до 50000МЕ в зависимости от тяжести заболевания. Срок годности 2 года.

Для санации дифтерийных бактерионосителей рекомендуются смазывания, полоскания, пульверизация зева и носа пенициллином, грамицидином, тетрациклином.

Контрольные вопросы.

1. Характеристика возбудителя дифтерии: морфологические, тинкториальные и культуральные свойства.
2. Патогенез и микробиологический диагноз дифтерии.
3. Характеристика возбудителя коклюша: морфологические и культуральные свойства
4. Препараты для профилактики и лечения дифтерии. Морфология, культуральные свойства туберкулёзных палочек
5. Токсинообразование и патогенность для животных.
6. Пути заражения туберкулёза.
7. Основные клинические формы,
8. Иммунитет.
9. Аллергические пробы Манту и Пирке,
10. Лабораторная диагностика туберкулеза, ускоренные методы диагностики.
11. Вакцина БЦЖ. Препараты для лечения туберкулёза

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 18

Больной Б., 35 лет, жалуется на потливость, слабость, быструю утомляемость, повышение температуры до 37,2-37,5⁰С в течение последнего месяца, периодический кашель. При рентгенологическом обследовании обнаружена очаговая тень в области верхней доли правого легкого, увеличение бронхиальных лимфоузлов. Предварительный диагноз: очаговый туберкулез верхней доли правого легкого.

Разработать план микробиологического обследования.

Ситуационная задача № 19

В материале, полученном от больного, обнаружили грамположительные, расположенные под углом друг к другу, палочковидные бактерии с утолщенными концами.

1. Для каких патогенных микроорганизмов характерна подобная морфология?
2. Какие дополнительные методы окрашивания можно предложить для уточнения морфологических особенностей возбудителя?

3. Необходимо ли проведение дальнейшего исследования?

Тренинг «Бумеранг»

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается свое задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов высказывает свое мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Понятия об микобактериях
2. Тинкториальные свойства возбудителей туберкулёза
3. Виды коринобактерий

Задание для 2-ой группы

1. Культуральные свойства коринобактерий
2. Ускоренные методы диагностики туберкулёза.
3. Тинкториальные свойства микобактерий

Задание для 3-ей группы

- 1.Культивирование и ферментативные свойства коринобактерий
- 2.Лабораторная диагностика туберкулёза
- 3.Виды микобактерий

ГЛАВА 13. ПРОСТЕЙШИЕ (ПЛАЗМОДИИ МАЛЯРИИ, ЛЕЙШМАНИИ). ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ(ДЕРМАТОМИКОЗЫ, КАНДИДОЗЫ).

13.1 Возбудители малярии

Малярия — антропонозная инфекционная болезнь, вызываемая несколькими видами простейших рода *Plasmodium*, передающаяся комарами (*Anopheles*), сопровождающаяся лихорадкой, анемией, увеличением печени и селезенки.

Возбудители малярии относятся к Protozoa, типу Apicomplexa, классу Sporozoa и видам *Pl. vivax*, *Pl. malariae*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale*. Жизненный цикл плазмодиев проходит в организме комара (окончательном хозяине) и организме человека (промежуточном хозяине). В организме комара происходит половое размножение, или спорогония (образование мелких клеток — спорозоитов), а в организме человека осуществляется бесполое размножение — шизогония или, точнее, мерогония, при которой образуются мелкие клетки — мерозоиты. После укуса спорозоиты из слюнных желез комара попадают в кровь, затем проникают в печень, в клетках которой совершается первый этап мерогонии — тканевая мерогония (шизогония). В клетках печени спорозоит переходит в стадию тканевого шизонта, после развития которого наступает деление (меруляция), завершающееся образованием тканевых мерозоитов, поступающих в кровь. Мерозоиты проникают в эритроциты, в которых совершается несколько циклов эритроцитарной мерогонии (шизогонии). При этом мерозоиты превращаются в растущие формы паразита (трофозоиты) в эритроците: кольцевидный, юный, взрослый трофозоит. Последний делится и превращается в шизонт. Из делящихся шизонтов образуются мерозоиты, внедряющиеся в другие эритроциты; этот процесс повторяется многократно. В эритроцитах мерозоиты дают начало как бесполом формам трофозоита (агамонтам), так и

половым формам (гамонтам). Продолжительность цикла развития у *Pl. vivax*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale* составляет 48 ч, у *Pl. malariae* — 72 ч. При укусе половые формы возбудителя попадают вместе с кровью больного человека в желудок самок комаров. В комаре гамонты приступают к гаметогонии. Половые формы созревают и оплодотворяются, образуя зиготу, превращающуюся в удлинённую, подвижную форму — оокинету. Оокинета проникает через стенку желудка и превращается в ооцисту, в которой завершается спорогония с образованием до 10 тыс. спорозоитов. Спорозоиты затем попадают через гемолимфу в слюнные железы комара.

Характеристика возбудителей. *Pl. vivax* открыт в 1890 г. В. Грасси и Р. Фелетти. Является возбудителем трехдневной малярии. В эритроците при окраске мазка из крови по Романовскому—Гимзе имеет форму кольца правильной формы: крупная вакуоль в центре, окаймленная голубой цитоплазмой с рубиново-красным ядром (кольцевидный трофозоит). Иногда в одном эритроците встречается 2—3 кольца. Полувзрослый трофозоит имеет в эритроците форму амёбы с псевдоподиями. На некоторых стадиях развития в пораженном эритроците выявляется кирпично-красная зернистость. В стадии деления паразита образуется 12—24 мерозоита.

Pl. malariae открыт в 1880 г. А. Лавераном. Является возбудителем четырехдневной малярии. Полувзрослый трофозоит внутри эритроцита отличается от форм *Pl. vivax*, так как имеет лентовидную форму и паразит делится на 6—12 мерозоитов, располагающихся упорядоченно вокруг пигмента, обычно в виде розетки.

Pl. falciparum открыт в 1897 г. У. Уэлчем. Является возбудителем тропической малярии. Характерно наличие юных форм паразита в виде мелких колец в эритроците, часто по 2—3 в одном эритроците, а также появление в периферической крови половых клеток в виде полулуний.

Pl. ovale открыт в 1922 г. Ж. Стивенсеном. Является возбудителем трехдневной малярии. Паразит в стадии кольца в эритроците имеет более крупное ядро, чем в кольце *Pl. vivax*. Некоторые эритроциты имеют овальную форму. В эритроците выявляется зернистость. Паразит делится на 6—12 мерозоитов.

Эпидемиология. Малярией болеют сотни миллионов человек, живущих в странах тропического климата, что определяет

важность проблемы завоза малярии в нашу страну. Источник инфекции — инвазированный человек; переносчик — самка комара рода *Anopheles*. Основной механизм передачи — трансмиссивный, через укус инвазированной самки комара.

Патогенез и клиническая картина. Инкубационный период при различных формах малярии колеблется от недели до года и более. Малярии свойственно приступообразное течение: озноб с сильной головной болью сменяется подъемом температуры тела до 39—40 °С и выше, после чего происходит быстрое снижение температуры тела с обильным потоотделением и выраженной слабостью.

Иммунитет. При заболевании формируется нестойкий видоспецифический нестерильный иммунитет. Возможны повторные заболевания.

Микробиологическая диагностика малярии основана на приготовлении мазков из крови, окраске их по Романовскому—Гимзе, микроскопии и обнаружении различных форм возбудителя; применяют РНГА, ИФА, ДНК-гибридизацию для обнаружения ДНК паразитов в крови.

Лечение и профилактика. Противомаларийные препараты оказывают различное действие на бесполое, половые стадии плазмодиев. К основным противомаларийным препаратам относят хинин, хлорохин, акрихин, примахин, хиноцид, бигумаль, хлоридин и др.

Профилактические мероприятия направлены на источник возбудителя (лечение больных малярией и носителей) и уничтожение переносчиков возбудителя — комаров. Разрабатываются методы вакцинации на основе антигенов, полученных методом генетической инженерии.

13.2 Возбудители лейшманиозов Лейшманиозы — трансмиссивные заболевания человека или животных, вызываемые лейшманиями и передающиеся москитами; характеризуются поражением внутренних органов (висцеральный лейшманиоз) или кожи и слизистых оболочек (кожный лейшманиоз).

L. tropica, *L. braziliensis*, *L. donovani* относятся к Protozoa, типу Sarcomastigophora, подтипу Mastigophora — жгутиконосцы.

Лейшмании имеют два цикла развития: лейшманиальный (безжгутиковый) и лептомонадный (жгутиковый). Лейшманиальный цикл происходит в ретикулоэндотелиальных

клетках печени, селезенки, лимфатических узлах и макрофагах инфицированных людей и животных. Паразиты округлой формы В—5 мкм), без жгутиков, при окраске мазков по Романовскому—Гимзе цитоплазма имеет серовато-голубой цвет, а ядро — красновато-фиолетовый.

В лептотомнадном цикле паразиты развиваются в кишечнике москита. Они имеют жгутик и способны к передвижению. Возбудитель имеет удлинённую веретенообразную форму, длина его 10—20 мкм, поперечник — около 5 мкм. Протоплазма содержит ядро, цитоплазму, блефаропласт и зерна волютина. Жгутик отходит от заостренного конца. В качестве питательных сред для культивирования (при 22 °С) используют среду NNN (агаризированную среду) и др. Лейшмании растут также на хорион-аллантоисной оболочке куриного эмбриона и в культурах тканей. К лабораторному заражению лейшманиями восприимчивы белые мыши, собаки, хомяки, суслики и обезьяны.

Эпидемиология. Основными источниками возбудителей висцерального лейшманиоза являются инфицированные собаки, а кожного лейшманиоза — суслики, песчанки и другие грызуны. Переносчиками возбудителей являются москиты рода *Phlebotomus*. Механизм передачи возбудителей — трансмиссивный, через укусы москитов.

Патогенез и клиническая картина. Различают две формы возбудителей кожного лейшманиоза: *L. tropica minor* — возбудитель антропонозного кожного лейшманиоза (городского типа) и *L. tropica major* — возбудитель зоонозного кожного лейшманиоза (сельского типа). При антропоножном кожном лейшманиозе инкубационный период составляет несколько месяцев. На месте укуса москита появляется бугорок, который увеличивается и через 3—4 мес изъязвляется. Язвы чаще располагаются на лице и верхних конечностях. Источниками возбудителя являются больной человек и собаки.

При зооножном кожном лейшманиозе инкубационный период составляет 2—4 нед. Заболевание характеризуется более острым течением. Язвы чаще локализуются на нижних конечностях. Резервуаром лейшманий являются песчанки, суслики, ежи. Заболевание распространено в Средней Азии, Средиземноморье и Закавказье. *L. braziliensis* вызывает кожно-слизистый лейшманиоз, характеризующийся фанулематозным и язвенным поражением

кожи носа и слизистых оболочек полости рта и гортани. Эта форма встречается преимущественно в Южной Америке. Висцеральный лейшманиоз (кала-азар, или черная болезнь) вызывается *L. donovani* и встречается в странах тропического и субтропического климата. Инкубационный период составляет 6—8 мес. У больных увеличиваются печень и селезенка, поражаются костный мозг и пищеварительный тракт.

Иммунитет. У переболевших остается стойкий пожизненный иммунитет.

Микробиологическая диагностика лейшманиоза. В исследуемом материале (мазки из бугорков, содержимого язв, окрашенных по Романовскому— Гимзе) обнаруживают мелкие овальной формы лейшманий. Делают также посевы на соответствующие питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя.

Лечение и профилактика. Для лечения висцерального лейшманиоза применяют препараты сурьмы (солюсурмин, неостибозан и др.) и ароматические диамидины (стильбамидин, пентамидин). В случае кожного лейшманиоза применяют акрихин, препараты сулемы, амфотерицин В, мономицин и др. С целью профилактики лейшманиозов уничтожают больных собак, проводят борьбу с грызунами и москитами. Осуществляют прививки живой культурой *L. tropica major*.

13.3 Возбудители микозов

Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами.

Названия болезней иногда связаны с локализацией патологического процесса (на коже — дерматомикозы, в легких — пневмомикозы и т. д.), иногда — с видом возбудителя (мукоромикоз, аспергиллез, трихофития и т.д.). Ниже приводится классификация возбудителей микозов.

I. Возбудители глубоких (системных) микозов: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*.

II. Возбудители подкожных (субкутанных) микозов: *Sporotrichum schenckii* и др.

III. Возбудители эпидермомикозов (дерматомикозов): *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* и др.

IV. Возбудители кератомикозов (поверхностных микозов): *Malassezia furfur*, *Cladosporium werneskii*, *Trichosporon cutaneum* и др.

V. Возбудители оппортунистических микозов: *Candida albicans*; различные виды родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* и др.

Характеристика микозов

Глубокие микозы напоминают хронические бактериальные инфекции, вызванные туберкулезной палочкой и актиномицетами. Первичные поражения обычно затрагивают легкие и протекают в форме острых пневмоний; иногда гематогенно распространяются по всему организму. Болезнь неконтагиозна. В доантибиотическую эру заканчивалась летально. Высокоэффективны полиеновые антимикотические препараты. Подкожные микозы характерны для жителей сельской местности в странах с жарким климатом. Образуются подкожные абсцессы и гранулемы, которые позже переходят в хронические язвы с поражением мягких тканей и костей — мицетомы.

Эпидермомикозы — хронические инфекции, обычно протекающие легко. Возбудители обитают на коже млекопитающих (изредка в почве) и передаются при контакте с больным животным или человеком.

Кератомикозы — редкие легкопротекающие заболевания. Эти заболевания — разноцветный лишай (малассезиоз), черный лишай (кладоспориоз), белая пьедра (трихоспороз) — на территории нашей страны практически не встречаются.

Оппортунистические микозы — аспергиллезы, кандидозы, мукорозы и др. — возникают на фоне иммунодефицитов. Многие из возбудителей являются представителями нормальной микрофлоры человека. Клиническая картина определяется локализацией процесса (местного или генерализованного). Исход заболевания в значительной степени обусловлен состоянием микроорганизма.

Диагностика микозов

Для диагностики микозов могут быть использованы микроскопические, микологические (культуральные), аллергические, серологические, биологические и гистологические методы исследования. В зависимости от патогенеза материалом для исследования могут быть гной, мокрота, пораженные волосы,

ногти, чешуйки кожи, пунктаты костного мозга, лимфатических узлов, внутренних органов, кровь, желчь, испражнения, биоптаты тканей и т. п. Микроскопическое исследование включает микроскопию нативных (неокрашенных) и окрашенных мазков. Для приготовления нативных препаратов волосы, соскобы кожи, ногтей просветляют в 10—30 % растворах КОН или NaOH. Обработанный лочью материал помещают на предметное стекло в каплю глицерина, накрывают покровным стеклом и микроскопируют (можно использовать фазово-контрастную микроскопию), что дает возможность изучить строение гриба, расположение спор, но окончательное заключение о видовой принадлежности гриба можно сделать только после культуральных исследований. Для окраски мазков чаще всего используют методы Грама, Циля—Нильсена, Романовского—Гимзы. Для окраски дерматофитов применяют также методы Сабуро, Адамсона и др. Культуральное (микологическое) исследование проводят для выделения чистой культуры гриба и ее идентификации. Используют плотные и жидкие питательные среды (Сабуро, сусло-агар, Чапека и др.). Инкубация в термостате В2—28 °С) длительная С—4 нед). Чистую культуру гриба идентифицируют по совокупности признаков: форме колоний, их цвету, консистенции, микроскопической картине (характер мицелия, расположение спор, конидиеносцев) и другим признакам. Серологические реакции для диагностики грибковых заболеваний проводят с фибковыми антигенами по общепринятым методикам, как и для диагностики других инфекционных заболеваний (РА, РП, РСК, РИГА, РИФ и др.). Аллергические пробы можно проводить по общепринятым методикам внутрикожным введением соответствующих аллергенов (полисахаридные и белковые фракции из клеток или клеточных оболочек, взвесь клеток убитых грибов, фильтраты культур). Для выявления ГНТ можно использовать тест дегрануляции тканевых и сывороточных базофилов, а для выявления ГЗТ — реакции торможения миграции фагоцитов, бластной трансформации лимфоцитов. Биологическое исследование проводят на лабораторных моделях (мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки, кошки). Биологическую модель микоза используют для выявления патогенности возбудителя, выделения чистой культуры, изучения новых антимикотиков. Гистологическое исследование дает возможность обнаружить гриб в тканях, изучить его

морфологию и особенности патологического процесса, вызванного им в организме.

Контрольные вопросы:

- 1.Лабораторная диагностика малярии
- 2.Профилактика лейшманиоза
- 3.Культуральные свойства возбудителей микозов
- 4.Классификация микозов
- 5.Патогенез и клиника малярии
- 6.Циклы развития плазмодий малярии
- 7.Профилактика микозов.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Тренинг Бумеранг

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается своё задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов, высказывает своё мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Морфология и тинкториальные свойства лейшманий
2. Плазмодии малярии - таксономия.
3. Профилактика микозов.

Задание для 2-ой группы

1. Микробиологическая диагностика микозов
2. Лечение и профилактика заболеваний, вызываемых лейшманиями
3. Источники заражения дерматомикозами.

Задание для 3-ой группы

1. Эпидемиология возбудителей малярии.
2. Таксономия возбудителя малярии.
3. Морфология и культуральные свойства микроскопических грибов.

Задание для 4-ой группы

1. Патогенез и клиника дерматомикозов
2. Таксономия возбудителей кандидозов

3. Культивирование и ферментативные свойства микроскопических грибов.

Задание для 5-ой группы

1. Микробиологическая диагностика малярии.
2. Патогенез и клиника лейшманиоза
3. Иммунитет при малярии

Задание для 6-ой группы

1. Лечение и профилактика кандидозов
2. Патогенез и клиника дерматомикозов
3. Лабораторная диагностика лейшманиоза.

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Возбудители	Морфология и тинкториальные свойства
1	Малярии	
2	Лейшманиоза	
3	Микозов	

ГЛАВА 14. ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ. ВОЗБУДИТЕЛИ СТОЛБНЯКА, ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ.

14.1 Патогенные клостридии

Среди большой группы споровых анаэробных бактерий, существующих в природе, есть патогенные для человека, вызывающие газовую гангрену, столбняк, ботулизм. Анаэробы имеют общие морфологические, тинкториальные, культуральные и биологические свойства. Патогенные анаэробы являются крупными грамположительными палочками, образующими круглые или

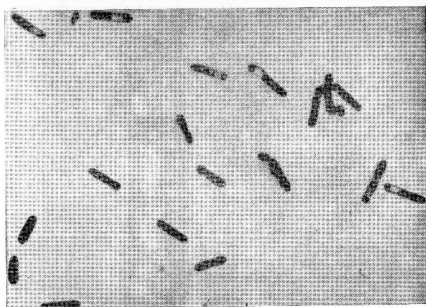
овальные споры, в процессе жизнедеятельности вырабатывающими экзотоксины. Возбудители анаэробных инфекций являются постоянными обитателями кишечника человека и животных, с испражнениями которых попадают в почву и в виде спор могут сохраняться длительное время.

14.2 Возбудители газовой анаэробной инфекции

Газовая анаэробная инфекция — полимикробная, возникающая при загрязнении ран почвой, с которой попадают возбудители инфекции. Сопровождается интоксикацией, поражением мышечной ткани, развитием отека и гангрены в месте ранения.

Таксономия. Возбудителями газовой гангрены являются *Cl.perfringens*, *Cl.novyi*, *Cl.septicum*, *Cl.histolyticum* (рис.37), *Cl.sordelli*, относящиеся к семейству *Bacillaceae*.

Морфологические и культуральные свойства. *Cl.perfringens* — крупные полиморфные палочки, неподвижные, образуют овальные споры, которые расположены субтерминально, в организме человека и животных образуют капсулу. Микробы обладают слабыми протеолитическими свойствами, имеют большой набор сахаролитических ферментов, сбраживают сахара с образованием кислоты и газа, способны быстро свертывать молоко (в течение 2—5 ч). *Cl.perfringens* делится на шесть сероваров: А, В, С, D, Е, F, выделяющих различные по антигенной структуре экзотоксины с летальными и некротическими свойствами. Клостридии А считаются основным возбудителем газовой гангрены: вызывают заболевание в 70—80% случаев. Споры клостридий А и F способны выдерживать температуру 100 °С от 1 до 6 ч.



Cl. septicum (чистая культура).

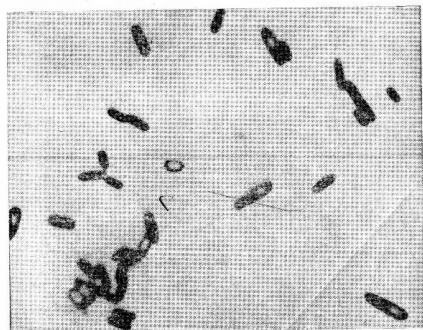


Рис. 43 *histolyticum* (чистая культура).

Cl.novyi — толстые крупные грамположительные палочки, подвижные, образуют овальные споры, которые расположены субтерминально, без капсул. Обладают слабыми протеолитическими свойствами. Сахаролитические свойства менее выражены, медленно свертывают молоко. Известны четыре серовара: А, В, С, D, способных вырабатывать различные по

антигенным свойствам токсины, которые обладают летальными, некротическими и гемолитическими свойствами. Споры устойчивы к различным факторам внешней среды, выдерживают кипячение в течение 1—2 ч, в почве сохраняются 7—8 лет.

Cl.septicum — полиморфные палочки, грамположительные, подвижные, образуют овальные споры, расположенные субтерминально; капсул не имеют(рис.37). Протеолитические и сахаролитические свойства выражены слабо, молоко свертывают через несколько дней, а глюкозу, мальтозу, лактозу ферментируют до кислоты. Возбудитель делится на шесть серологических типов, выделяет летальный, некротический и гемолитический токсины.

Cl.histolyticum — небольшие палочки, грамположительные, подвижные, образуют споры, которые располагаются субтерминально; без капсул(рис.38). Обладают сильными протеолитическими свойствами, разлагают желатин и свернутую сыворотку. Молоко пептонизируют до полного растворения казеина, углеводы не ферментируют. Вырабатывают экзотоксин, обладающий летальными и некротическими свойствами. Некроз мышечной ткани обусловлен действием выделяемых ферментов: коллагеназы, гиалуронидазы и лецитиназы.

Патогенез и клиника. Входными воротами инфекции является раневая поверхность, через которую вместе с разнообразными инородными телами (земля, обрывки одежды, осколки снарядов и др.) возбудители проникают в виде спор. Попавшие в рану споры в анаэробных условиях, которые возникают в результате сдавливания тканей и сосудов травматическим отеком, прорастают в вегетативные формы, размножаются, выделяя сильный экзотоксин. Под действием различных ферментов и токсинов, которые накапливаются в ране, нарушается кровообращение, после чего появляются отек, газообразование и некроз ткани. Ассоциации возбудителей газовой гангрены и условно-патогенных микроорганизмов, попавших в рану, усиливают токсический эффект и значительно отягощают течение газовой гангрены. Инкубационный период длится 2—5 дней. Клиническая картина заболевания разнообразна. Различают четыре основные клинические формы:

1.Эмфизематозная — характеризуется обильным газообразованием в ране. Возбудителем этой формы являются *Cl.perfringens* и *Cl.septicum*.

2. Смешанная — отличается отеком и газообразованием. Из раны выделяется пенистая жидкость красного цвета. Возбудителями являются ассоциации анаэробных микробов.

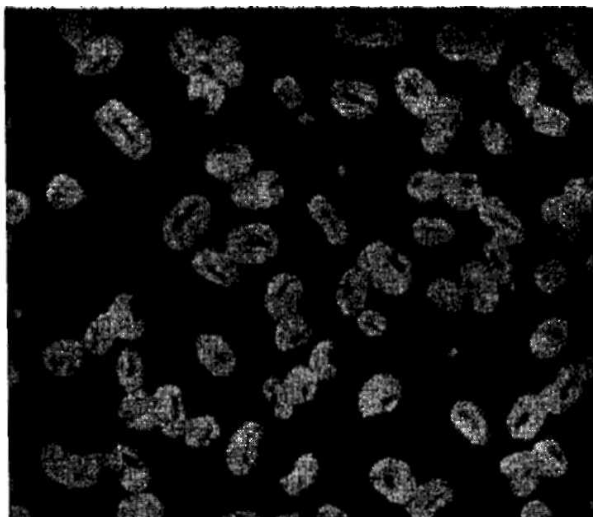


Рис.39. *Cl. perfringens* в мазке из органов животного, пораженного газовой гангреной.

3. Токсическая — характеризуется быстрым развитием отека с резким побледнением кожи. Возбудителем этой формы является *Cl. novyi*.

4. Флегмонозная — сопровождается отеком без тенденции к распространению; отделяемое гнойное. Эта форма

возникает в случае присоединения вторичной инфекции, сопровождающейся нагноением.

Иммунитет. После перенесенного заболевания непродолжительный и нестойкий.

Лабораторная диагностика. Материалом для бактериологического исследования служат кусочки некротизированной ткани, отечная жидкость, обрывки одежды, частицы земли, кровь (рис. 39) Готовят мазки-отпечатки для микроскопического исследования, окрашивают по Граму и по Гинсу для обнаружения капсул. Бактериологический метод заключается в посеве на среду Китта-Тароцци, молоко, кровяной агар, агар Вильсона-Блера и идентификации выделенных культур. При биологическом методе фильтрат патологического материала вводят внутримышечно морским свинкам или белым мышам. В случае гибели зараженных животных дополнительно ставят реакцию нейтрализации на мышах с антитоксическими сыворотками против токсинов возбудителей газовой гангрены для определения вида.

Эпидемиология. Естественной средой обитания возбудителей газовой гангрены является кишечник человека или животных. При выделении с испражнениями происходит загрязнение почвы. Клостридии попадают в раны при их загрязнении землей, обрывками одежды, осколками (во время войн). При этом не всегда наступает заболевание: его развитию способствуют ослабление защитных сил макроорганизма, наличие обширных ран с

размножением мягких тканей, образованием кровяных сгустков, нарушением кровообращения и при попадании в рану достаточного количества микробов.

Специфическое лечение и профилактика. Необходимо своевременное введение раненым поливалентной противогангренозной антитоксической сыворотки с последующим введением (после бактериологического исследования) видоспецифической сыворотки.

Для профилактики газовой гангрены применяется очищенный адсорбированный полианатоксин.

Изучение характера роста *Cl.perfringens* на среде Китта-Тароцци, молоке (демонстрация).

Универсальной средой для культивирования анаэробов является среда Китта-Тароцци, состоящая из сахарного бульона и кусочков животной ткани. Животные ткани, особенно ткань печени обладают способностью связывать кислород воздуха. Перед посевом кислород удаляют из среды путём прогревания её на кипящей водяной бане в течение 1.0-30 минут с последующим быстрым охлаждением. После посева среды заливают слоем стерильного вазелинового масла. В качестве плотной среды для культивирования анаэробов пользуются сахарным или кровяным агаром.

Посмотрите пробирку со свёрнутым молоком, молоко свёртывается быстро - в течение 2-5 часов

14.3 Возбудитель столбняка

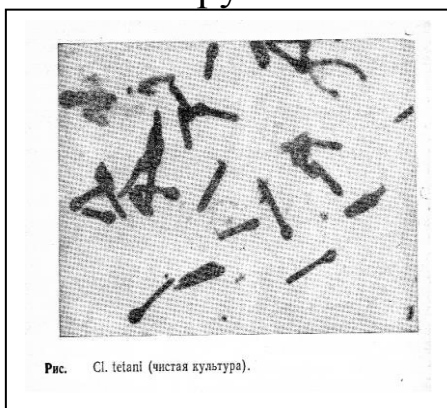
Столбняк (от tetanos — оцепенение, судороги) — острое инфекционное заболевание, характеризующееся поражением двигательных клеток центральной нервной

системы и развитием тонических и клонических судорог поперечнополосатых мышц.

Таксономия. Возбудитель столбняка *Clostridium tetani* относится к семейству Bacillaceae, роду *Clostridium*.

Морфология и хинкториальные свойства. Возбудитель столбняка имеет форму палочки длиной 4—8 мкм, шириной 0,4—0,6 мкм, с закругленными концами; она подвижна, образует круглую спору, расположенную терминально, что придает ей вид барабанной палочки. Микробы грамположительны в молодых культурах (рис. 40).

Культивирование и ферментативные свойства. Возбудитель столбняка — строгий анаэроб, хорошо растет на простых питательных средах. При посеве на плотные питательные среды, помещенные затем в анаэроостат, через 2—4 сут вырастают прозрачные или слегка сероватые колонии. При росте на кровяном агаре колонии окружены зоной гемолиза.



45

Столбнячные палочки обладают слабыми протеолитическими и сахаролитическими свойствами, медленно сбраживают молоко.

Антигенная структура и токсинообразование. Cl.tetani имеет жгутиковый Н-антиген, специфический, термолабильный и групповой соматический О-антиген. Известно 10 сероваров, отличающихся по Н-антигену, но продуцирующих однородный экзотоксин, который является основным фактором патогенности и состоит из двух компонентов: тетаноспазмина и тетаногемолизина. Тетаноспазмин поражает клетки нервной системы, вызывает тоническое сокращение поперечно-полосатых мышц. Тетанолизин разрушает эритроциты.

Резистентность. Вегетативные формы чувствительны к воздействию физических и химических агентов, при температуре 60—70 °С погибают в течение 30 мин. Споры обладают устойчивостью к действию физических и химических факторов, при кипячении погибают через 30—50 мин; 5% раствор сулемы вызывает их гибель через 8—10 ч.

Патогенность для животных. К экзотоксину чувствительны лошади, крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, собаки, кошки, белые мыши, морские свинки. Экспериментальный столбняк развивается у животных по типу восходящего столбняка. Вначале наступает паралич конечности, куда был введен токсин, а затем паралич распространяется на мускулатуру туловища, шеи. Токсин

достигает пирамидальных клеток передних рогов спинного мозга и животное погибает.

Патогенез и клиника. Входными воротами инфекции являются поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки, у новорожденных — пупочная рана, у рожениц — слизистая оболочка матки. Попавшие в рану споры прорастают в вегетативные формы, размножаются, выделяют экзотоксин. При накоплении в ране экзотоксин продвигается по двигательным волокнам периферических нервов, через кровь и достигает центральной нервной системы. Инкубационный период длится от 5 до 14 дней. Болезнь начинается остро, с тонического сокращения жевательных мышц (тризм), зубы крепко сжаты и рот открыть невозможно. Затем развиваются судороги мимических мышц лица, получившие название сардонической улыбки. Ригидность распространяется на мышцы шеи, спины, живота и конечностей. Развивается клиническая картина нисходящего столбняка. Смерть наступает от асфиксии и паралича сердца.

Иммунитет. Непродолжительный и слабонапряженный; возможно повторное заболевание.

Лабораторная диагностика. Проводится только для подтверждения клинического диагноза: у больного берут кусочки ткани, выделения из раны, исследуют также инородные тела, обрывки одежды, перевязочный материал. Полученный материал засевают в среду Китта-Тароцци и после культивирования в течение 4—6 сут микроскопируют мазки из посевов, исследуют культуральную жидкость на наличие столбнячного токсина. Для выявления токсина ставят реакцию нейтрализации с противостолбнячной сывороткой на белых мышах; можно также использовать РНГА и люминесцентно-серологический метод с применением противостолбнячных сывороток, меченных изотиоцианатом флюоресцеина.

Эпидемиология. Столбнячные палочки являются постоянным обитателем кишечника животных и человека, попадают с фекалиями в почву и сохраняются в ней в виде спор десятилетиями. Удобряемые и унавоженные почвы значительно больше обсеменены спорами столбнячного микроба, чем неудобренные. Чаще болеют дети и люди, работающие в сельском хозяйстве. Заболевание связано с травматизмом, когда в рану из почвы попадают споры. Заболевание может возникнуть в случае даже

незначительных повреждений кожи и слизистых оболочек (уколы острыми предметами, занозы), при ожогах, отморожениях.

Специфическое лечение и профилактика. Специфическая терапия заключается в своевременном введении противостолбнячной антитоксической сыворотки. Сыворотку вводят внутримышечно по Безредке (с предварительной десенсибилизацией) в дозах от 100000 до 200000 МЕ. С целью лечения используются также гамма-глобулин и антибиотики.

Для создания искусственного активного иммунитета применяют адсорбированный столбнячный анатоксин. Для иммунизации используют ассоциированные вакцины АКДС, АДС, TABte.

Изучение морфологии патогенных анаэробов. Посмотреть и зарисовать готовые препараты из чистых культур — *Cl.tetani*, *Cl.perfringens*, *Cl.septicum*, *Cl.histolyticum*. *Cl.batulinikum*.

Возбудители анаэробных инфекций — столбняка, газовой гангрены ботулизма — относятся к роду *Clostridium*.

Это крупные палочки, образующие споры, они подвижны имеют перитрихальные жгутики, за исключением *Cl. perfringens*.

По методу Грама окрашиваются положительно.

Столбнячная палочка (*Cl. tetani*.) имеет палочковидную форму с округлой терминально расположенной спорой, Грамположительная окраска, образует очень сильный нейротропный экзотоксин.

Возбудитель ботулизма- (*Cl. botulinikum*)- крупная, подвижная, спорообразующая грамположительная палочка. Спора овальной формы, располагающаяся субтерминально, В анаэробных условиях может образовать очень сильный экзотоксин обладающий нейтропным действием.

Столбняк у белой мыши (демонстрация)

Столбнячный токсин: демонстрация мыши, получившей столбнячный токсин. Мышам вводят внутримышечно в область задней лапки одну смертельную дозу (D_{1m}) столбнячного токсина. На следующий день у мыши развивается типичная картина столбнячной интоксикации- спастическое сокращение мышц задней конечности и хвоста ("хвост дугой").

14.4 Препараты для профилактики и лечения анаэробных инфекций.

Столбнячный анатоксин очищенный, адсорбированный. Гидроокисью алюминия. Столбнячный анатоксин представляет собой фильтрат бульонной культуры столбнячной палочки, обезвреженной формалином и теплом, очищенный от балластных веществ и адсорбированный на гидроокиси алюминия; в 1 мл препарата содержится 20 ЕС (единиц связывания) столбнячного анатоксина. По внешнему виду это мутная беловатая жидкость, при стоянии дающая осадок, легко разбивающийся при встряхивании. Применяют препарат для профилактики столбняка, вводят подкожно двукратно по 0,5 мл с интервалами в 40-45 дней. Ревакцинацию производят через 9—12 месяцев. Срок годности 3 года.

Противостолбнячная сыворотка. Препарат представляет собой сыворотку крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином. Сыворотку очищают и концентрируют методом. Диаферм-3. В 0,1 г белка должно содержаться не менее 300 МЕ анатоксина. По внешнему виду это прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость желтоватого цвета. Для профилактики вводят подкожно или внутримышечно 300 МЕ, для лечения—100000-200000 МЕ. В зависимости от тяжести заболевания вводят внутримышечно, внутривенно или в спинномозговой канал. Срок годности 2 года.

Противостолбнячный человеческий иммуноглобулин. Препарат получают из сыворотки крови доноров, иммунизированных очищенным сорбированным столбнячным анатоксином. В 1 мл препарата содержится не менее 150 МЕ столбнячного анатоксина. Применяют для профилактики и лечения столбняка.

Противогангренозная сыворотка (счищенная, концентрированная) противоперфрингенс типа А, противоэдематическая, противосептикум. Препарат представляет собой сыворотку крови лошадей, гипериммунизированных анатоксинами или токсинами перечисленных микробов. Противогангренозные сыворотки выпускают в виде поливалентных препаратов (в комплекте), очищенных и концентрированных методом ДИАФЕРМ-3. В 0,1 г белка содержится; в сыворотке противоэдематическая не менее 500 МЕ и противосептикум - не менее 500 МЕ, противоперфрингенс не менее 300 МЕ. По внешнему виду это

прозрачные или слегка опалесцирующие желтоватые жидкости, Применяют сыворотку для лечения, вводят внутривенно в дозе 150000 МЕ (по 50000 МЕ каждого вида).. С профилактическими целями вводят внутримышечно 30000 МЕ. Срок годности 2 года.

Контрольные вопросы:

1. Морфологические и биологические свойства возбудителей анаэробных инфекций
2. Методы культивирования и выделения чистых культур анаэробов
3. Характеристика возбудителя столбняка и патогенез заболевания.
4. Характеристика возбудителей раневых анаэробных инфекций.
5. Характеристика возбудителя ботулизма и патогенез заболевания
6. Препараты для профилактики и лечения анаэробных инфекций

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 20

При поступлении в хирургическое отделение новой партии кетгута образцы его были направлены для исследования в бактериологическую лабораторию.

1. С какой целью был направлен кетгут в лабораторию?
2. Какие исследования нужно провести, чтобы оценить пригодность кетгута к употреблению?

Ситуационная задача № 21

Пострадавший в транспортной катастрофе был доставлен в стационар с обширными ранами, загрязненными почвой.

1. Какие бактерии могли быть занесены в рану с почвой?
2. Какие меры специфической профилактики следует провести в этом случае?

Тренинг Бумеранг

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается своё задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов, высказывает своё мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Какие возбудители относятся к патогенным клостридиям
2. Таксономия возбудителя столбняка
3. Патогенез и клиника газовой гангрены.

Задание для 2-ой группы

1. Патогенность для животных возбудителя газовой гангрены
2. Антигенная структура возбудителя столбняка
3. Таксономия возбудителей раневых инфекций

Задание для 3-ой группы

1. Эпидемиология столбняка
2. Патогенез и клиника газовой гангрены
3. Таксономия возбудителя столбняка

Задание для 4-ой группы

1. Специфическое лечение и профилактика газовой гангрены
2. Иммуниет к столбняку
3. Резистентность возбудителя столбняка.

Задание для 5-ой группы

1. Культивирование и ферментативные свойства клостридий
2. Таксономия клостридий.
3. Морфология и тинкториальные свойства возбудителя столбняка

Задание для 6-ой группы

1. Антигенная структура и токсинообразование возбудителя столбняка.
2. Морфология и культуральные свойства возбудителей газовой анаэробной инфекции.
3. Резистентность возбудителя столбняка.

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в

таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Возбудители зоонозных инфекций, патогенные клостридии.	Антигенная структура и токсинообразование
1	Возбудители газовой анаэробной инфекции	
2	Возбудитель столбняка	

ГЛАВА 15. ОСОБО ОПАСНЫЕ ЗООНОЗНЫЕ ИНФЕКЦИИ(СИБИРЕЯЗВЕННЫЕ БАЦИЛЛЫ,ВИБРИОНЫ ХОЛЕРЫ).

15.1 Возбудитель сибирской язвы

Сибирская язва — острое инфекционное заболевание, характеризующееся образованием специфических карбункулов или поражением легких, кишечника.

Таксономия. Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* относится к семейству *Bacillaceae*. Открыт в 1849 г. А. Поллендером.

Морфология и тинкториальные свойства. Возбудители сибирской язвы — крупные палочки длиной 6—8 мкм, шириной 1—2 мкм, с обрубленными концами, неподвижные, грамположительные (рис.41). В организме способны образовывать капсулу, во внешней среде — овальные споры, располагающиеся центрально. При размножении на средах складываются в длинные цепочки или нити.

Культивирование и ферментативные свойства. Бациллы являются аэробами, нетребовательны к питательным средам.

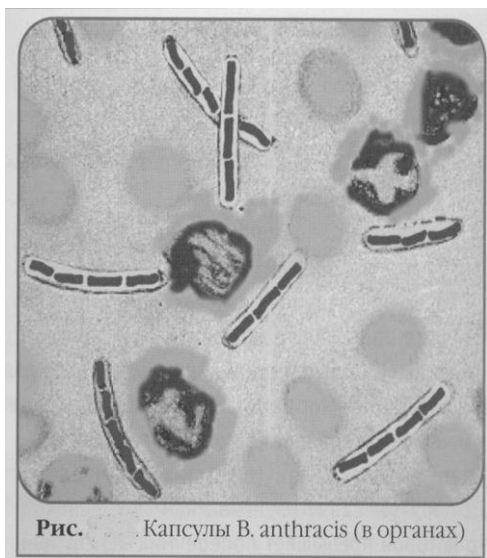


Рис. . Капсулы *B. anthracis* (в органах)

При росте на мясо-пептонном агаре образуются зернистые колонии с серебристо-серым бахромчатым краем (R-форма), характерные для вирулентных штаммов. При росте на мясо-пептонном бульоне дают рост в виде комка ваты на дне пробирки без помутнения среды. Обладают ярко выраженной биохимической активностью: разлагают глюкозу,

мальтозу до кислоты, свертывают молоко в течение 3—4 дней, а затем сгусток казеина медленно пептонизируют, разжижают желатин в виде «опрокинутой елочки».

Антигенная структура и токсинообразование. Сибиреязвенные бациллы имеют два антигена: 1) соматический, полисахаридный антиген, находящийся в клеточной стенке, термостабильный; 3) капсульный — протеиновый, термолабильный. Образованные к ним в организме антитела не обладают защитными свойствами. Сибиреязвенные бациллы способны продуцировать протективный (защитный) антиген белковой природы, обладающий высокими иммунизирующими свойствами. В организме человека и восприимчивых животных возбудитель образует особый токсин, характеризующийся как воспалительным, так и летальным действием.

Резистентность. Вегетативные формы сибиреязвенного микроба чувствительны к факторам внешней среды — при нагревании до 50°C погибают через 30 мин. Высокой резистентностью отличаются споры, которые могут длительное время сохраняться при самых неблагоприятных условиях: в воде — несколько лет, в почве — десятки лет.

Патогенность для животных. В естественных условиях восприимчивы к сибирской язве крупный рогатый скот, овцы, лошади, свиньи. Из лабораторных животных наиболее чувствительны белые мыши и морские свинки. Заражение домашних животных происходит при поедании инфицированного корма. Заболевание сопровождается поражением кишечника и выделением большого количества возбудителей с испражнениями. Возбудитель может проникать из кишечника в кровь, органы и животное погибает в течение 2—3 сут.

Патогенез и клиника. Заболевание у человека в зависимости от входных ворот инфекции проявляется в различных клинических формах: кожной, легочной и кишечной.

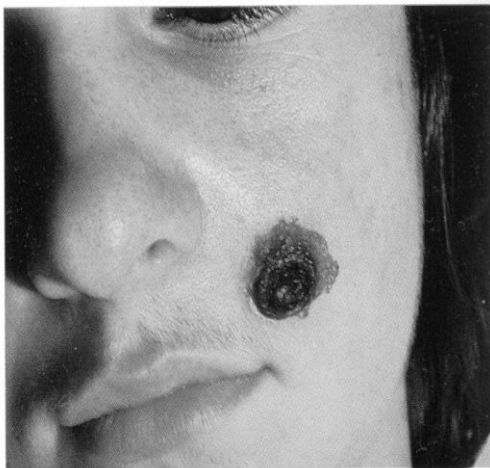


Рис. Сибирская язва.

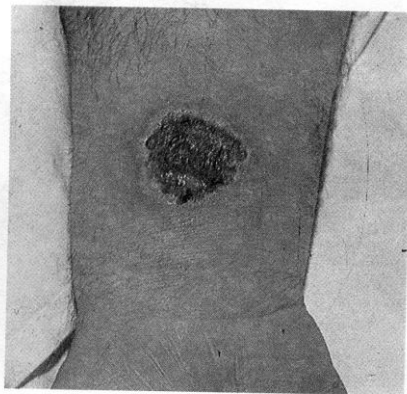


Рис. Сибирская язва, кожная форма. Карбункул на нижней трети предплечья (по В. Н. Никифорову и В. В. Никифорову).

Кожная форма чаще всего встречается у лиц, работающих с животными. Заражение происходит при проникновении возбудителя через поврежденную кожу. Инкубационный период длится 1—3 дня. На месте внедрения возбудителя образуется папула, пузырек, наполненный прозрачной или кровянистой жидкостью. При расчесах пузырек вскрывается и образуется язва — сибиреязвенный карбункул. Чаще всего сибиреязвенные поражения локализуются на лице, руках и других открытых частях тела (рис.42,43). При своевременном лечении кожная форма сибирской язвы обычно заканчивается выздоровлением. При неблагоприятном течении возбудители проникают в кровь, и больной может умереть от сепсиса.

Легочная форма возникает только у человека вследствие попадания возбудителя в верхние дыхательные пути. Заболевание начинается остро, протекает тяжело, с развитием бронхопневмонии.

Кишечная форма развивается при попадании возбудителя вместе с пищей и водой. Патологический процесс локализуется в

кишечнике, возбудители выделяются с испражнениями. При легочной и кишечной формах прогноз неблагоприятный.

Иммунитет. После перенесенного заболевания остается нестойкий иммунитет и возможны рецидивы.

Лабораторная диагностика. Для исследования берут отделяемое язвы, мокроту, испражнения, кровь. Из патологического материала готовят мазки, окрашивают по Граму, а также специальным методом для обнаружения капсул. Наличие в мазках крупных грамположительных палочек, расположенных попарно или в виде цепочек, окруженных капсулами, дает основание предположить наличие возбудителей сибирской язвы. Окончательный диагноз ставится после выделения чистой культуры и заражения животных. Белые мыши, зараженные подкожно, погибают от сибирской язвы через 1—2 сут, морские свинки — через 2—4 сут при явлениях общего сепсиса.

Для обнаружения сибиреязвенного антигена (в тех случаях, когда невозможно выделить возбудителя, например, из кожи, шерсти давно погибших животных, почвы) применяется реакция термореципитации

Асколи. Эта реакция позволяет обнаруживать сибиреязвенный антиген в тех случаях, в которых микробиологические методы дают отрицательные результаты. Для постановки реакции Асколи из исследуемого материала экстрагируют антиген путём кипячения в изотоническом растворе хлорида натрия. Полученный прозрачный раствор антигена наслаивают на преципитирующую сибиреязвенную сыворотку. При положительной реакции на месте соприкосновения двух жидкостей (антигена и антитела) образуется помутнение - кольцо преципитации (реакция кольцепреципитации).

Реакция Асколи отличается высокой чувствительностью.

Для постановки диагноза сибирской язвы применяют на коже аллергическую пробу, которая бывает положительной с конца 1-й недели болезни.

Эпидемиология. Сибирская язва — зоонозная инфекция, источником которой являются домашние животные (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, свиньи). Заражение человека происходит чаще контактным, реже алиментарным, воздушно-пылевым и трансмиссивным путем. Заболевание часто носит профессиональный характер и наблюдается у рабочих

животноводческих ферм и кожевенных заводов, ветеринарных работников.

Специфическое лечение и профилактика. Для лечения сибирской язвы применяются антибиотики: пенициллин, тетрациклин, стрептомицин, а также специфический противосибиреязвенный гамма-глобулин.

Для профилактики используется живая сибиреязвенная вакцина СТИ—1. Её применяют для иммунизации людей и животных по эпидемиологическим показателям.

Сибиреязвенная живая сухая вакцина (СТИ)

Вакцина представляет собой высушенную методом лиофилизации взвесь живых спор вакцинного штамма сибиреязвенных бескапсульных бактерий. По внешнему виду это однородная пористая масса или порошок белого или желтоватого цвета. Вакцина полностью ресуспендируется при добавления 1 мл 30% глицерина. Вакцину применяют накожно однократно. Срок годности 3 года.

Противосибиреязвенный глобулин. Препарат представляет собой гамма- и бета-глобулиновые фракции сыворотки крови лошадей, иммунизированных сибиреязвенным антигеном. Глобулины извлекают из сыворотки методом спиртового осаждения при низких температурах. По внешнему виду это слегка опалесцирующая жидкость. Препарат применяют для лечения и профилактики сибирской язвы. Срок годности 2 года.

Возбудители зоонозных инфекций - бруцеллеза, сибирской язвы, туляремии, чумы а также холеры относятся к особо опасным карантинным (чума) инфекциям, поэтому работа с ними разрешена специально обученным сотрудникам в лабораториях строгого режима. При работе с возбудителями особо опасных инфекций следует соблюдать следующие правила, предусмотренные инструкцией о режиме работы с возбудителями особо опасных инфекций:

15.2 Правила, предусмотренные инструкцией о режиме работы с возбудителями особо опасных инфекций:

1) При отборе проб пользоваться специальным набором для взятия материала при особо-опасных заболеваниях.
2) Персонал, производящий отбор проб, должен иметь индивидуальные средства защиты противогаз, защитный костюм, полный противочумный костюм и др.

3) Собранный в очагах материал упаковывают в тару, которую снаружи обрабатывают дезинфицирующим раствором и специальным транспортом направляют в лабораторию.

4) К материалу прилагают документ, в котором указывают место отбора проб, название объекта, дату и время отбора, должность и фамилию лица, отбиравшего пробу.

5) Лица, производящие отбор проб, проходят полную санитарную обработку с дезинфекцией индивидуальных средств защиты.

6) Работа с заразным материалом, доставленным в лабораторию, проводится над металлической кюветой с дезинфицирующим раствором на столах, покрытых свинцом или нержавеющей металлом; Лицо, производящее исследование, работает в специальном костюме (комбинезон, маска, халат, очки, сапоги, фартук, резиновые перчатки).

7) После окончания работы снятие одежды производится в определенном порядке, исключающем попадание материала на незащищенную поверхность;

8) Пробы заразного материала сохраняются в лаборатории до окончания исследования;

15.3 Возбудитель холеры

Холера - «особо опасное» острое (карантинное) антропонозное заболевание, характеризующееся общей интоксикацией, поражением тонкого кишечника, нарушением водно-солевого обмена. высокой летальностью и склонностью к быстрому эпидемическому распространению. Ввиду этого вся работа с холерным материалом производится в специализированных режимных лабораториях и специально организуемых лабораториях в очагах холеры по решению противоэпидемического штаба.

Возбудитель холеры относится к роду вибрионов, среди которых наряду с патогенными встречаются условнопатогенные и непатогенные холероподобные вибрионы. В настоящее время известны три разновидности холерных вибрионов: вибрион азиатской холеры, вибрион Эль—Тор, холероподобный вибрион (НАГ-вибрион).

Современная холера регистрируется в эндемическом очаге биотипом Эль—Тор, который почти вытеснил классический холерный вибрион. Часто обнаруживаются неагглютинирующиеся холерной сывороткой вибрионы, получившие сокращённое название - НАГ-вибрион.

Название заболевания происходит от латинских слов: *chole* — желчь и *rheo* — теку, так как в древности предполагалось, что причиной холеры является излияние желчи.

Таксономия. Возбудители холеры представлены двумя биоварами: *Vibrio cholerae* biovar *cholerae* (открыт Р. Кохом в 1883 г.) и *Vibrio cholerae* biovar *eltor* (открыт Ф. Готшлихом в 1906 г.) и относятся к семейству *Vibrionaceae*, роду *Vibrio*.

ли

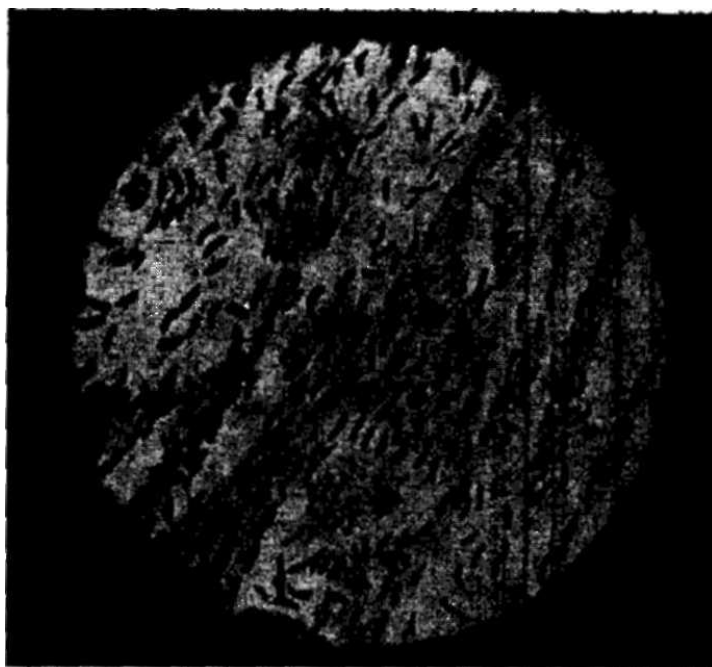


Рис.44. Холерный

Морфология и тинкториальные свойства. Возбудители холеры имеют форму палочки, слегка изогнутой в виде запятой, длиной 2—3 мкм, шириной 0,5 мкм. Характеризуются значительным полиморфизмом, могут иметь форму нитей, кокков, палочек. Вибрионы подвижны (монотрихи), спор и капсул не образуют, грамотрицательны (рис. 44, 45).

Культивирование и ферментативные свойства. Холерные вибрионы — аэробы, неприхотливы к питательным средам, хорошо

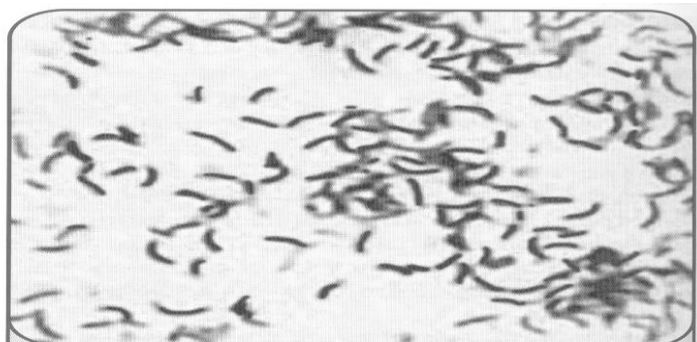


Рис. Чистая культура *V. cholerae*. Окраска по Граму. Вибрионы (от лат. *vibrio* — вибрировать) — прямые или изогнутые грамотрицательные палочки (0,3—1,3 × 1,4—5 мкм). Подвижны (монотрихи). Факультативные анаэробы. Оптимум роста при pH 8,5—9,0

растут в 1 % пептонной воде, при щелочной реакции среды (pH 8,5—9,0). На 1% пептонной воде уже через 6—8 ч образуют нежную голубовато-серую пленку и легкое помутнение среды. На щелочном агаре через 10—12 ч вырастают колонии круглые, гладкие, мелкие, прозрачные,

голубоватого цвета.

Возбудители холеры биохимически очень активны: протеолитическими ферментами разжижают желатин и образуют индол, ферментируют до кислоты лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу и в течение 5 ч расщепляют крахмал. По отношению к трем углеводам — маннозе, сахарозе, арабинозе — все вибрионы делятся на 8 групп (триада Хейберга). Холерные вибрионы относятся к первой группе Хейберга — разлагают маннозу и сахарозу и инертны в отношении арабинозы.

По морфологическим и биохимическим свойствам с холерными вибрионами сближаются неагглютинирующиеся противохолерной 0-сывороткой так называемые НАГ-вибрионы. Эти вибрионы агглютинируются собственными сыворотками и вызывают доброкачественную диарею. Обнаружение НАГ-вибрионов у лиц с кишечными заболеваниями может предшествовать вспышке холеры. Антигенная структура и токсинообразование. Возбудители холеры имеют соматический О-антиген и жгутиковый Н-антиген. Н-антиген является общим для всего рода как холерных, так и холероподобных вибрионов. Все вибрионы по О-антигену делятся на 54 серогруппы. Классический биовар холерного вибриона и биовар Эль-Тор имеют общий О-антиген и относятся к серогруппе 0-1. Японские исследователи установили, что серогруппа 0-1 делится на три серовара: Огава, Инаба, Гикошима (названия даны в честь ученых, изучивших свойства вибрионов). Серовар Огава содержит компоненты А и В, Инаба — А и С, а промежуточный

Гикошима — компоненты А, В, и С О-антигена. Наиболее часто встречаются серовары Огава и Инаба.

Холерные вибрионы продуцируют токсические субстанции трех типов. Токсин I типа обладает свойствами эндотоксина — выделяется при аутолизе микробных клеток. Этот токсин находится в клеточной оболочке микробной клетки, термостабилен, по природе липополисахарид, является носителем видовой и типовой специфичности. Его роль связана, по-видимому, с продукцией вибриоцидных антител — фактора, определяющего развитие антибактериального иммунитета. Токсин II типа — экзотоксин, обнаруживается в фильтрате пептонной культуры холерных вибрионов, характеризуется термолабильностью (инактивируется при 56 °С в течение 15—30 мин). Токсин II типа называют холерным экзотоксином, холерогенным токсином или холерогеном. Холероген состоит из двух фракций: собственно холерогена и цитотоксина. С холерогенным токсином связано развитие диареи при холере; в эксперименте на кроликах он вызывает развитие холероподобного синдрома. У людей холероген воздействует на энзимный процесс, резко усиливает функцию секреторных клеток тонкого кишечника, в результате чего происходит обезвоживание организма. Вторая фракция — цитотоксины — оказывают цитопатическое действие на культуры тканей. Основная патогенетическая роль принадлежит токсинам II типа. Токсины III типа термостабильны, подавляют активный транспорт натрия через эпителий кишечника.

Резистентность. Холерные вибрионы характеризуются относительно невысокой резистентностью. При температуре 56 °С они гибнут через 25—30 мин, очень чувствительны к действию 3% раствора карболовой кислоты, погибают через 3—5 мин. Соляная и серная кислоты в разведении 1:10000 убивают вибрионы в течение нескольких минут. Вибрионы очень чувствительны к действию солнечного света. При низких температурах они могут сохраняться в испражнениях, почве, воде от нескольких недель до 2—3 мес. На различных пищевых продуктах, овощах, фруктах со щелочной или нейтральной реакцией при температуре 20—25 °С и рассеянном свете вибрионы могут сохраняться в течение 2—3 сут. Вибрионы Эль-Тор характеризуются большей резистентностью во внешней среде, устойчивы к полимиксину М и В, что является одним из тестов дифференциации от классического вибриона.

Патогенез и клиника. Возбудители холеры проникают в организм человека через рот. Часть холерных вибрионов погибает в кислой среде желудочного сока, часть попадает в просвет тонкой кишки, где микробы интенсивно размножаются вследствие щелочной реакции среды и большого количества пептона — основного продукта расщепления белков. В процессе размножения холерных вибрионов выделяется большое количество токсинов. Холерные токсины повышают проницаемость сосудистой стенки тонкого кишечника, вследствие чего в его просвет поступает большое количество жидкости, которая не успевает всасываться в толстой кишке. В результате переполнения кишечника жидкостью возбуждается перистальтика и начинается профузный понос. Структурных повреждений в эпителиальных клетках кишечника не происходит. В тонкой кишке в щелочной среде кишечного содержимого вибрионы интенсивно размножаются как в просвете, так и располагаясь кучками между ворсинками слизистой оболочки. Появляющаяся рвота усиливает процесс обезвоживания организма больного и потери им электролитов. Рвота, как полагают, имеет центральное происхождение и возникает вследствие развившегося ацидоза.

Инкубационный период при холере варьирует от нескольких часов до 6 дней (в среднем 2—3 дня). В зависимости от степени тяжести заболевания холера может протекать в разных клинических формах: от легких, стертых, атипичных форм до тяжелых коматозных состояний с летальностью до 30%. Начало болезни обычно острое, характеризуется развитием холерного энтерита. В первые сутки бывают частые позывы на дефекацию (до 10 раз). В последующие дни, если заболевание прогрессирует, развивается вторая фаза — холерный гастроэнтерит: стул становится еще более частым и появляется многократная, обильная рвота. Потеря жидкости с рвотными массами и вследствие профузного поноса за сутки может достигать 30 л, что приводит к значительному уменьшению объема циркулирующей плазмы, гипотонии, коронарной недостаточности, снижению температуры тела. Наиболее тяжелая форма холеры — холерный алгид (от *algus* — холодный). Длительность алгидной формы — от нескольких часов до нескольких дней; для нее характерны понижение температуры тела до 35—34°C, цианоз кожи, затемненное сознание,

одышка. Заболевания, вызываемые вибрионом Эль-Тор, протекают значительно легче.

Иммунитет. После перенесенного заболевания остается прочный иммунитет, повторные заболевания бывают редко. Невосприимчивость к повторному заболеванию холерой обуславливается образованием антител — вибриолизина. В 1965 г. Фрертер и др. описали наличие в содержимом кишечника больных холерой копроантител, которым придают большое значение в развитии иммунитета при этом заболевании.

Лабораторная диагностика. Имеет большое значение для установления точного диагноза холеры и тем самым способствует своевременному проведению противоэпидемических мероприятий. Бактериологический метод является основным и применяется с целью диагностики типичных и атипичных случаев болезни, выявления носителей вибрионов, контактировавших с больными, объектов внешней среды. В лабораторию направляют испражнения (напоминающие рисовый отвар), рвотные массы, трупный материал, пищевые продукты, воду, смыв с объектов внешней среды. Огромное значение имеет правильность взятия материала, своевременность доставки его в лабораторию. Из испражнений готовят мазки и окрашивают по Граму. На основании микроскопии ставится только ориентировочный диагноз. При бактериологическом исследовании материал засевают на 1% пептонную воду и щелочной агар. Для идентификации выделенных культур изучают морфологию, характер роста на 1 % пептонной воде, подвижность, ферментативную активность, антигенные свойства, фаголизависимость специфическими монофагами, гемолитические свойства, способность агглютинировать куриные эритроциты, чувствительность к полимиксину, гексаминовый тест. Окончательное заключение о выделении возбудителя холеры с указанием биовара и серовара дается через 36—48 ч. Дифференциация классического биовара холерного вибриона от холерных вибрионов Эль-Тор основана на различии некоторых биологических свойств.

Бактериологическое исследование воды. Для обнаружения холерных вибрионов в воде берут 900 мл исследуемой воды и добавляют 100 мл основного раствора пептона (из расчета 1 часть питательной среды на 9 частей исследуемой воды). В дальнейшем исследование проводят по общей схеме.

С целью ретроспективного диагноза у переболевших и вибрионосителей и для определения напряженности иммунитета проводят серологическое исследование. С этой целью применяются реакция агглютинации, РПГА, реакция определения вибриоцидных антител, определение копроантител.

Ускоренные методы обнаружения холерных вибрионов в выделениях больных, вибрионосителей и объектов внешней среды: 1) люминесцентно-серологический метод, основанный на том, что в мазках, приготовленных из исследуемого материала и обработанных люминесцентной сывороткой, при положительной реакции наблюдается свечение вибрионов под люминесцентным микроскопом; 2) метод микроагглютинации нативного материала. Реакция ставится на стекле с нативным материалом и холерной О-сывороткой. При наличии в нативном материале вибрионов через 6—10 мин в капле с сывороткой выпадают хлопья. 3) Метод иммобилизации вибрионов под влиянием специфической холерной О-сыворотки (просматривание раздавленной капли в фазоконтрастном или темнопольном микроскопах.

Холерные вибрионы - аэробы, неприхотливы к питательным средам, хорошо растут в 1% пептонной воде, при щелочной реакции среда (рН 8,5-9,0), На 1% пептонной воде уже через 6-8 часов образуют нежную голубовато-серую плёнку и лёгкое помутнение среды. На щелочном агаре через 10-12 часов вырастают колонии круглые, гладкие, мелкие, прозрачные, голубоватого цвета.

Возбудители холеры биохимически очень активны: протеолитическими ферментами разжижают желатин и образуют индол, ферментируют до кислоты лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу и в течение 5 часов расщепляют крахмал.

Холерный вибрион относится к первой группе Хейберга - разлагает маннозу, сахарозу и не расщепляет арабинозу.

По морфологическим и биохимическим свойствам с холерными вибрионами сближаются неагглютинирующиеся противохолерной сывороткой, так называемые НАГ-вибрионы. Вибрион Эль-Тор характеризуется большей резистентностью во внешней среде, устойчив к полимиксину, что является одним из тестов дифференциации от классического вибриона.

Таблица. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Тест	Классический холерный вибрион	холерный вибрион Эль—Тор	Неагглютинируемые вибрионы (НАГ)
Гемолиз эритроцитов барана	-	+ -	+ -
Агглютинация куриных эритроцитов	-	+	+ -
Рост на среде с полимиксином	-	+	+ -
Агглютинация с 0-сывороткой	+	+	-
Фаголизабельность	+	+	+ -
+ положительный тест - отрицательный тест + непостоянный тест			

Вся работа в специализированной лаборатории проводится в спецодежде, т.к. холера относится к особо-опасным заболеваниям; работа выполняется лицами, прошедшими специальное обучение по особому режиму. Все работающие в холерной лаборатории должны быть вакцинированы, с целью профилактики пить бактериофаг и тетрациклин. Вводится пропускная система, и каждый работник лаборатории 1 раз в 10 дней проверяется на вибрионосительство, при появлении жидкого стула госпитализируется. Все сотрудники лаборатории должны соблюдать правила личной гигиены и обязательно пройти инструктаж по режиму работы.

Эпидемиология. Холера относится к особо опасным карантинным инфекциям. Источником инфекции при холере являются больные и вибриононосители, которые выделяют с испражнениями в окружающую среду огромное количество вибрионов. Вибриононосительство у здоровых людей длится в среднем 10—14 дней, у реконвалесцентов - 2—4 нед. Механизм передачи фекально-оральный. Одним из главных факторов

передачи инфекции является вода, инфицированная сточными водами. Заражение возможно и при непосредственном контакте с больным холерой. Возбудитель может быть занесен в рот загрязненными руками. В распространении холеры могут участвовать мухи.

Холера известна человечеству с древних времен. В истории этого заболевания особенно характерны холерные пандемии, опустошавшие города и села, уносившие десятки тысяч жизней. Эндемичными по холере и теперь являются населенные пункты, расположенные по долинам рек Ганга и Брахмапутры, по побережью Бенгальского залива, что обуславливается большой плотностью населения, его низким жизненным уровнем, значительной экономической отсталостью. Холера периодически выходила из этих исторически сложившихся эндемических очагов и по путям торговых связей, с потоками паломников распространялась в различных географических направлениях.

Специфическое лечение и профилактика. При лечении холеры в первую очередь необходимо компенсировать потерю жидкости в организме и подавить жизнедеятельность вибрионов. Больным парентерально вводится до 10 л и более жидкости в сутки. Наряду с этим проводится антибиотикотерапия. Наиболее эффективны при лечении больных холерой антибиотики тетрациклинового ряда.

Профилактика холеры заключается в организации противоэпидемических мероприятий: локализация и ликвидация эпидемических вспышек холеры, борьба с загрязнением водоемов, санитарно-просветительная работа среди населения, предупреждение заноса возбудителей холеры извне, специфическая профилактика холеры. Для специфической профилактики применяют убитую холерную вакцину, которая содержит 8 млрд. вибрионов биоваров *Vibrio cholerae* и *Vibrio eltor* сероваров Инаба и Огава (по 2 млрд. каждого биовара, каждого серовара, убитых нагреванием или формалином). Вакцина вводится по эпидемическим показаниям.

Препараты для профилактики и лечения холеры.

При лечении холеры в первую очередь необходимо компенсировать потерю жидкости в организме и подавить жизнедеятельность вибрионов. Больным парентерально вводится большое количество жидкости, в сутки более 10 литров.

Антибиотикотерапия проводится тетрациклином, левомицетином в больших дозах, в отдельных случаях применяют холерный бактериофаг.

Профилактика холеры заключается в организации противоэпидемических мероприятий: локализация и ликвидация эпидемических вспышек холеры, борьба с загрязнениями водоёмов, предупреждение заноса возбудителей холеры извне, специфическая профилактика холеры.

Для специфической профилактики применяют убитую холерную вакцину, убитых нагреванием или формалином. Вакцина вводится по эпидемическим показаниям.

В отдельных случаях для специфической профилактики холеры применяют холерный бактериофаг.

Контрольные вопросы:

1. Режим работы с особо опасными инфекциями,
2. Характеристика зоонозных инфекций,
3. Возбудитель сибирской язвы. Микробиологический диагноз. Реакция Асколи.
4. Препараты для профилактики, лечения и диагностики бактериальных зоонозных инфекций
5. Микробиологический диагноз холеры.
6. Характеристика возбудителя холеры.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 22

У больного подозрение на холеру, при посеве испражнений на щелочную пептонную воду – рост в виде пленки, на щелочном агаре – прозрачные колонии.

1. На какой среде выделяют чистую культуру при подозрении на холеру?
2. По каким свойствам идентифицируют возбудителя?
3. Сколько известно возбудителей холеры?

Ситуационная задача № 23

У мужчины, занимавшегося охотой в зоне природного очага чумы, появилась головная боль, повысилась температура, стали болезненными лимфоузлы в области шеи. При микроскопировании мазков из крови больного, возбудитель чумы не обнаружен.

Достаточно ли данных для того, чтобы отвергнуть диагноз «чума»?

Ситуационная задача № 24

У больного подозрение на сибирскую язву, кожная форма.

1. Какой материал подлежит исследованию?
2. Перечислить методы диагностики сибирской язвы.

Какие свойства характерны для данного возбудителя?

Тренинг Бумеранг

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается своё задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов, высказывает своё мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Таксономия возбудителей холеры
2. Таксономия возбудителей сибирской язвы
3. Патогенез и клиника холеры.

Задание для 2-ой группы

1. Патогенность для животных возбудителя сибирской язвы
2. Антигенная структура возбудителя холеры
3. Таксономия возбудителя сибирской язвы

Задание для 3-ой группы

1. Эпидемиология сибирской язвы
2. Патогенез и клиника сибирской язвы
3. Таксономия возбудителя холеры

Задание для 4-ой группы

1. Специфическое лечение и профилактика сибирской язвы

2. Иммунитет к холере
3. Резистентность возбудителя сибирской язвы.

Задание для 5-ой группы

1. Культивирование и ферментативные свойства возбудителя сибирской язвы
2. Таксономия возбудителя холеры.
3. Морфология и тинкториальные свойства возбудителя холеры

Задание для 6-ой группы

1. Антигенная структура и токсинообразование возбудителя холеры.
2. Морфология и культуральные свойства возбудителя сибирской язвы.
3. Резистентность возбудителя холеры.

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица; студенты заполняют ее самостоятельно, затем 3-5 раз таблица переходит к другим группам по кругу, снова студенты высказывают свое мнение, в конце с помощью преподавателя материал, представленный в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняются правильные ответы.

№	Возбудители зоонозных инфекций, патогенные клостридии.	Антигенная структура и токсинообразование
1	Возбудитель сибирской язвы	
2	Возбудитель холеры	

ГЛАВА 16. ПАТОГЕННЫЕ СПИРОХЕТЫ (ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА).ОНКОГЕННЫЕ ВИРУСЫ.

16.1 Спирохеты.

Патогенные спирохеты относятся к трем родам семейства *Spirochaeta* *Treponema*, *Leptospira*, *Borrelia*

Спирохеты- спирально извитые одноклеточные организмы, длина от 7 до 500 мкм, диаметр 0,25-6 мкм. Спирохеты, как и бактерии, не имеют дифференцированного ядра. Но их строение сложнее бактерий. Они имеют клеточную оболочку, состоящей из наружной оболочки и цитоплазматического цилиндра.Внутри клетки находится цитоплазматическая спираль, обвитая вокруг осевой нити. осевая нить состоит из пучка фибрилл, в фиброфиллах содержится хитиноподобное вещество - кутин, встречающийся только у животных. Спирохеты очень подвижны. Спирохеты составляют переходную группу бактерий к простейшим животным. Среди спирохет есть патогенные, возбудитель возвратного тифа, сифилиса и лептоспирозов. Красятся по методу Романовского-Гимзы

16.2 Сифилис — инфекционное венерическое заболевание, вызываемое *Treponema pallidum*, характеризующееся поражением кожи, внутренних органов, костей, нервной системы. Различают приобретенный и врожденный сифилис.

Таксономия. Возбудитель сифилиса — бледная трепонема (*Treponema pallidum*) — открыт в 1905 г. Ф. Шаудинном и Э. Гоффманом; относится к семейству *Spirochaetaceae*, отделу *Gracilicutes*.

Морфология и тинкториальные свойства. Название «бледная» трепонема получила из-за низкой способности к окраске. Существуют другие патогенные трепонемы: *T. pertenue* — возбудитель фрамбезии, *T. carateum* — возбудитель пинты, *T. bejel* — возбудитель беджеля. Указанные возбудители и вызываемые ими болезни чаще встречаются в регионах с жарким и влажным климатом. Бледная трепонема — тонкая бактерия спиралевидной Формы, длиной от 4 до 14 мкм, с равномерными мелкими завитками; наряду со спиралевидной может иметь другие формы

— в виде цист, гранул, L-форм; окрашивается по Романовскому—Гимзе в характерный слабо-розовый цвет.

Культивирование. Бледная трепонема — облигатный анаэроб, с трудом растущий на специальных питательных средах. Культивируемая на питательных средах трепонема — культуральная спирохета — отличается от патогенной меньшей вирулентностью, однако их антигены сходны, что используется при серодиагностике сифилиса.

Антигенная структура. Бледная трепонема характеризуется антигенными связями с другими трепонемами, а также липоидами тканей животных и человека. Установлено несколько антигенов у возбудителя, один из которых — липоидный антиген — идентичен липоидному экстракту бычьего сердца.

Резистентность. В окружающей среде бледная трепонема слабоустойчива; при 55 °С гибнет в течение 15 мин, чувствительна к высушиванию, свету, солям ртути, висмуту, мышьяку, пенициллину. На предметах домашнего обихода сохраняет заразительность до момента высыхания; хорошо сохраняется в ткани трупа.

Восприимчивость животных. Экспериментально патологический процесс можно вызвать в : у человекообразных обезьян.

Эпидемиология. Источник инфекции — больной человек. Заражение происходит преимущественно половым путем, редко — через предметы домашнего обихода (стаканы, зубные щетки, папиросы и др.), загрязненные отделяемым от больного; возможно заражение через поцелуи, молоко кормящей матери (бытовой сифилис), не исключены случаи заражения при переливании крови от доноров, больных сифилисом.

Патогенез и клиническая картина. Возбудитель сифилиса проникает в организм через кожу или слизистую оболочку, распространяется по органам и тканям, вызывая их поражение.

Инкубационный период длится в среднем 3—4 нед. После инкубационного периода сифилис протекает циклически в виде первичного, вторичного и третичного периодов. В месте внедрения возбудителя (на половых органах, губе и т.д.) появляется первичное поражение — твердый шанкр — резко отграниченное уплотнение с язвой на поверхности. Вторичный период сифилиса длится 3—4 года, характеризуется сыпью, нарушением общего состояния организма. Третичный период характеризуется поражением кожи,

слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы: появляются образования, склонные к распаду, изъязвлению.

Иммунитет. Врожденного иммунитета к сифилису не существует. При сифилисе развивается нестерильный иммунитет; после излечения иммунитет не сохраняется, поэтому возможны повторные заболевания.

Микробиологическая диагностика. Для обнаружения бледной трепонемы в отделяемом твердого шанкра применяют микроскопию в темном поле. К концу первичного и во вторичном периоде становятся положительными серологические реакции Вассермана, осадочные реакции Кана, цитохоловая и другие пробы, выявляющие антитела к бледной трепонеме. При массовых обследованиях применяют отборочную реакцию, или микрореакцию на

стекле, с каплей крови или сыворотки и специальным антигеном. В исследовательских лабораториях используют также реакцию иммобилизации трепонем и другие современные методы.

Лечение. Наиболее эффективными антимикробными средствами являются антибиотики пенициллинового ряда. Применяют также препараты висмута, йода и др.

Профилактика. Специфическая профилактика отсутствует.

Неспецифическая профилактика заключается в соблюдении правил гигиены, а также в проведении комплекса санитарно-гигиенических мероприятий общественного характера: учет больных сифилисом, госпитализация всех больных заразными формами, привлечение к обследованию всех членов семьи заболевшего, систематическое обследование групп риска, воспитание населения и т. д.

16.3 Онкогенные вирусы

Вирусогенетическая теория

Л.А.Зильбером была впервые сформулирована вирусогенетическая теория происхождения злокачественных опухолей. Л.А.Зильбер проявил удивительную способность научного предвидения, намного опередив своих современников в представлении об этиологии опухолей. Согласно этой теории,

геном ДНК-содержащих вирусов включается в хромосомный аппарат клеток хозяина, что может привести к трансформации клетки.

Гипотеза Р.Хюбнера и Г.Тодаро

Р.А.Хюбнер и Г.Тодаро в 1969 г. высказали гипотезу, согласно которой вирусная информация составляет часть генома каждой нормальной клетки и представлена двумя оперонами: вирогенам и онкогенам, причем, по мнению этих авторов в обычном состоянии вирусные гены репрессированы особым белком-репрессором и самые обычные факторы (химические, физические, биологические) могут вызвать их активность.

Гипотеза Г.Темина

Согласно гипотезе Г.Темина, высказанной в 1964 г. и получившей экспериментальное подтверждение в 1970 г., генетическая информация онковирусов находится в интегрированном состоянии, в виде так называемого провируса (по аналогии с профагом бактерии).

16.4 ДНК-содержащие онкогенные вирусы

Семейство 1 (Papovaviridae) включает мелкие вирусы (40-57 нм) с циркулярной двунитчатой ДНК, имеющие оболочку, с

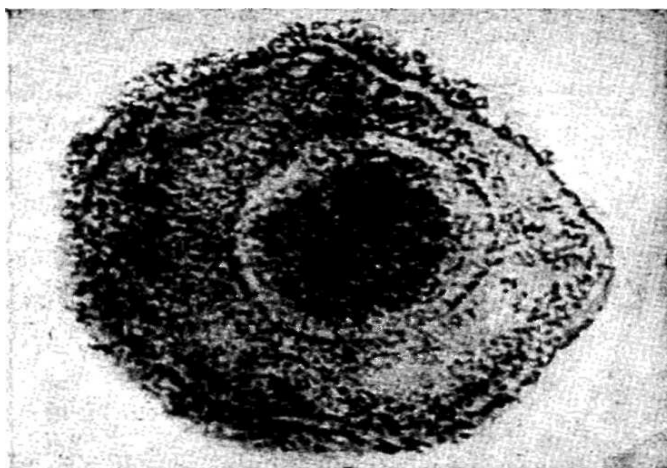


Рис. 60. Внеклеточный вирус Эпштейна

кубическим типом симметрии, устойчивые к эфиру.

Свое название семейство получило от начальных букв наименования основных представителей этого семейства (Papillomavirus, Poliomavirus и вакуолизирующий вирус–ОВ40).

Условно вирусы этого семейства делят на 2 подгруппы: папилломатозные вирусы и вирус полиомы-ОВ40. вирусы папилломы кожи и слизистой оболочки у животных и человека. Вирус полиомы был выделен из опухоли слюнных желез мышей, экспериментально полиомы можно вызвать у многих видов животных и более 20 видов опухолей, чему соответствует название «полиома». У человека этот вирус не вызывает опухолеродного действия.

К полиомавирусам относится и SV40 (или ОВ40) (от Simian-обезьяний, вакуолизирующий), так как культуры почек обезьян циномольгус дает вакуолизацию цитоплазмы и внутриядерные включения тщательные исследования показали, что ОВ40 трансформирует клетки культур тканей хомяка, кролика. Свиней и человека. Это свидетельствует о злокачественности вируса. Однако опухолеродного действия ОВ40 у человека не обнаружено.

Семейство 2 (Adenoviridae). Некоторые типы аденовирусов способны вызывать опухоли у лабораторных животных: мышей, хомяков. Опухолеродные вирусы этой группы обнаружены у обезьян, птиц и др., но не доказана способность аденовирусов вызывать образование опухолей у своих естественных хозяев (человека). Исследования всех 34 типов аденовирусов на онкогенность показали, что по степени онкогенности для лабораторных животных их можно разделить на 3 группы: типы 12,18,31 (группа А)–наиболее выраженная онкогенность для животных. Типы 1,3,7,5,11,14,16,21,24 (группа В)-слабоопухолеродные, все остальные (группы С и D) - неопухолеродные.

Семейство 3 (Herpetoviridae). Вирусы этой группы в отличие от аденовирусов способны вызывать злокачественные опухоли у своих природных хозяев, поражая лимфоидные ткани. В это семейство входят следующие опухолеродные вирусы: вирус Эпштейна-Барр, который является наиболее вероятной причиной лимфомы Беркитта у детей в Африке, инфекционного мононуклеоза и назофарингеальной карциномы человека. Вирус Саймари- злокачественной лейролимфомы кур и ряд др. вирусов.

Вирус Эпштейна-Барр был обнаружен в лимфоме Беркитта. По своим антигенным свойствам близок к вирусам группы герпеса и в клетках культуры ткани из лимфомы образует типичные для всего

семейства включения. Обнаруживается в культуре клеток лейкоцитов, взятых от больных инфекционным мононуклеозом, и в эпителиальных клетках при назофарингеальной карциноме. Повидимому, этот вирус обладает способностью стимулировать лимфоидную ткань и при определенных условиях вызывать ее трансформацию в опухолевую.

С вирусом из группы герпеса связана болезнь Марека-нейролимфома кур. Заболевание это распространяется горизонтально-между членами одного поколения. Вирус болезни Марека, попадая во внешнюю среду, может длительно сохраняться в пыли. Для профилактики этого заболевания разработана первая вакцина против злокачественного новообразования, представляющая собой вирус герпеса индеек, антигенно близкий вирусу болезни Марека и непатогенный для кур. Вакцина, введенная цыплятам на 1-й неделе жизни, предупреждает возникновение нейролимфы.

Имеются данные о роли герпетического вируса 2 при раке шейки матки у женщин; в крови обнаруживаются антитела к вирусу, иногда удается обнаружить и сам вирус.

Семейство 4 (Poxviridae). Вирусы вызывают у своих природных хозяев доброкачественные опухоли (фибромы кроликов, зайцев, гистиоцитомы обезьян и др.), спонтанно регрессирующие. К семейству Poxviridae относится вирус контагиозного моллюска человека. Заболевание характеризуется развитием мелких плотных узелков: у детей - на лице, шее, веках, у взрослых - на половых органах в области лобка.

Семейство 5 (Parvaviridae) включает мелкие вирусы. Парвавирусы обладают уникальным геномом – однонитчатой ДНК, имеют очень небольшие размеры (20-25 нм), кубический тип симметрии, резистентны к эфиру. В это семейство входят вирусы панлейкемии крыс и некоторые латентные вирусы.

Трансформационный процесс, вызываемый онкогенными вирусами, заключается в усиленном размножении клеток; при этом отсутствует накопление дочерних вирионов. Процесс трансформации начинается с контроля синтеза клеточных ДНК. Механизм этих первоначальных изменений, приводящих к развитию трансформации, неизвестен. После адсорбции, проникновения вируса в клетку и его депротенинизации

наблюдаются следующие этапы трансформации: 1) активизация клеточных ферментов (ДНК-полимеразы, тимидинкиназы и др.); 2) увеличение количества ДНК клетки почти в 2 раза; 3) аномальный синтез ДНК –клетки хозяина, который, по-видимому, и обуславливает интеграцию вирусной ДНК или части ее в состав клеточных хромосом, 4)повышение синтеза связанных с хромосомами белков, 5) появление новых белков-антигенов, индуцированных онкогенными вирусами, имеющих специфический характер. Первоначально были выявлены туморспецифические трансплантационные антигены (TSTA), локализованные на поверхности клеток. Они обладают вирусоспецифичностью; 6) в ядрах клеток, инфицированных онковирусом, обнаружение Т-антигена-комплемента связывающего вирусоспецифического. Он синтезируется на ранних этапах вирусной инфекции как при развитии продуктивного процесса, так и в случае процесса, ведущего к трансформации. Вирусный капсидный V-антиген обнаруживается в ядре клетки во время продуктивного цикла вируса и отсутствует в трансформационной клетке, поверхностный (surface)-S-антиген- на поверхности трансформированной клетки. Оба антигена синтезируются *de novo*; 7) изменение ростовой характеристики трансформированных клеток: они утрачивают способность к контактному ингибированию. Обычно при образовании монослоя. Трансформированные клетки продолжают делиться, напозаают друг на друга, образуя скопления, узелки, очаги разрастания, опухоли.

16.5 РНК-содержащие онкогенные вирусы

Наследственное вещество онкорнавирусов существенно отличается от клеточной ДНК и от ДНК опухолеродных вирусов. Превращение нормальной клетки в злокачественную под влиянием ДНК вирусов рассматривается как результат включения вирусной ДНК в клеточный геном. Слияние же РНК вируса с ДНК клетки невозможно. Лишь после открытия обратной транскриптазы, образующей ДНК на матрице РНК, появилась возможность объяснить механизм действия онкорнавирусов.

Онкогенные РНК- содержащие вирусы выделены в самостоятельное семейство *Retroviridae*, которое включает более 100 видов онкорнавирусов, обладающих рядом общих свойств.

Основу этого семейства составляют саркомно-лейкозные комплексы птиц и мышей.

Вирусы саркомно-лейкозного комплекса птиц. Включают вирусы лейкозов птиц, вирус куриной саркомы Рауса и вирус ретикулоэндотелиоза, причем два первых вируса обычно циркулируют в смешанных популяциях, отсюда и название «саркомно-лейкозный комплекс».

К онкорнавирусам относятся вирусы, вызывающие карциному молочных желез мышей (вирус Биттнера), крыс и обезьян, вирусы, индуцирующие лейкозы и саркомы у крыс, морских свинок, кошек, обезьян и, возможно человека.

Онкорнавирусы обладают рядом общих биологических свойств: 1) онкогенны для естественных хозяев, 2) широко распространены в природных условиях среди позвоночных (мыши, крысы, хомяки, обезьяны, крупный рогатый скот; 3) для них характерны два типа передачи: горизонтальный- среди одного поколения и вертикальный-от родителей потомству. Вертикальный путь является основным; различают два варианта этого типа передачи онкорнавирусов. В первом случае инфекция передается вертикально вирусами через плаценту, молоко ит.д., при втором типе передачи генетический-через гамету наследуется провирус, интегрированный в ДНК клетки родителей; 4) не оказывают ЦПД и не обладают гемагглютинирующей активностью.

Многие исследователи считают, что большинство природных опухолей вызвано онкорнавирусами.

Онкорнавирусы имеют округлую форму, диаметр 80-100 нм, сферическое ядро, по периферии которого расположены сверхскрученные нуклеопротеидные нити. Вирусы имеют две оболочки: внутреннюю и внешнюю, от которой могут отходить отростки-шишечки (функция их еще неясна), чувствительны к эфиру.

Онкорнавирусы в период созревания и расположения в клетке отличаются и могут иметь четыре типа частиц: D, C, B, A. частицы D изучены мало.

Зрелые частицы C имеют диаметр 60-150 нм, плотное ядро в центре, гладкую поверхность. Онкорнавирусы типа C являются возбудителями лейкозов и саркомы у птиц и различных видов млекопитающих.

Частицы В имеют диаметр 80-120 нм, асимметричное ядро и отростки, расположенные на наружной поверхности. Онкорнавирусы типа В являются возбудителями рака молочных желез мышей и, очевидно,

Частицы А имеют центральное расположенное светлое ядро, очень плотную околоядерную оболочку, диаметр около 75 нм. Вирионы типа А являются предшественниками частиц В.

Созревание онкорнавирусов происходит на клеточной мембране: они как бы отпочковываются от нее.

Онкорнавирусы имеют сложный химический состав. Белки, входящие в их состав, разнообразны. К ним относятся группоспецифические антигены, находящиеся в ядре. Обнаружение такого антигена даже в отсутствие инфекционных вирусных частиц всегда указывает на инфицирование опухолеродным вирусом. Среди белков онкорнавирусов особое место занимают ферменты (около 14); часть их клеточного происхождения и попадает в частицу при ее формировании. К таким ферментам относятся РНК- и ДНК-зависимая ДНК полимераза, лигаза, ДНК-экзонуклеаза, РНК-аза, протеинкиназа, нуклеотидкиназа и др.

Наиболее характерным ферментом онкорнавирусов является обратная транскриптаза и ее присутствие в клетке служит показателем инфицирования опухолеродным вирусом. Он имеет видовую специфичность.

При заражении клеток онкорнавирусами возможна продуктивная инфекция (вирус проходит полный цикл репродукции и образуется большое количество инфекционных вирионов) или трансформация клеток (внедрение генома вируса в геном клетки, что способствует делению клетки). Трансформирующей активностью, как правило, обладают вирусы, вызывающие саркому, в то время как вирусы лейкозов размножаются, не приводя к трансформации клетки. Опухоль – это, вероятно, эволюционно непланируемый результат деятельности онкогенных вирусов, обусловленный тем, что, отбор среди вирусов приводит к вариантам, способствующим пролиферации инфицированных клеток, повышающей вероятность злокачественной трансформации.

Записать в тетрадь классификацию онкогенных вирусов.

1. Зарисовать в тетрадь внеклеточный вирус Эпштейна-Барра.

Классификация онкогенных вирусов.

ДНК содержащие онкогенные вирусы:

1. Семейство Papovaviridae

Род Papillomavirus

Род Polyomavirus

2. Семейство Adenoviridae

Тип 3,7,12,18,21,31

3. Семейство Herpetoviridae

Род Herpesvirus

4. Семейство Poxviridae

Род Leporivirus

5. Семейство Parpoviridae

Род Parvovirus

РНК- содержащие онкогенные вирусы:

Семейство Retraviridae, группы C,B,A,D.

Контрольные вопросы:

1. Классификация спирохет и их роль в патологии человека.
2. Общие свойства спирохет, их отличие, от бактерий и простейших.
3. Характер иммунитета при сифилисе.
4. Назовите антибиотики и химиопрепараты, применяемые для лечения сифилиса.
5. Как проводится микробиологическая диагностика сифилиса?
6. Серологические реакции, применяемые при диагностике сифилиса.
7. Классификация онкогенных вирусов.

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 25

У пациента, обратившегося за медицинской помощью, обнаружены многочисленные язвочки на слизистой оболочке рта и образование, похожее на твердый шанкр на внутренней поверхности щеки.

1. Какой материал нужно взять от больного для проведения микробиологического исследования?
2. Какие исследования нужно провести с учетом особенностей локализации возбудителя?

Ситуационная задача № 26

При плановом обследовании сотрудников детского дошкольного учреждения с помощью реакции Вассермана серопозитивных лиц не было выявлено. Но при заборе крови медсестра обратила внимание на многочисленные пустулы на руках одной из нянь.

1. Диагностику какого заболевания проводят с помощью этой реакции?
2. На чем основано проведение реакции Вассермана?
3. Какие дополнительные исследования можно провести, чтобы исключить наличие этого заболевания у няни? Почему?

Тренинг «Бумеранг»

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается свое задание по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов высказывает свое мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

1. Классификация спирохет
2. Характер иммунитета при сифилисе
3. Как происходит заражение риккетсиями, характер иммунитета

Задание для 2-ой группы

1. Классификация онкогенных вирусов.
2. Классификация спирохет их роль в патологии человека
3. Возбудитель сифилиса

Задание для 3-ой группы

1. Препараты для профилактики и лечения спирохетозов
2. РНК- содержащие онкогенные вирусы:
3. Возбудитель сифилиса, микробиологический диагноз

Игра «Кто больше? Кто быстрее?»

Для работы необходимо:

1. Карточки с вопросами по теме (к-во карточек равно числу студентов в группе, в каждой карточке по 5 вопросов).
2. Секундомер.

Ход работы:

1. игра проводится в устном виде.

1. Студенты поочередно вытягивают карточки с вопросами.

2. в течение нескольких минут каждый студент устно отвечает на серию вопросов. Написанных на карточке.

3. Преподаватель считает число правильных ответов.

4. В игре участвуют все студенты.

5. Общее время игры 45 минут.

6. Вопросы. На которые были даны правильные ответы. Обсуждаются.

7. Ответы студентов оцениваются по следующей форме:

- Правильные 5 ответов-0,9 балла
- Правильные 4 ответа-0,7 балла
- Правильные 3 ответа-0,5 балла
- Правильные 2 ответа-0,3 балла
- Правильные 1 ответ-0,1 балла
- Правильные 0 ответов-0 баллов

9. Полученный студентами балл учитывается при выставлении текущей оценки занятия.

Перечень вопросов:

Вертушка

При этом тренинге студенты делятся на 3 или 5 групп, каждой группе предоставляется одинаковая таблица. Студенты заполняют ее самостоятельно. Затем 3-5 раз таблица переходит к другим по кругу. Снова студенты высказывают свое мнение. В конце с

помощью преподавателя материал. Представленный, в таблице обобщается, в процессе дискуссии выясняется правильные ответы.

Интерактивный метод

Используя компьютер, студенты знакомятся с аудио и видео материалами по теме занятия.

16.6 Темнопольная микроскопия. Пособие для лабораторных работ.

Лабораторная работа №9

Микроскопия на тёмном фоне.

Студенты просматривают готовый мазок из отделяемого твёрдого шанкра. Возбудитель сифилиса – *Tr pallidum*. Это тонкие спирохеты длиной 6-14 мкм, имеющие 14-17 равномерных, мелких завитков правильной формы. Для бледной трепонемы характерно маятникообразное движение и сгибание под углом, плохо воспринимает окраску. Препарат рассматривают в тёмном поле зрения или окрашенными по методу Романовского-Гимзы, Культивируется на искусственных средах с большим трудом, что ограничивает практическое использование этого метода,

Для того, чтобы исследование на сифилис в темном поле (темнопольная микроскопия) было максимально информативным, перед тем как собрать материал проводится гигиеническая обработка поверхности язвы или эрозии. В этом месте, с пораженной поверхности выделяется содержимое, в котором в большом количестве находится возбудитель. Ускорить процесс выделения, можно надавив на край раны. Если поверхность не повреждена, материал собирается путем поскабливания эрозии скальпелем.

Полученный биологический материал переносится на предметное стекло, изготавливается мазок, который затем и подвергается исследованию под микроскопом.

Темнопольная микроскопия (Dark-field microscopy) – это микроскопический метод, который выполняется с помощью специального темнопольного микроскопа. — темнопольная микроскопия — это микроскопическое исследование. Данный метод получил свое широкое применение в диагностике сифилиса и некоторых других заболеваний в связи с тем, что спирохеты имеют плохую способность к окрашиванию красителями и их можно увидеть только при правильном направлении света. К тому же, темнопольная микроскопия позволяет увидеть бледную трепонему в живом состоянии.

Темнопольная микроскопия также является и одним из самых дешевых методов диагностики сифилиса. В ходе исследования, на предметное стекло направляется узкий пучок яркого света (при помощи конденсатора). Свет падает практически сбоку от препарата, а исследователь в объективе видит темное поле. Спирохеты в свою очередь отражают и преломляют этот свет (феномен Тиндаля), что образует интересный оптический эффект – трепонемы начинают выглядеть как светящиеся подвижные спирали с несколькими завитками.

Особую важность данный метод темнопольной микроскопии имеет при диагностике первичного серонегативного сифилиса (при отрицательных результатах КСР), при диагностике нейросифилиса (обнаружение спирохеты в ликворе) и диагностике реинфекции сифилиса.

ГЛАВА 17. ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. (ВИРУСЫ ГРИППА, ВИРУС КОРИ). ВИРУСЫ ГЕПАТИТА.

17.1 Принципы диагностики вирусных заболеваний

В вирусологии широко пользуются выращиванием вирусов в культуре различных тканей - культуре фибробластов человека, животных, эмбриональных клеток, злокачественных новообразований и др. Путем культивирования вирусов их можно выделять, определять наличие антител в сыворотках больных вирусными инфекциями, размножать вирусы для приготовления диагностических, профилактических и лечебных препаратов. Для культивирования вирусов может быть использовано два способа получения культуры ткани - метод первичных эксплантатов и метод пассажных культур. Многие вирусы при росте на культуре ткани вызывают цитопатическое действие – клетки, в которых размножаются вирусы, резко изменяются и потом погибают.

В вирусологии широко используются серологические реакции в диагностических целях. Это-реакция связывания комплемента, реакция нейтрализации, реакция торможения гемагглютинации и др.

17.2 Грипп

Грипп - острое вирусное заболевание, антропонозное характеризуется поражением

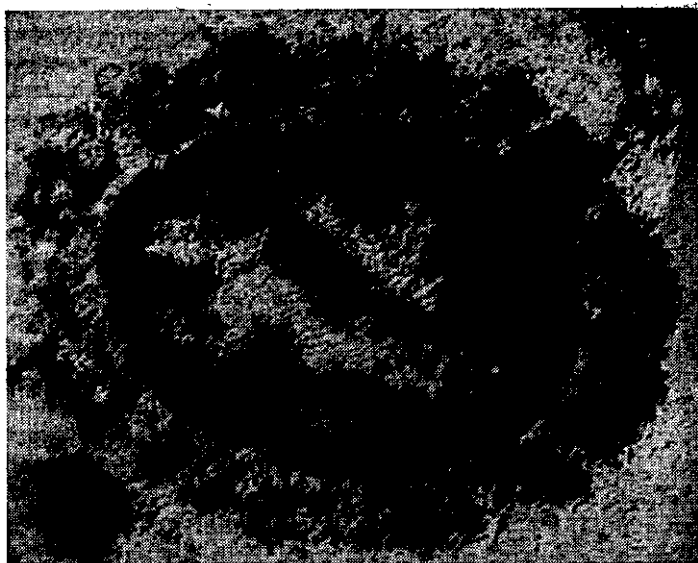
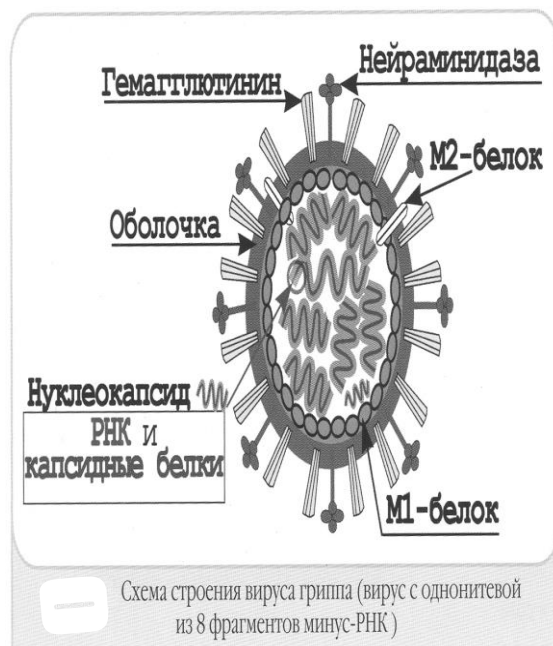


Рис. 52. Вирсоны вируса гриппа. Х300000.



респираторного тракта.

Возбудителем заболевания является вирус гриппа, который относится к семейству *Orthomyxoviridae* (рис.52), оно включает 3 рода:

Род вирусов гриппа А

Род вирусов гриппа В

Род вирусов гриппа С

Вирус гриппа термолабилен, при температуре 56-60С теряет инфекционность в течении нескольких минут, высокочувствителен к эфиру и формалину. Цикл репродукции вируса гриппа продолжается 10 часов, латентный период 3 часа. Вирусы гриппа имеют токсические свойства Интоксикация - важный показатель гриппозной инфекции от других ОР вирусных заболеваний.

Вирусы гриппа относятся к РНК-содержащим вирусам, имеют 2 антигена "S " и" V ".

Нуклеокапсид вируса иммунологически определяется как "S "-антиген, который часто определяется реакцией РСК.

Внешняя оболочка вируса гриппа, которая состоит из гемагглютинина и нейраминидазы иммунологически определяется как "V "-антиген,

. Природного иммунитета при гриппе не имеется. Приобретенный иммунитет при гриппе носит типоспецифический характер.

Лабораторная диагностика

Исследуемый материал: мазки-отпечатки слизистой оболочки носовой полости больных и носоглоточное отделяемое (первые 3 дня болезни). Для серологической диагностики - кровь в первые 3 дня и через 12-15 дней. В летальных случаях: кусочки пораженной легочной ткани, соскоб- слизистой оболочки трахеи.

Метод ранней диагностики:

1) Риноцитоскопическое исследование (клетки увеличены, округлые, лишены ресничек, имеют лизированное ядро, окрашены по Романовскому-Гимзе в фиолетовый цвет).

2) Метод иммунофлуоресценции с целью обнаружения специфического антигена.

3) Выделение вируса (в курином эмбрионе).

4) Методы ретроспективной диагностики. Выявление повышения титра антител в парных сыворотках крови больного при помощи

а) РСК,

б) РТГА (реакция торможения гемагглютинации).

Для постановки РГА и РТГА пользуются материалом из эмбрионов, ранее зараженных вирусом гриппа. После удаления части скорлупы с подскорлупной оболочкой хорионаллантоисную оболочку прокалывают пастеровской пипеткой и насасывают аллантоисную жидкость. Реакцию гемагглютинации ставят по схеме.

РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Ингредиенты	Разведения аллантоисной жидкости				
	1:2	1:4	1:16	1:32	контроль
Аллантоисная жидкость	0,5	0,5	0,5	0,5	-
1% взвесь эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результаты					

Реакция торможения гемагглютинации заключается в следующем:

к различным разведениям исследуемой сыворотки в объеме 0,25 мл до

бавляют равный объем суспензии вируса, содержащей 4 гемагглютини-

рующих единицы вируса (4 АЕ). 1 АЕ - наибольшее разведение вируса,

вызывающее полную агглютинацию эритроцитов. После встряхивания

каждую пробирку добавляют взвесь эритроцитов. Контрольная пробирка содержит вирус и эритроциты. При нейтрализации вируса иммунной

сывороткой агглютинации эритроцитов не происходит. В контроле реакция гемагглютинации должна быть положительной. Реакция торможения гемагглютинации должна быть положительной. Реакция торможения гемагглютинации позволяет не только обнаруживать вирус в исследуемом материале или антитела в сыворотке. Но и определять их типовую принадлежность (например, при гриппе).

Реакция торможения гемагглютинации

Ингредиенты	Разведения сыворотки						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	контроль
Сыворотка	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
4 АЕ вируса	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
1% взвесь эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результаты							
Сыворотка типа А							
Сыворотка типа В							
Сыворотка типа С							

Схема лабораторной диагностики гриппа.

Материал	Метод исследования	Результаты
Мазки-отпечатки нижних носовых раковин	Экспресс-диагностика с использованием флюоресцирующих антител	Зелёное свечение в цитоплазме клеток
Отделяемое носовых ходов и зева	Вирусологический 1.Заражение куриного эмбриона в аллантоисную полость 2.Постановка РПГА с аллантоисной жидкостью 3.Постановка РТГА с типоспецифическими сыворотками А,В и С.	Положительная реакция Положительная реакция с одной из сывороток
Парные сыворотки	Серологический Постановка РТГА с типоспецифическими антигенами А,В и С.	Наращение титра в отношении одного типа в 4 раза и более.

Препараты для профилактики и лечения гриппа. Гриппозная живая вакцина для интраназального применения *Vaccinum gripposum vivum*. Вакцина готовится из аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов, зараженных вакцинными штаммами вируса гриппа. Вакцинные штаммы должны соответствовать по биологическим свойствам и антигенной структуре вирусам, циркулирующим в данный период.

Гриппозная вакцина живая для перорального применения – *Vaccinum gripposum vivum per orale*. Для приготовления этого препарата штаммы вируса гриппа выращивают на культуре клеток почки эмбрионов кур. Вакцину выпускают в сухом виде в форме моно- и дипрепаратов. Перед употреблением растворяют в кипяченой воде. Применяют внутрь, срок годности I год.

Противогриппозный донорский гамма-глобулин – *Gamma-globulinum influenzae gripp* - готовят из сыворотки крови доноров иммунизированных живой гриппозной вакциной типов А и Б. Препаратом пользуются для профилактики и лечения гриппа и профилактики гриппозных осложнений. Выпускают в жидком виде. Вводят внутримышечно. Срок годности 3 года.

Интерферон лейкоцитарный человеческий – *interferonum leucocuticum concentratum*. Противовирусный лейкоцитарный интерфе-

рон является белком, который выделяется лейкоцитами человека, по

лученными из донорской крови в ответ на *воздействие* специальными вирусами - интерфероногенами. Препарат обладает широким спект-

ром действия и предназначен для профилактики и лечения гриппа, а также других респираторных заболеваний. Применяют путем распыления или закапывания в нос.

17.3 Вирус кори

Вирус кори (лат. morbilli) вызывает острое инфекционное высококонтагиозное заболевание, поражающее главным образом детей, характеризующееся лихорадкой, катаральными явлениями и сыпью. Вирус кори выделен в 1954 г.

Таксономия. РНК-содержащий вирус относится к семейству Paramyxoviridae, роду Morbillivirus.

Морфология, антигенная структура. По морфологии вирус кори сходен с другими парамиксовирусами (см. 11.2.1.2), содержит несколько антигенов: внутренние сердцевинные и поверхностные антигены наружной оболочки. Антигенные варианты не обнаружены; обладает гемагглютинирующей активностью.

Культивирование. При размножении вируса в клеточных культурах наблюдаются характерный цитопатический эффект (образование гигантских многоядерных клеток — симпластов), появление цитоплазматических и внутриядерных включений, феномен гемадсорбции и бляшкообразование под агаровым покрытием.

Резистентность. В окружающей среде вирус быстро погибает под действием прямого солнечного света, УФ-лучей, поэтому дезинфекцию при кори не производят.

Восприимчивость животных. Типичную картину коревой инфекции удастся воспроизвести только на обезьянах, другие лабораторные животные маловосприимчивы.

Эпидемиология. В естественных условиях болеет только человек. Восприимчивость к кори чрезвычайно высока. Заболевание возникает в виде эпидемий, преимущественно в детских коллективах. Распространение инфекции связано с состоянием коллективного иммунитета. Могут болеть и взрослые люди.

Эпидемические вспышки регистрируются чаще в конце зимы и весной.

Больной становится заразным в последние дни инкубационного периода и в первые дни высыпаний. Механизм передачи возбудителя — аэрогенный.

Патогенез и клиническая картина. Вирус проникает через слизистую оболочку верхних дыхательных путей, где происходит его репродукция, затем вирусы попадают в кровь и поражают клетки сосудов. Инкубационный период длится 8—21 день.

Продромальный период протекает по типу острого респираторного заболевания. Затем на слизистых оболочках и коже появляется сыпь, распространяющаяся сверху вниз. Заболевание длится 7—9 дней.

Осложнениями кори являются пневмония, в редких случаях — острый энцефалит и подострый склерозирующий панэнцефалит. Последнее заболевание характеризуется поражением ЦНС,

развивается постепенно, чаще у детей 5—7 лет, перенесших корь, и заканчивается смертью. В развитии осложнений большое значение имеет способность вируса кори подавлять активность Т-лимфоцитов и вызывать ослабление иммунных реакций организма. Иммуитет. После заболевания вырабатывается пожизненный иммунитет. Пассивный естественный иммунитет сохраняется до 6 мес.

Лабораторная диагностика. Исследуемый материал — отделяемое носоглотки, соскобы с кожи из участка сыпи, кровь, моча, в летальных случаях — мозговая ткань.

Экспресс-диагностика основана на обнаружении специфического антигена в РИФ, а также антител класса IgM с помощью ИФА. Для выделения вируса используют культуру клеток. Идентификацию выделенного вируса проводят с помощью РИФ, РТГА, РН в культуре клеток. Для серологической диагностики используют РН, РСК, РТГА.

Специфическая профилактика и лечение. Для специфической профилактики применяют живую аттенуированную коревую вакцину, полученную А. А. Смородилцевым и М. П. Чумаковым. Вакцина вводится детям в возрасте 1 года парентерально. У 95% вакцинированных формируется длительный иммунитет. В очагах кори ослабленным детям вводят противокоревой иммуноглобулин. Продолжительность пассивного иммунитета 1 мес. Лечение симптоматическое.

17.4 Вирусные гепатиты.

Заболевания печени, сопровождающиеся желтухами, наблюдались ещё в глубокой древности. В 1888 г, С.Боткин установил их инфекционную природу. Оценивая вклад С.П.Боткина в изучение этого заболевания, оно названо болезнью Боткина.

Сегодня ученым известно несколько разновидностей возбудителей вирус-ных гепатитов, обозначенных буквами: А, В, С, D, E, G, F, TT и SEN, и этот список вряд ли можно считать окончательным. Перечисленные возбудители имеют определенные различия, однако всех их объединяет то, что источником заражения этими инфекциями всегда является больной человек или вирусоноситель. Наибольшую же опасность представляют больные с легкими или стертыми формами заболевания.

Гепатит А — острое инфекционное заболевание, которое характеризуется лихорадкой, поражением печени, в ряде случаев — желтухой и отличается склонностью к эпидемическому распространению.

Заболевание известно с глубокой древности и описано еще Гиппократом в IV—V вв. до н.э. Вирус гепатита А (ВГА) открыт в 1973 г. С.Фейнстоном.

Таксономия, морфология, антигенная структура. Вирус гепатита А относится к семейству *Picornaviridae*, роду *Hepatovirus*. По структурной организации и химическому составу сходен с другими энтеровирусами, имеет один вирусспецифический антиген.

Культивирование. ВГА культивируют в культурах клеток, но в отличие от других энтеровирусов цикл репродукции ВГА более длительный, а цитопатический эффект не выражен.

Резистентность. ВГА отличается от других энтеровирусов большей устойчивостью к нагреванию: сохраняет инфекционную активность при 60 °С в течение 12 ч, но инактивируется при кипячении в течение 5 мин. Вирусы выживают в окружающей среде (воде, выделениях больных).

Восприимчивость животных. Экспериментальную инфекцию удается воспроизвести на обезьянах — мармозетах и шимпанзе.

Эпидемиология. Гепатит А распространен повсеместно, но особенно в регионах с плохой системой водоснабжения и канализации, а также низким уровнем гигиены населения. По массовости поражения гепатит А является второй после гриппа вирусной инфекцией. Болеют преимущественно дети в возрасте от 4 до 15 лет. Подъем заболеваемости наблюдается в летние и осенние месяцы.

Источником инфекции являются больные как с клинически выраженными, так и бессимптомными формами инфекции. Механизм передачи инфекции — фекально-оральный. Вирусы выделяются с фекалиями, начиная со второй половины инкубационного периода и в начале клинических проявлений; в это время больные наиболее опасны для окружающих. С возникновением желтухи интенсивность выделения вируса снижается. ВГА передаются через воду, пищевые продукты, предметы обихода, грязные руки; в детских коллективах —

игрушки, горшки. Вирусы способны вызывать водные и пищевые эпидемические вспышки.

Патогенез и клиническая картина. Патогенез гепатита А изучен недостаточно и отличается от патогенеза других энтеровирусных инфекций: первичное размножение ВГА в кишечнике не доказано; вирусемия кратковременная; установлен строгий тропизм вируса к клеткам печени, в цитоплазме которых он репродуцируется.

Инкубационный период колеблется от 10 до 50 дней, составляя в среднем 2—3 нед. Выделяют три клинические формы гепатита А: желтушную А—10 % случаев), безжелтушную, бессимптомную.

Продромальный период напоминает острое респираторное заболевание, спустя 4—5 дней на фоне снижения температуры тела развиваются симптомы, характерные для желудочно-кишечных заболеваний. У детей чаще встречается безжелтушная

форма. Течение заболевания, как правило, доброкачественное, без тяжелых осложнений. Хронические формы не развиваются.

Иммунитет стойкий, связанный с иммуноглобулинами класса G и секреторными IgA. В начале заболевания в крови появляются IgM, которые сохраняются в организме в течение 4—6 мес и имеют диагностическое значение. У детей первого года жизни обнаруживаются антитела, полученные от матери через плаценту.

Лабораторная диагностика. Исследуемым материалом служат кровь (сыворотка) и фекалии больного. При ранней диагностике основное значение имеет обнаружение нарастания титра антител класса IgM с помощью ИФА, РИА и иммунной электронной микроскопии (ИЭМ). Этими же методами можно обнаружить вирусы или вирусный антиген в фекалиях больных. Выделения вирусов не проводят из-за отсутствия методов, доступных для практических лабораторий.

Специфическая профилактика и лечение. Для профилактики гепатита А используют иммуноглобулин. Препарат вводят детям в предэпидемический период, а также лицам, имевшим контакт с больными. Людям, выезжающим в регионы с высоким уровнем заболеваемости по гепатиту А, рекомендуется введение инактивированной культуральной вакцины.

Вирус гепатита Е

Вирус обнаружен в 1980 г. при исследовании фекалий больных методом ИЭМ. Содержит РНК, относится к семейству *Caliciviridae*

(от лат. *calix* — чаша), роду *Hepatitisvirus*. Вирус гепатита Е имеет небольшие размеры 22—34 нм), сферическую форму, просто организованную структуру, отличается от вирусов гепатита А по антигенным свойствам. С трудом культивируется в культуре клеток, патогенен для обезьян (шимпанзе, макаки).

Эпидемии гепатита Е регистрируются в основном на территориях Средней Азии, Юго-Восточной Азии, Центральной Америки. Источник — больные люди. Механизм заражения — фекально-оральный, основной путь передачи — водный. Болеют преимущественно лица молодого и среднего возраста (15—40 лет).

Инкубационный период составляет от 2 до 9 нед. Клиническая картина схожа с таковой при гепатите А.

Течение заболевания, как правило, доброкачественное, однако у беременных женщин отмечаются тяжелые формы болезни с летальным исходом.

Иммунитет недостаточно изучен.

Для диагностики используют серологический метод, заключающийся в обнаружении антител к вирусу с помощью ИФА. РНК вируса гепатита Е можно определить в фекалиях и сыворотках больных методом ПЦР.

Лечение симптоматическое.

Для специфической профилактики гепатита Е беременным женщинам можно вводить иммуноглобулины. Созданы инактивированные вакцины, разрабатываются рекомбинантные и живые вакцины.

Вирус гепатита В

Вирусный гепатит — системное заболевание, вызываемое вирусом гепатита В, характеризующееся преимущественным поражением печени. Вирусы гепатита В у человека впервые описаны как частицы

Дейна в 1970 г., которые он наблюдал под электронным микроскопом в сыворотке больных гепатитом. Вместе с вирусами гепатитов лесных сурков и белок, пекинских уток относится к сем. *Hepadnaviridae*, роду *Orthohepadnavirus*.

Морфология и антигенная структура. Вирионы гепатита В имеют вид сферических образований диаметром 40—45 нм (см. рис. 2.9). Сердцевина вируса состоит из антигена Н_сAg, инфекционного антигена — Н_ВеAg, особого фермента РНК-зависимой ДНК-

полимеразы и генома, представленного своеобразной кольцевой двухспиральной ДНК. Сердцевина окружена оболочкой, содержащей поверхностный антиген HBsAg (австралийский антиген), гликопротеидной природы. HBc- и HBe-антигены представляют собой один и тот же полипептид.

Культивирование. Вирус гепатита В с трудом размножается в культуре клеток, что препятствует его накоплению и изучению. Единственное животное, восприимчивое к вирусу, — шимпанзе.

Резистентность. Вирусы чувствительны к эфиру и детергентам, устойчивы к высокой температуре, особенно если находятся в сыворотке крови: в течение нескольких минут выдерживают кипячение. Вирус не инактивируется при УФ-облучении плазмы, хранении при -20°C , повторном замораживании и оттаивании.

Эпидемиология. Гепатит В является одной из распространенных тяжелых болезней; им болеют сотни миллионов людей.

Основной механизм передачи инфекции — парентеральный.

Заражение происходит при хирургических операциях, взятии и переливании крови, инъекциях и других манипуляциях, сопровождающихся нарушениями целостности слизистых покровов. Вирус гепатита В может передаваться от матери ребенку во время беременности и родов, а также половым путем, в основе которого лежит парентеральный путь передачи.

Патогенез и клиническая картина. Вирусы проникают в кровь парентерально, с кровью переносятся в печень и размножаются в клетках печени — гепатоцитах. Инкубационный период отличается продолжительностью до 3—6 мес. В зависимости от типа взаимодействия вирусов с клетками печени (пролиферативный или интегративный), силы

иммунного ответа, дозы вируса развиваются различные формы болезни:

тяжелый гепатит с высокой летальностью и переходом в хроническую форму; длительное носительство; первичный рак печени.

Иммунитет. Инфекционный процесс сопровождается развитием иммунитета, выработкой антител ко всем трем антигенам.

Хронические формы гепатита В обусловлены иммунодефицитным состоянием; при острых формах иммунодефицит носит

преходящий характер. Свыше 5 % случаев гепатита В заканчивается носительством

HBs-антигена, являющегося основным показателем перенесенной хронической инфекции и носительства. Число носителей в мире, по данным ВОЗ, достигает 300 млн.

Вирус гепатита D

В 1977 г. открыт особый дефектный вирус, получивший первоначальное название дельта-антиген, в настоящее время расшифрован как односпиральный РНК-вирус, названный вирусом гепатита D. Дефектом его является отсутствие собственной оболочки, поэтому для проявления патогенного действия он должен использовать оболочку вируса гепатита В. Вирус гепатита D может вызывать поражение печени лишь у людей, уже инфицированных вирусом гепатита В.

Иммунитет к гепатиту В защищает от заражения вирусом гепатита D: иммунизация против гепатита В эффективна и против гепатита D.

Вирусы гепатитов С и G

Гепатит С вызывается вирусом, отличающимся от вируса гепатита В. Относится к семейству Flaviviridae, роду Heparacivirus, РНК-содержащий вирус, сложно устроенный. Чувствителен к эфиру, УФ-лучам, детергентам. Возбудитель передается парентерально, как и вирус гепатита В. Наиболее часто заболевают лица после повторных переливаний крови. В половине случаев процесс переходит в хроническое заболевание с возможным развитием цирроза или первичного рака печени. Лечение — интерферон и рибавирин. Неспецифическая профилактика гепатита С такая же, как и при гепатите В. Специфическая профилактика не разработана.

Вирус гепатита G относится к семейству Flaviviridae, роду Heparacivirus; мало изучен.

В вирусологии широко пользуются выращиванием вирусов в культуре различных тканей - культуры фибробластов человека и животных, эмбриональных клеток, злокачественных новообразований и др. Путем культивирования вирусов их можно выделять из организма больного, определять вид или тип выделенного вируса, определять наличие антител в сыворотках больных вирусными

инфекциями, размножать вирусы для приготовления диагностических, профилактических и лечебных препаратов.

Для культивирования вирусов может быть использовано два способа получения культуры ткани - метод первичных эксплантатов и метод пассажных культур. Первичный метод основан на использовании первой генерации клеток, т.е. каждый раз необходимо получать вновь культуру из ткани. Значительно шире пользуются в вирусологии методом пассажных культур, при котором культуру ткани поддерживают путем непрерывных перевивок. Методом пассажных культур можно культивировать различные нормальные и опухолевые ткани (культуры HeLa, Нер и др.). Наиболее удобным методом является получение однослойного роста, при котором происходит образование сплошного стелющегося по стенке сосуда слоя клеток. Растущая ткань омывается сложной синтетической средой, содержащей все необходимые вещества для жизнедеятельности клетки. Культивирование ткани должно проводиться в строго асептических условиях и для предотвращения загрязнения культуры ткани бактериальной флорой к ней добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин).

Многие вирусы при росте на культуре ткани вызывают цитопатическое действие - клетки, в которых размножаются вирусы, резко изменяются и затем погибают. В зависимости от вида вируса цитопатическое действие проявляется различно. В культуре ткани цитопатическое может проявляться в виде изменения формы клеток, структуры ядра и цитоплазмы, образования многоядерных образований - синцитина и симпластов. Так, например, о размножении вируса полиомиелита в культуре ткани почки обезьяны можно судить по цитопатогенному эффекту, а также по цветной пробе. При использовании последнего метода в культуру ткани вводят индикатор (фенолрот), который изменяет свой цвет с красного на желтый при нормальном росте культуры ткани.

Серологические методы диагностики.

Реакцию гемагглютинации можно ставить на стекле и в пробирках. Для постановки реакции гемагглютинации готовят разведения вирусосодержащего материала и затем в каждую пробирку добавляют взвесь эритроцитов. Контрольная пробирка не содержит исследуемого материала. Пробирки встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут. При гемагглютинации образуется зернистый осадок с фестончатыми краями, в контроле осадок должен быть в виде диска с ровными краями.

В вирусологии широко пользуются серологическими реакциями с диагностическими целями. Эти реакции (реакция связывания комплемента, реакция нейтрализации, реакция торможения гемагглютинации и др.) используют для идентификации вируса при помощи диагностических сывороток и для определения

антител в сыворотке больных. Реакция нейтрализации вируса определяется по отсутствию патологических изменений в культуре ткани, курином эмбрионе или в организме животных после заражения смесью, содержащей вирус и иммунную сыворотку, предварительно выдержанную в термостате в течение 1-2 часов.

Реакция торможения гемагглютинации заключается в следующем: к различным разведениям исследуемой сыворотки в объеме 0,25 мл добавляют равный объем суспензии вируса, содержащей 4 гемагглютинирующие единицы вируса (4 АЕ). 1 АЕ - наибольшее разведение вируса, вызывающее полную агглютинацию эритроцитов. После встряхивания в каждую пробирку добавляют взвесь эритроцитов. Контрольная пробирка содержит вирус и эритроциты. При нейтрализации вируса иммунной сывороткой реакции гемагглютинации не происходит. В контроле реакция гемагглютинации должна быть положительной. Реакция, торможения гемагглютинации позволяет не только обнаруживать вирус в исследуемом материале или антитела в сыворотке, но и определять их типовую принадлежность (например, грипп).

При вирусных инфекциях, как правило, одновременно исследуют "парные" сыворотки, т.е. сыворотки, взятые в разное время у одного и того же больного. Положительный результат реакции устанавливают по нарастанию титра антител.

Лабораторная диагностика гепатита А. Исследуемым материалом служат

кровь (сыворотка) и фекалии больного. При ранней диагностике основное значение имеет обнаружение нарастания титра антител класса IgM с помощью ИФА, РИА и иммунной электронной микроскопии (ИЭМ). Этими же методами можно обнаружить вирусы или вирусный антиген в фекалиях больных. Выделения вирусов не проводят из-за отсутствия методов, доступных для практических лабораторий.

Специфическая профилактика и лечение. Для профилактики гепатита А используют иммуноглобулин. Препарат вводят детям в предэпидемический период, а также лицам, имевшим контакт с больными. Людям, выезжающим в регионы с высоким уровнем заболеваемости по гепатиту А, рекомендуется введение инактивированной культуральной вакцины.

Микробиологическая диагностика гепатита В. Материалом для исследования служит кровь больного, в которой определяются антигены вируса и антитела против них — анти-HBs, анти-HBc и

анти-НВе классов IgM и IgG. Для этого применяют серологические реакции: ИФА, РИА, РИГА. В будущем важное место займет метод ДНК-гибридизации, позволяющий определять ДНК вируса в крови и клетках печени.

Лечение. Современный метод лечения сводится к применению иммуномодуляторов, в частности интерферона-реаферона, полученного методом генетической инженерии.

Профилактика. Неспецифическая профилактика основана на предупреждении парентерального заражения при инъекциях, переливаниях крови, операциях, выявлении носителей и отстранении их от донорства, использовании медицинских инструментов одноразового пользования.

Для специфической профилактики разработана и применяется рекомбинантная вакцина из HBs-антигена, полученная методом генетической инженерии .

Контрольные вопросы.

1. Особенности биологии вирусов.
2. Принципы классификации вирусов.
3. Вирион, его структура, размеры и химический состав.
4. Роль вирусов в патологии человека.
5. Методы культивирования вирусов на культурах клеток, куриных эмбрионах, лабораторных животных.
6. Виды культур клеток.
7. Структура и биологические свойства возбудителя гриппа, полиомиелита и заболеваний, вызываемых аденовирусами.
8. Патогенез и клиника гриппа, кори и гепатита.
9. Методы лабораторной диагностики гриппа, кори и гепатита.
10. Эпидемиология, лечение и профилактика гриппа, кори и гепатита.

Инновационные методы, применяемые на занятии: Ситуационная задача № 27

Из всех ОРВИ грипп является наиболее массовым и тяжелым заболеванием. Пандемии и эпидемии гриппа охватывают до 30-50% и более населения земного шара.

1. Каким вариантом вируса связаны пандемии и эпидемии гриппа?
2. Почему?

Ситуационная задача № 28

Участковый педиатр был вызван к 8-летнему мальчику. Ребенок болен 2-й день. Заболел внезапно, резко поднялась температура ($38,5^{\circ}\text{C}$), появились сильная головная боль, мышечные боли, слабость, першение в горле. В его классе болеет несколько детей. Врач поставил диагноз «ОРВИ, возможно грипп».

1. Какие методы следует использовать для уточнения диагноза?
2. Исследуемый материал?

Ситуационная задача № 29

Молодой человек 23 лет, при поступлении на пищевое предприятие был направлен на медицинское обследование. Из скрининговых исследований методом ИФА на гепатиты положительной оказалась реакция на гепатит В. Назовите маркеров активности гепатита В.

Ситуационная задача № 30

Мальчик 9-ти лет болен 30 -й день. При обследовании врач констатировал высокую температуру ($38,5^{\circ}\text{C}$), кожа чистая, сыпи нет, сухой грубый кашель, нос заложен, слизистая носоглотки гиперемирована, на слизистой щек имеются пятна Филатова-Коплика. Врач поставил предварительный диагноз «Корь, катаральный период».

1. Опишите патогенез кори.
2. Какие методы лабораторной диагностики следует применить для подтверждения диагноза?

3. Какие биопрепараты применяют для специфической активной и пассивной профилактики кори?

1. Тренинг Бумеранг

Студенты делятся на группы, и каждой группе дается свое задание

по теме занятия. Каждая группа, состоящая из 3-4 студентов высказывает свое мнение и между группами начинают дискуссию в виде вопросов и ответов.

Задание для 1-ой группы

- 1.Классификация вирусов
2. Характер иммунитета при гриппе
- 3.Как происходит заражение корью

Задание для 2-ой группы

- 1.Метод диагностики вирусов
- 2.Классификация гриппа по родам
- 3.Возбудитель гепатита

Задание для 3-ой группы

- 1.Лабораторная диагностика гепатита
- 2.Препараты для лечения гриппа
- 3.Лабораторная диагностика кори

“Блиц-игра”

Методы лабораторной диагностики гепатита “В”

Групповая оценка	Групповая ошибка	Правильный ответ	Индивидуальная ошибка	Индивидуальная оценка	Наименование действий

					Материал для исследования: кровь, фекалии, парные сыворотки крови. Ранняя лабораторная диагностика вирусных гепатитов осуществляется по биологическим показателям сыворотки крови больных, отражающих функциональное состояние печени. 1) по количеству свободного и связанного билирубина в сыворотке крови судят о нарушении пигментной функции печени в ранние сроки заболевания. 2) ферментативная активность клеток печени определяется по активности специфических ферментов печени: фруктозо-монофосфата альдолазы, а также аланин бета-кислотной аминотрансферазы. 3) для оценки белково-синтетической
--	--	--	--	--	--

					функции печени ставят тимоловую пробу. 4) исследуют сыворотку крови больного с целью обнаружения НВС АГ путем реакции двойной диффузии в агаровом геле, встречного иммуноэлектро-осмофореза.
--	--	--	--	--	--

Лабораторное занятие №18

РАБДОВИРУСЫ (ВИРУС БЕШЕНСТВА), СПИД, ЭНТЕРО-, НЕЙРОВИРУСЫ (ПОЛИОМИЕЛИТ).

18.1 Вирус бешенства

Таксономия. Возбудитель бешенства — РНК-содержащий вирус, относится к семейству Rhabdoviridae (от греч. rhabdos — прут), роду Lyssavirus.

Морфология и химический состав. Вирioны пулевидной формы (см. рис. 2.10), размером 170х70 нм, состоят из сердцевинки, окруженной липопротеидной оболочкой с шипиками гликопротеидной природы. РНК — однонитчатая, минус-нитевая.

Культивирование. Вирус бешенства культивируют в мозговой ткани белых мышей, сирийских хомячков, кроликов, крыс, морских свинок, овец и др. У зараженных животных развиваются параличи конечностей, затем они погибают. Вирус бешенства может быть адаптирован к первичным и перевиваемым культурам клеток и куриным эмбрионам. В цитоплазме пораженных вирусом клеток головного мозга животных или культур ткани

образуются специфические включения, впервые описанные В. Бабешем (1892) и А. Негри (1903) и поэтому названные тельцами Бабеша—Негри. Включения сферической или овальной формы, величиной от 0,5 до 20 мкм, хорошо окрашиваются кислыми

красителями, содержат вирусный антиген, имеют диагностическое значение.

Антигенная структура. В составе вируса бешенства обнаружены сердцевинные и поверхностные антигены. Гликопротеидный антиген (белок шипиков) обладает выраженными иммуногенными свойствами. Существуют два вируса бешенства, идентичных по антигенным свойствам: дикий, циркулирующий среди животных, патогенный для человека, названный уличным вирусом, и фиксированный вирус (*virus fixe*), полученный Л. Пастером в лабораторных условиях путем длительных пассажей уличного вируса через мозг кроликов. В связи с утратой последним вирулентности для человека Л. Пастер использовал этот вирус в качестве антирабической вакцины.

Резистентность. Вирус бешенства малоустойчив в окружающей среде: быстро погибает под действием солнечных и УФ-лучей, дезинфицирующих средств (фенол, хлорамин, формалин), чувствителен к жирорастворителям и щелочным растворам. Длительно сохраняется при низкой температуре (-20°C). **Эпидемиология.** Бешенство известно с древних времен. Это типичная зоонозная инфекция, которая широко распространена на земном шаре. Все теплокровные животные могут болеть бешенством. Однако в силу особенностей механизма передачи (через укус) циркуляцию вируса в природе обеспечивают дикие и домашние плотоядные животные, главным образом собаки, волки, лисицы, енотовидные собаки, шакалы, кошки. Природные очаги бешенства имеются повсеместно. Человек является случайным звеном в эпидемическом процессе и не принимает участия в циркуляции вируса в природе. Вирус бешенства накапливается и выделяется через слюнные железы животного во время болезни и в последние дни инкубационного периода. Механизм передачи возбудителя — прямой контактный, в основном при укусах, в меньшей степени при обильном ослюнении кожи, имеющей царапины и ссадины. Роль больного человека как источника инфекции минимальна, хотя слюна его и содержит вирус бешенства. Имеются лишь единичные случаи заражения человека человеком.

Патогенез и клиническая картина. Вирус бешенства обладает выраженными нейротропными свойствами. Из места внедрения

вирусы поступают в ЦНС по периферическим нервным волокнам, размножаются в ней, а затем распространяются центробежно, поражая всю нервную систему, в том числе нервные узлы некоторых железистых органов, особенно слюнных желез. В последних вирусы размножаются и выделяются со слюной в окружающую среду.

Инкубационный период при бешенстве у человека варьирует от 7 дней до 1 года и более в зависимости от локализации и характера повреждения, а также вирулентности штамма. Наиболее короткая инкубация наблюдается при обширных укусах головы.

В клинической картине бешенства у человека различают следующие периоды: предвестников (продромальный), возбуждения и параличей. Заболевание начинается с появления чувства страха, беспокойства, раздражительности, бессонницы, общего недомогания, воспалительной реакции на месте укуса. Во второй период болезни резко повышается рефлекторная возбудимость, появляются гидрофобия (водобоязнь), спазматические сокращения мышц глотки и дыхательной мускулатуры, затрудняющие дыхание; усиливается слюноотделение, больные возбуждены, иногда агрессивны. Через несколько дней возникают параличи мышц конечностей, лица, дыхательной мускулатуры. Продолжительность заболевания 3—7 дней. Летальность 100 %.

Иммунитет. Естественно приобретенный иммунитет не изучен, так как обычно заболевание заканчивается смертью. Искусственно приобретенный иммунитет возникает после проведения вакцинации людям, укушенным бешеными животными. Он обусловлен выработкой антител, сохраняющихся в течение года, образованием интерферона, а также клеточными факторами иммунитета.

Лабораторная диагностика. Лабораторные исследования проводят посмертно. В качестве исследуемого материала используют кусочки головного и спинного мозга, подчелюстные слюнные железы согласно правилам, предусмотренным для работы с особо опасным инфекционным материалом.

Экспресс-диагностика основана на обнаружении специфического антигена с помощью РИФ и ИФА и телец Бабеша—Негри.

Выделяют вирус с помощью биопробы на белых мышах.

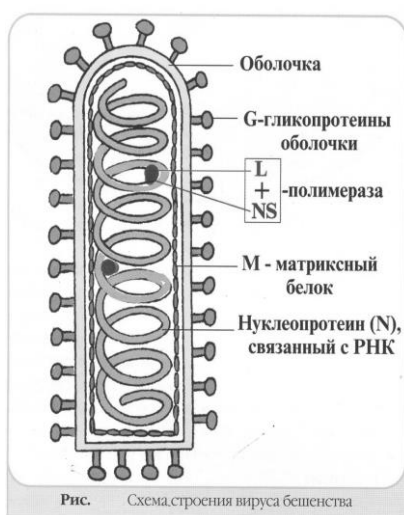
Специфическая профилактика и лечение. Вакцины против бешенства были разработаны и предложены Л.Пастером. Вакцины, полученные из мозга зараженных животных — кроликов, овец, могут вызывать осложнения, поэтому их используют редко. В нашей стране применяют антирабическую культуральную концентрированную вакцину, полученную из штамма Внуково-32 (происходит от фиксированного вируса Пастера), инаktivированную УФ- или гамма-лучами.

Лечебно-профилактической вакцинации подвергают лиц, укушенных или ослюенных больными или подозрительными на бешенство животными. Прививки необходимо начинать как можно раньше после укуса. В тяжелых случаях применяют комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и вакцины. Разрабатываются генно-инженерные антирабические вакцины. Лечение симптоматическое.

Вирус является возбудителем бешенства (рис. 54).

Методы лабораторной диагностики

Обнаружение в мозге Телец Бабеша-Негри (рис.55).



Обнаружение в мозге специфического антигена методом флюоресцирующих антител.

Обнаружение вируса методом заражения лабораторных животных.

Препараты для профилактики и лечения бешенства:

- I. Антирабическая сухая живая вакцина. Высушенная 5% фенолизированная взвесь мозга овец, кроликов (вакцина Ферми), зараженных фиксированным вирусом бешенства в 1 ампуле 3 мл препарата. Впервые разработал Л.Пастер в 1885 г. Назначение: прививки по эпид.
- II. показаниям (укус, осложнение заболевшими или неизвестными животными). Лечение бешенства в период инкубации. Срок годности 3 года.

III. Антирабическая сухая вакцина МИВП. Готовят из мозга сосунков белых крыс, зараженных фиксированным вирусом бешенства.

IV. Антирабический гамма-глобулин. Гамма-глобулиновая фракция, извлеченная методом спиртового фракционирования на холоде из сыворотки лошадей гипериммунизированных фиксированным вирусом бешенства. Разработан в Томском ИВС.

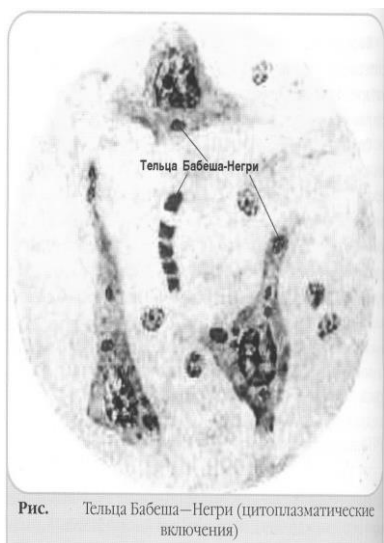


Рис. Тельца Бабеша—Негри (цитоплазматические включения)

Назначение: пассивная экстренная профилактика и лечение бешенства в период инкубации. Применяют внутримышечно из расчета 0,25- 0,5 мл.

18.2 Вирус иммунодефицита человека

Относится к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Lentivirinae*. Вызывает медленно протекающее инфекционное заболевание, связанное с первичным поражением клеток системы иммунитета, развитием вторичного иммунодефицита, на фоне которого активизируется условно-патогенная и непатогенная микрофлора. Период выраженных клинических проявлений болезни назван «синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД)». Для обозначения всего заболевания принят термин «ВИЧ-инфекция».

ВИЧ открыт в 1983 г. Л. Монтанье в Париже и Р. Галло в США.

Структура вируса. Вирионы ВИЧ имеют сферическую форму, 100-120 нм в диаметре (рис. 29). Внешняя оболочка образована двойным липидным слоем с гликопротеиновыми «шипами». Каждый «шип» состоит из двух субъединиц (gp41 и gp120). Липидный слой происходит из внешней мембраны клетки хозяина. Оба белка (gp41 и gp120) образуются при разрезании белка внешней оболочки ВИЧ-gp160.

Под внешней оболочкой расположена сердцевина вируса, образованная белками p18 и p24. В сердцевине заключены РНК, обратная транскриптаза и внутренние белки (p7 и p9).

Геном ВИЧ представлен двумя идентичными копиями однонитевой РНК, соединенными на одном из концов водородными связями. В геноме ВИЧ содержится 9 генов. Три структурных гена *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*), *env* (*envelope*) кодируют компоненты вируса: ген *gag* – внутренние белки, входящие в состав сердцевины и капсида, ген *pol* – обратную транскриптазу, ген *env* – гликопротеины gp 41 и gp 120 (рис.29).

Остальные гены являются регуляторами структурных генов. Фермент обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза) осуществляет обратную транскрипцию – синтез ДНК по матрице РНК вируса. Эта ДНК встраивается в клеточный геном и называется провирусом.

Антигены. Антигенными свойствами обладают поверхностные гликопротеины (gp160, gp120, gp41), внутренние белки (p24, p18 и др.) и нуклеопротеиды p7, p9.

В настоящее время выделяют две антигенные разновидности вируса: ВИЧ-1, ВИЧ-2. К основным антигенам у инфицированных людей образуются антитела. Вначале появляются АТ к gp120, gp41, затем к p24, которые длительно сохраняются в крови.

ВИЧ обладает уникальной антигенной изменчивостью, которая в тысячи раз превосходит изменчивость вируса гриппа. Это связано с высокой скоростью его транскрипции, в сотни раз превышающей данный показатель других вирусов.

Интенсивная антигенная изменчивость ВИЧ дает возможность вирусу «скрыться» от специфических антител и факторов клеточного иммунитета, что приводит к хронизации инфекции. С другой стороны, повышенная антигенная изменчивость затрудняет создание вакцины для профилактики ВИЧ-инфекции.

Культивирование и репродукция. Для культивирования используют культуры Т-лимфоцитов, имеющих рецепторы CD4 (Т-хелперы).

Взаимодействие ВИЧ с чувствительными клетками (Т-хелперами, макрофагами) происходит в несколько стадий:

- адсорбция, которая происходит при связывании gp120 с CD4-АГ на поверхности Т-хелперов и макрофагов;
- проникновение в клетки путем рецепторного эндоцитоза; для успешного проникновения вируса требуется дополнительное взаимодействие gp120 вируса с клеточным хемокиновым рецептором CCR5;
- высвобождение вирусной РНК;
- синтез молекулы вирусной ДНК на матрице РНК при помощи обратной транскриптазы;
- встраивание вирусной ДНК с помощью вирусной интегразы в геном Т-хелперов и образование провируса, который сохраняется в клеточных поколениях длительное время;
- репродукция ВИЧ – происходит только при транскрипции провирусной ДНК в геноме Т-хелперов при участии клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы, т.е. РНК ВИЧ самостоятельно не реплицируется;
- синтез РНК, трансляция и формирование вирусных белков, важную роль в этом процессе играет вирусная протеаза;
- сборка и выход новых вирусов через мембрану клетки, при этом возможен прямой переход вируса из инфицированной клетки в неинфицированную.

Резистентность. ВИЧ малоустойчив в окружающей среде. При комнатной температуре сохраняется до 4 суток, после обработки спиртом, эфиром инактивируется через 5-10 минут, быстро гибнет при действии моющих средств. Нагревание до 60°C обезвреживает вирус в течении 30 минут, до 80°C – в течении 6-7 минут, при кипячении быстро погибает. Полная инаktivация вируса происходит при действии 0,3% раствора перекиси водорода, 0,5% раствора фенола, 0,2% раствора гипохлорита натрия.

ВИЧ достаточно устойчив к высушиванию, малочувствителен к УФ-лучам.

Эпидемиология. Источником инфекции являются больной и вирусоноситель. ВИЧ выделяется со всеми биологическими жидкостями. В достаточной для заражения концентрации вирус содержится в сыворотке крови и в сперме.

Механизм передачи – парентеральный, через кровь и другие биологические жидкости.

Пути передачи:

- половой (при обычном и при гомосексуальном контакте);
- при медицинских манипуляциях (при переливании крови, плазмы, сыворотки и через нестерильные медицинские инструменты);

- трансплацентарный (от матери к плоду) и через грудное молоко от ВИЧ-инфицированной матери к ребенку.

Группы риска: гомо- и бисексуалы, наркоманы, больные гемофилией, дети больных родителей, медработники.

ВИЧ-инфекция распространена на всех континентах в большинстве стран. Число больных удваивается каждые 8-10 месяцев. Это кризисная инфекция, угрожающая существованию человечества, поэтому ВОЗ разработала меры по ограничению ее распространения. На конец 2002 года в мире выявлено 42 млн лиц, инфицированных ВИЧ. За этот год более 3 млн из них умерло. В Беларуси выявлено более 4500 ВИЧ-инфицированных.

Патогенез. Основной мишенью для ВИЧ являются клетки, несущие CD4-рецепторы. В первую очередь это Т-хелперы и моноциты, а также астроциты, сперматозоиды и др. Репродукция вируса из провируса начинается при стимуляции Т-хелперов любыми антигенами.

Разрушение Т-хелперов приводит к глубокому нарушению системы иммунитета. Соотношение Тх/Тс становится меньше 1,0 (норма 1,4-2,0). Снижается абсолютное число Тх (менее 400 клеток в 1 мл крови при норме 800-1000 клеток /мл). Ослабляются иммунные реакции, снижается продукция иммуноглобулинов В-лимфоцитами, интерферона, комплемента, интерлейкинов.

В результате заражения макрофагов они активируются, выделяют ИЛ1 и аФНО, которые индуцируют воспаление. Эти цитокины, особенно аФНО, стимулируют транскрипцию вируса, интегрированного в геном клетки. Макрофаги становятся основным резервуаром вируса в организме. Они переносят вирус в разные органы (мозг, почки и др.), а также инфицируют Т-хелперы при контакте с ними в лимфоузлах.

В результате организм становится беззащитным против экзогенных и эндогенных инфектов. На фоне иммунодефицита развиваются тяжелейшие инфекции, вызванные условно-патогенными микроорганизмами (*Pneumocystis carinii*, криптококками, вирусами герпеса, цитомегалии, токсоплазмами,

кандидами), опухоли (саркома Капоши, вызываемая вирусом герпеса 8 типа).

Клиника. Инкубационный период длится в среднем 1-3 мес, однако может быть 3-10 лет. В этот период скрытого вирусоносительства могут увеличиваться лимфоузлы и появляться антитела. Первичная реакция организма на внедрение ВИЧ обычно сопровождается выработкой антител. Однако от момента заражения до выработки антител обычно проходит в среднем от трех недель до трех месяцев, у 15-25% инфицированных появление антител к ВИЧ в организме совпадает с клиническими проявлениями. Выделяют несколько стадий болезни, переходящих одна в другую.

I. Острая инфекция. Чаще всего встречается между 6-12 недель после инфицирования, но может появиться через 1 неделю, 8-12 месяцев и позже. Наблюдается мононуклеозоподобный синдром (лихорадка, моноцитоз). Эта стадия может протекать в субклинической форме.

II. Асимптомная инфекция (вирусоносительство). Характеризуется отсутствием каких-либо симптомов. Отнесение лиц к этой группе осуществляется на основании данных эпидемиологического анамнеза и лабораторных исследований. Доказательством служит наличие противовирусных антител.

III. Персистирующая генерализованная лимфаденопатия.

Характеризуется наличием выраженной лимфаденопатии в течение трех и более месяцев у лиц с эпидемиологическими и лабораторными данными.

IV. СПИД-ассоциированный симптомокомплекс (пре-СПИД). Эта стадия характеризуется следующими признаками: потерей массы тела до 10% и более; необъяснимой лихорадкой на протяжении 3-х месяцев и более; диареей, длящейся более 1 месяца; синдромом хронической усталости; грибковыми, вирусными, бактериальными поражениями кожи и слизистых; повторным или диссеминированным опоясывающим лишаем, саркомой Капоши; повторными или стойкими вирусными, бактериальными, грибковыми, протозойными поражениями внутренних органов.

V. СПИД. Нарастают оппортунистические инфекции и опухоли в результате развития глубокого иммунодефицита, истощения, что приводит к смерти через 5-10 лет. В ряде случаев заболевание

развивается более быстро и уже через 2-3 года переходит в терминальную стадию.

Лабораторная диагностика. Исследуют сыворотку больного на наличие АТ к антигенам вируса ВИЧ. У 90% больных антитела появляются в течение первых 3 месяцев после заражения, у 5-9% – через 6 месяцев, а у 1% – позже. Это исследование проводят в 2 этапа: на первом из них определяют АТ к вирусным белкам при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). На втором этапе положительные сыворотки исследуют методом иммуноблотинга, в котором выявляют антитела против индивидуальных антигенов вируса. При выявлении антител не менее чем к трем антигенам (gp120, gp41, p24) человека считают ВИЧ-инфицированным.

Методом ПЦР определяют РНК вируса в плазме крови, что используется для контроля за лечением.

Лечение. Для лечения принимают препараты, способные замедлить репликацию ВИЧ-вирусов, *ингибиторы обратной транскриптазы*. Это азидотимидин (АЗТ), который в организме превращается в АЗТ-трифосфат, включается вместо тимидинтрифосфата в вирусную ДНК и синтез дальнейшей цепи прекращается. К препарату часто развивается устойчивость, и тогда следует использовать другие ингибиторы – дидезоксицитидин, инфавиренц и др.

В последнее время для лечения ВИЧ-инфекции широко используется новый класс химиопрепаратов – *ингибиторы вирусной протеазы* (индинавир, саквинавир, нельфинавир и др.) При комбинировании азидотимидина с ингибиторами протеазы (так называемая высокоактивная антиретровирусная терапия, англ. название – *HAART*) прогрессирование болезни существенно замедляется. Вирус перестает обнаруживаться в биологических жидкостях, у больного восстанавливается система иммунитета. Однако ДНК-копии ВИЧ по-прежнему продолжают оставаться в геноме инфицированных клеток системы иммунитета, т.е. излечения не происходит. Помимо этого, все эти средства обладают выраженным побочным действием (развивается диарея, появляются признаки почечнокаменной болезни и т.д.) Требуется весьма строгий контроль за приемом данных лекарственных средств.

Профилактика.

1. Выявление ВИЧ-инфицированных лиц среди угрожаемых контингентов (лица, контактные с инфицированными, проститутки, наркоманы, подозрительные больные).

2. Предупреждение инфицирования медицинского инструментария, лекарств, препаратов крови.

3. Пропаганда знаний по предупреждению заражения ВИЧ при половых контактах (исключение случайных связей, применение средств индивидуальной защиты).

4. Предупреждение заражения медработников при контакте с больными и их биологическими жидкостями (кровь, секреты, экссудаты, моча и т.д.).

Сейчас предпринимаются попытки создания вакцины на основе белка gp120 и антиидиотипических вакцин на основе АТ против CD4, однако по-прежнему главными остаются неспецифические профилактические меры.

СПИД – синдром приобретенного иммунитета дефицита – инфекционное заболевание, впервые диагностированного в США в 1981. Возбудитель –РНК-содержащий вирус, распространен во всех странах с высокой смертностью среди заболевших.

Вирус СПИДа впервые описан в 1893 г. Имеет палочковидную, овальную, реже круглую форму; содержит внешнюю липидную мембрану, два типа гликопротеинов, два типа белков, РНК и фермент ревертозу. Этот фермент катализирует в пораженной вирусом клетке реакцию синтеза нити ДНК по матрице вирусной РНК.

СПИД еще называют HIV (от англ.)

Он имеет выраженный тропизм к Т-лимфоцитам (хелперам). В настоящее время различают HIV-I и HIV-II, отличающиеся поверхностными белками.

Вирус неустойчив в окружающей среде, чувствителен ко многим антисептикам, при прогревании при 56 °С – 30 мин. вирус снижает инфекционную активность

Болезнь передается:

- при незащищенном половом контакте с ВИЧ-инфицированным человеком

- через кровь: при переливании инфицированных препаратов крови , при использовании острых инструментов (для бритья, игл

для татуировок и инъекций и др.), которые были в контакте с инфицированным человеком и не прошли соответствующую обработку.

- от инфицированной женщины к ребенку во время беременности, родов и грудного вскармливания.

Болезнь не передается:

- при рукопожатиях
- при поцелуях
- при объятиях
- через укусы насекомых
- через бельё и одежду
- через слюну, слёзы и при чихании
- через пищу и посуду
- при совместном купании в бассейне
- при пользовании общим туалетом



Рис. 56 Саркома Капоши. Поражение кожи голени и стопы.



Рис. 57 Саркома Капоши. Поражение слизистой оболочки нёба.

Симптомы СПИДа: инкубационный период 4-6 недель.

После заражения:

- повышение температуры
- головная боль
- слабость
- пятнисто-полужелезная сыпь
- припухание железы

Позже:

- утомляемость
- потливость
- похудение
- лимфаденопатия.
- кашель, продолжающийся более месяца
- жидкий стул в течение нескольких недель

Лабораторный диагноз СПИД: основан на обнаружении возбудителя или специфических антител к нему. Вирус СПИД– может быть найден в крови, лимфе, сперме, слюне, грудном молоке. Через 8-12 недель после инфицирования накапливаются антитела, которые выявляют с помощью реакций непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментного метода. На ранней стадии инфекции

определяются антитела к р 24 и р 41. Снижение титра антител к р 24 является плохим прогностическим признаком. В разгар заболевания антитела выявляют у 90-95 % , а в терминальной стадии – у 50-60 % больных.

Кроме вышеописанных методов диагноза есть косвенные подтверждения диагноза СПИД. При этом учитываются: 1) снижение общего количества лимфоцитов и T-helper-ов

2) аллергические реакции на грибковые и бактериальные аллергены,

3) выработка эндогенного интерферона при росте уровня сывороточных иммуноглобулинов.

Специфическая профилактика пока еще не разработана.

Профилактические мероприятия нацелены главным образом на повышение знаний у населения о СПИДе (здоровый образ жизни, правильные сексуальные поведения), борьба с проституцией, наркоманией, использование кондомов, применение одноразовых игл и шприцов.

Лечение: азотимидин, зидовудин, ретровир, активирование иммунной системы интерфероном, антибиотик фузидин.

При саркоме Капоши используют радиотерапию (рис. 56,57).

Семейство пикорнавирусов (Picornaviridae)

Вирусы из семейства *Picornaviridae* (образовано от двух слов: *picos* – маленький, *RNA* – содержит РНК) имеют размеры 17-40 нм; кубический тип симметрии; содержат (+)РНК, линейную, ондонитчатую, обладающую инфекционностью; состоят из 60 капсомеров; суперкапсида нет. Вирусы не имеют липидов, устойчивы к эфиру и детергентам.

В семействе имеются

роды: *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*.

Энтеровирусы

К роду энтеровирусов относятся: 3 типа (1, 2, 3) вируса полиомиелита, патогенные для человека; вирусы Коксаки А 1-22, 24; Коксаки В 1-6 серотипы; вирус ЕСНО 1-33 серотипы (кроме 10, 22, 23, 28 типов); пареховирусы – типы 22, 23; энтеровирусы серотипов 68-71.

18.3 Вирус полиомиелита (*Poliovirus*).

Вирус полиомиелита вызывает полиомиелит – одно из древнейших заболеваний человека, о чем свидетельствуют археологические материалы. Полиомиелит – воспаление серого вещества мозга (*polies* – серый, *myelitis* – воспаление спинного мозга). Открыт в 1909 г. Ландштейнером и Поппером при заражении обезьян мозговой тканью ребенка, умершего от полиомиелита. Полиовирус представлен тремя серотипами, которые относятся к роду *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*.

Морфология и свойства. Вирион представляет икосаэдрическую частицу диаметром 27 нм, капсид состоит из 60 субъединиц, каждая из которых содержит 4 белка (VP1-VP4) и окружает геном, представленный одноцепочной (+)РНК. Капсидные и некапсидные белки вириона формируются путем расщепления крупных полипротеинов-предшественников. Три более крупных белка (VP1-VP3), сходны по строению. Полипептидная цепь каждого из них образует плотно лежащие петли и формирует структуру типа «бочонка» из 8 цепей, которые удерживаются водородными связями. Между «бочонком» и аминным и карбоксильным концевыми участками белка аминокислотная цепь образует петли, на которых находятся поверхностные антигенные детерминанты вириона, которые вызывают синтез антител, нейтрализующих инфекционность вируса. Малый внутренний белок VP4 связан с вирусной РНК, участвует во встраивании ее в капсид вириона.

Вирус имеет особенности: не содержит гемагглютинаина, не культивируется в курином эмбрионе и в организме экспериментальных животных.

Резистентность. Устойчив во внешней среде: в воде, молоке, сточной канализационной воде сохраняет активность при 0°C в течение года, при кислых значениях рН в течение 1-3 часов,

имеет плавучую плотность $1,34 \text{ г/см}^3$. Так как вирион не имеет оболочки, содержащей липиды, он не повреждается растворителями жиров (этиловым эфиром, хлороформом). Одномолярный раствор хлористого магния защищает полиовирус от тепловой инактивации, что используется для термостабилизации оральной вакцины. При 50°C инактивируется в течение 30 минут, при 20°C – 3 месяца, на овощах сохраняется 20 дней. Вирус быстро погибает в 1% растворе хлорамина, 3% перекиси водорода, чувствителен к УФ-лучам.

Репродукция. Вирусы адсорбируются на липопротеиновых рецепторах клетки, в которую они проникают путем виropексиса – вирус связывается с клеточной мембраной, образуется микровакуоль.

После освобождения вириона от капсида образуется репликативная форма РНК, которая является матрицей для синтеза информационной РНК. Репродукция происходит в цитоплазме. Вначале синтезируется единый гигантский полипептид, который разрезается протеолитическими ферментами на несколько фрагментов. Одни из них представляют капсомеры, из которых строится капсид, другие – внутренние белки, третьи – вирионные ферменты. Далее формируются несколько сотен вирионов в каждой инфицированной клетке, которые освобождаются после лизиса клетки.

Культивирование. В лабораторных условиях вирус культивируют в первичных или перевиваемых культурах клеток различных тканей человека и обезьян. Полиовирус, выделяемый из естественных источников, способен инфицировать только клетки приматов, содержащие на клеточной поверхности специфические мембранные рецепторы для вируса.

Патогенез и клиника. Источник инфекции – больные люди и вирусоносители. Путь заражения – фекально-оральный, чаще алиментарный или водный. Инкубационный период 7-14 дней. Вирус попадает в носоглотку (лимфоглоточное кольцо Пирогова), далее в лимфатический аппарат тонкого кишечника, а затем проникает в кровь. Из кровяного русла вирус может

проникать в ЦНС, если нейтрализующие антитела не вырабатываются в количествах, достаточных для блокирования этого пути. В ЦНС вирус распространяется вдоль нервных волокон и в процессе внутриклеточного размножения может повредить или полностью разрушить нервные клетки, результатом чего может быть вялый паралич. Чаще поражаются клетки передних рогов спинного мозга, в тяжелых случаях вирус проникает в головной мозг. Нарушение функций периферических нервов и двигательной мускулатуры являются следствием размножения вируса в мотонейронах. Изменения в этих клетках развиваются быстро.

Если человек инфицируется вирулентным полиовирусом, могут быть: бессимптомная инфекция, легкие клинические формы без параличей, асептический серозный менингит, паралитический полиомиелит (отмечается в 1% случаев полиовирусной инфекции).

Легкие формы заболевания могут протекать с лихорадкой, головными болями, тошнотой, рвотой, запором, ангиной. В течение нескольких дней больной выздоравливает. Асептический менингит кроме перечисленных признаков может проявляться ригидностью и болями в затылке и спине; болезнь длится 2-10 дней и заканчивается выздоровлением.

При паралитическом полиомиелите возникает вялый паралич, обусловленный поражением мотонейронов. Некоторое восстановление утраченных функций может произойти в течение 6 месяцев после начала болезни, но остаточные параличи сохраняют постоянный характер.

Иммунитет. После заболевания остается стойкий иммунитет к соответствующему серотипу вируса. Пассивный иммунитет (после рождения) сохраняется в течение 4-5 недель жизни ребенка. Протективными свойствами обладают вируснейтрализующие антитела, которые появляются до появления параличей. Образование антител в ранние сроки инфекции является результатом размножения вируса в кишечном тракте и глубоких лимфатических структурах до внедрения его в нервную систему. Антитела, появившиеся в крови рано, могут предотвратить переход вируса в ЦНС,

поэтому вакцинация способна защищать ЦНС, если проводится до появления неврологических симптомов.

Понижение устойчивости к полиовирусной инфекции наступает после удаления миндалин и аденоидов, так как после операции резко снижается уровень секреторных антител в носоглотке.

Лабораторная диагностика

Вирусологический метод – выделение вируса и его идентификация. Материал – фекалии больного (в 1 г фекалий содержится до 1 млн инфекционных доз), реже носоглоточный смыв, кровь, ликвор. Материал фильтруют, обрабатывают антибиотиком, вносят в культуру клеток Нер-2 и RD (из рабдомиосаркомы человека). Использование только двух клеточных линий для лабораторной диагностики полиомиелита позволяет стандартизировать полученные результаты. Через 5-7 дней возникает ЦПД в виде мелкозернистой деструкции клеток.

Идентификация вируса проводится в реакции нейтрализации, т. е. в культуры тканей вносят вирус в смеси с поливалентной противополиомиелитной сывороткой типов 1, 2, 3, а затем для определения типа – с отдельными типовыми сыворотками. При идентичности типа вируса и данной сыворотки ЦПД не возникает. Для установления внутритиповых различий между штаммами полиовирусов используют штаммоспецифические адсорбированные поликлональные и моноклональные иммунные сыворотки, молекулярную гибридизацию, полимеразную цепную реакцию и секвенирование вирусного генома.

Для программы ликвидации полиомиелита важное значение имеет дифференциация между штаммами дикого и вакцинного штамма.

Серологический диагноз используют для определения нарастания титра АТ в крови переболевших людей. С этой целью применяют реакцию нейтрализации в культуре ткани с парными сыворотками, полученными в острой стадии болезни и в период реконвалесценции. Ставят РСК, ИФА. При положительном результате выявляют четырехкратное

нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой.

Специфическая профилактика осуществляется живыми и убитыми вакцинами, благодаря которым достигнут значительный прогресс в борьбе с полиомиелитом. ВОЗ принято решение о глобальной ликвидации полиомиелита после 2000 г.

Убитая вакцина получена американским ученым Солком в 1953 г. и содержит вирусы полиомиелита 1, 2, 3 типов, выращенные в почечной ткани обезьян. Она вызывает гуморальный иммунитет – образование IgG и IgM, но не препятствует репродукции вирусов в клетках слизистой оболочки кишечника.

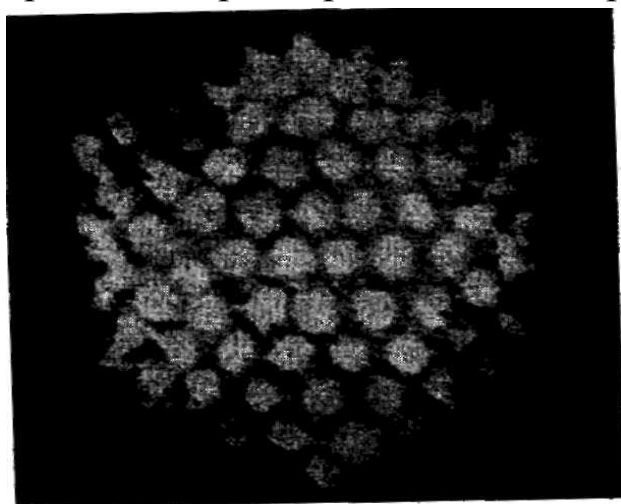
Пероральная живая вакцина типов 1, 2, 3, получена в 1956 г. Сейбиным из аттенуированных штаммов вируса полиомиелита, культивированных в культуре клеток почек африканских зеленых мартышек. Помимо IgG и IgM-антител она индуцирует образование секреторных IgA-антител в слизистой оболочке пищеварительного тракта, особенно тонкого кишечника, и тем самым препятствует циркуляции диких штаммов вируса полиомиелита.

В настоящее время вакцина выпускается в жидком виде, применяется для вакцинации детей, начиная с 3-х месячного возраста, (вводят трехкратно, чтобы создать иммунитет против всех трех типов вируса) с интервалом в 4-6 недель и далее по схеме (в два года и 7 лет).

Для лечения используют сывороточный человеческий иммуноглобулин против полиомиелита, полученный из сыворотки доноров.

Полиомиелит

Полиомиелит-острое инфекционное заболевание, при тяжёлых формах которого развивается поражение ЦНС. Возбудителем



заболевания является энтеральный вирус, входящий в семейство Picarnoviridae род Entorovirus. Вирус содержит РНК, по антигенным

Рис. 53. Вирионы аденовируса человека.

иммуногенным свойствам вирусы полиомелита подразделяют на 3 серотипа I, II, III. Вирус может быть выделен из носовой части глотки в самом начале заболевания и из фекалий в течение нескольких недель. Культивируют полиовирус в культуре клеток человека или обезьяны. Для проведения серологических исследований необходимы так называемые парные сыворотки: первый раз сыворотку у больного берут сразу же после начала заболевания, а второй - через 3-4 нед., чтобы доказать нарастание титра антител. После перенесённого заболевания развивается стойкий иммунитет к тому типу вируса, который вызвал заболевание.

Специфическую профилактику проводят с помощью живой вакцины, применяемой перорально. Для лечения полиомиелита применяют человеческий гамма-глобулин.

Полиомиелит - вирусное инфекционное заболевание. Возбудителем заболевания является энтеральный вирус, входящий в семейство Picornoviridae, род Enterovirus. Вирус содержит РНК. По антигенным и иммуногенным свойствам вирусы полиомиелита подразделяют на 3 серотипа - I, II, III.

Входными воротами заболевания является носоглотка, куда ви-

рус попадает из воды, пищи, загрязненных предметов. Поступая в

пищеварительный тракт, вирус проникает из зева в окологлоточное

лимфатическое кольцо, а из желудка и кишечника - в пейеровы бляшки и мезентеральные лимфатические узлы. В клетках лимфатических

узлов происходит репродукция вирусов, затем они попадают в кишеч

ник и выделяются с испражнениями в окружающую среду. Из кишечника и из носоглотки полиовирус через лимфу проникает в кровь и вызывает состояние вирусемии. На этом процесс может ограничиться, но вирусы через кровь или по периферическим нервам могут проникнуть в ЦНС и поражать передние рога спинного мозга, что вызывает развитие паралича. Такая форма заболевания сейчас встречается очень редко. В основном

полиомиелит протекает с менингеальными симптомами и катаральным состоянием зева. Опасным в эпидемическом отношении является выделение вируса из носоглотки и с фекалиями в первые дни болезни.

Методы лабораторной диагностики

Материал для исследования: Фекалии больных (первая и вторая неделя), носоглоточное отделяемое (первые три дня), в летальных случаях кусочки миндалин, кишечника, содержимое прямой кишки.

Методы ранней диагностики

I. Выделение вируса в культурах клеток. Препараты для профилактики полиомиелита. Полиомиелитная вакцина - вакцина Сэбина пероральная, тип I-III – *Vaccinum Sabin poliomuelitidis vivum per orali tipus I-II-III*. Вакцина представляет собой живой аттенуированный вирус полиомиелита (*штаммы* трех типов), накопленный в первичной культуре клеток почки зеленой мартышки. Вакцину выпускают в жидком виде и в форме конфет-драже. По внешнему виду жидкая вакцина прозрачна и имеет красный цвет. Антиполиодраже могут иметь различную окраску: розовая - I тип, сиреневая - II тип, голубая - III тип, желтая - I + III типы, зеленая - II + III типы и белая - все три типа вируса.

Вакцину применяют перорально, кратность и дозировку определяют согласно наставлению. Срок годности 1 год при хранении при температуре +2 - +4°C.

Для пассивной профилактики и лечения применяют иммуноглобулин

Схема лабораторной диагностики полиомиелита

Материал	Метод исследования	Результаты
Смыв из носоглотки Фильтрат фекалий	Вирусологический 1. Заражение культуры ткани (клетки почки обезьяны, Hela	Цитопатическое действие Положительная реакция

	и др.) 2.Определение типа вируса в реакцииреакции биологической ней- трализации с диагностическими сыворотками типов I, II, и III	нейтрализации с одной из типовых сывороток
Парные сыворотки	Серологический Реакция биологической нейтрализации с вирусами полиомиелита I-III типов	Нарастание титра к одному из типов в 4 раза и более

Контрольные вопросы:

- 1.Вирус бешенства, морфологическая характеристика
- 2.Патогенез, клиника, эпидемиология бешенства.
- 3.Методы лабораторной диагностики бешенства.
- 4.Какой вирус используется для приготовления вакцины против бешенства?
- 5.В каких случаях проводят вакцинацию против бешенства и когда применяют антирабический гамма-глобулин?
- 6.Форма и строение вируса СПИДа
- 7.Механизм иммунологической недостаточности, развивающийся под влиянием вируса СПИДа
- 8.Симптоматика СПИДа
- 9.Вирус полиомиелита – характеристика

Инновационные методы, применяемые на занятии:

Ситуационная задача № 31

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.

1. Укажите, какие препараты можно использовать для профилактики бешенства у укушенного.

Кто впервые получил вакцину против бешенства?

Ситуационная задача № 32

Больной поступил в терапевтическое отделение больницы по поводу пневмонии. В последние полгода часто болеет: повторяется стоматит, обостряется фурункулез и опоясывающий герпес. Больной сильно похудел, отмечает нарастающую слабость. Имел гомосексуальные связи в течение 10 лет. Результат ИФА на ВИЧ-инфекцию положительный..

Предварительный диагноз «ВИЧ-инфекция».

1. Какой материал необходимо взять у пациента.
2. Какой метод лабораторной диагностики использовать для подтверждения диагноза?

“Тур по галерее”

Для работы необходимо:

1. Набор вопросов и ситуационных задач , распечатанных на отдельных листах
2. Чистые листы бумаги
3. Ручки с цветными стержнями
4. Номерки для жеребьевки , по числу студентов в группе

Ход работы:

2. Группа делится на 3 подгруппы
3. Каждая группа садится за отдельный стол, приготавливает чистый лист бумаги и берёт одну из цветных ручек
4. На листе пишется дата, название деловой игры, ФИ студентов- участников данной подгруппы
5. Один из участников берёт из конверта карточку
6. Засекается время 10 мин.

7. В течение 10 мин. в подгруппе обсуждается задание , записывается ответ и по окончании времени обмениваются листами с подгруппой по кругу
8. След. подгруппа оценивает ответ предыдущей и если ответ не полный дополняет его или предлагает свой вариант ответа, если ответ оценивается как ответ неправильный .На этот этап дается 10 мин.
9. По окончании работы (30 мин) на листе оказываются 3 записи разными по цвету ручками
10. Работы сдаются преподавателю , подгруппа которая дала наиболее правильные ответы, получают максимальный балл

Карточка № 1

- 1)Характеристика вируса полиомиелита ;
- 2)Морфологическая характеристика вируса бешенства;
- 3)Форма и строение вируса СПИДа

Карточка № 2

- 1) Характеристика вируса полиомиелита;
- 2) Лабораторный диагноз СПИДа;
- 3) Патогенез , эпидемиологическая клиника вируса бешенства

Карточка № 3

- 1) Лабораторный диагноз вируса бешенства;
- 2) Пути передачи вирусов полиомиелита;
- 3) Симптомы СПИДа

Ответы к ситуационным задачам

Ответ к задаче №1.

1. Бактериологическим методом, то есть посевом смыва с инструментов на мясо-пептонный агар с последующей инкубацией в термостате. Через сутки определяют характер

выросших колоний и микроскопируют. Прогревают смыв с инструментов в течение 5 минут на водяной бане при 100⁰С. Повторяют исследование. Учет результата исследования проводится по отсутствию роста вегетативных форм бактерий.

2. Метод Ожешки.

3. Медицинских инструментов стерилизуют в автоклаве при температуре 120-130⁰С, давлении 1,5-2 атм в течение 20-40 минут, так как стерилизация кипячением эффективна только для вегетативных форм бактерий и не эффективна для спорообразующих.

Ответ к задаче № 2.

1. Для контроля эффективности стерилизации необходимо провести бактериологическое исследование.

2. Стерилизация кипячением эффективна только для вегетативных форм бактерий, не эффективна для спорообразующих.

3. Метод окраски по Ожешке.

Ответ к задаче № 3.

1. Основные компоненты среды Гисса: 1% пептонная вода, 0,5% определенного углевода, индикатор Андрее, поплавки для улавливания газа. Изменение цвета среды является показателем ферментации углеводов до кислоты, пузырьки газа в поплавке – показатель образования CO₂.

2. Такие изменения дает *E.coli*, т.к. она ферментирует маннит и всех углеводов короткого пестрого ряда за исключением сахарозы с образованием кислоты (покраснение среды) и газа (рис.1).

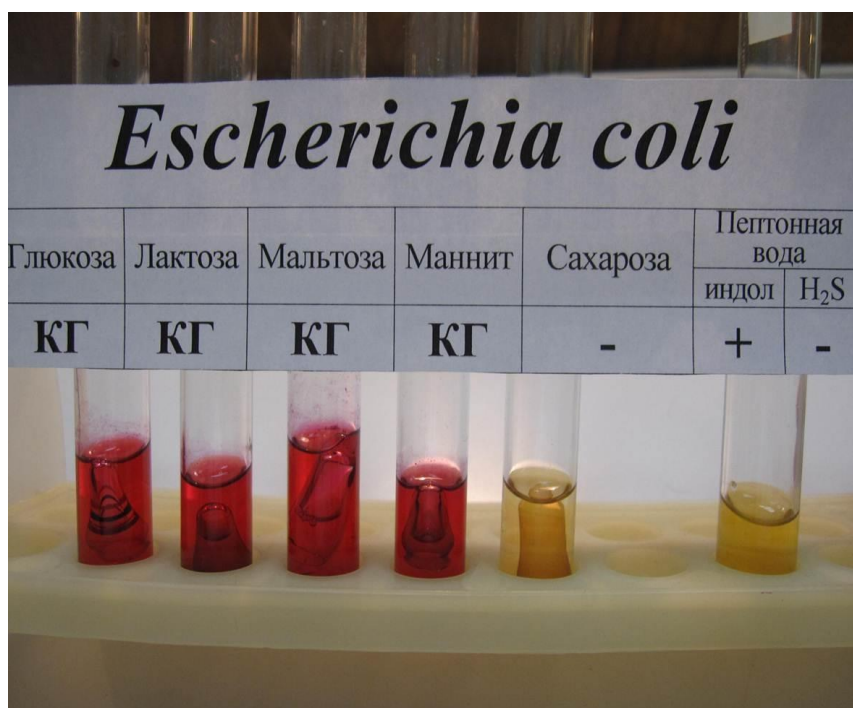


Рис 1. Короткий пестрый ряд (среда Гисса)

Ответ к задаче № 4.

1. Основные компоненты среды Китта-Тароцци: 1% пептонная вода, 0,5% глюкозы, кусочки печени и сверху заливают стерильным вазелиновым маслом.
2. Такие изменения дают *C.perfringens*, который растет в анаэробных условиях в виде диффузного помутнения и ферментирует глюкозу с образованием кислоты и газа (рис.2).

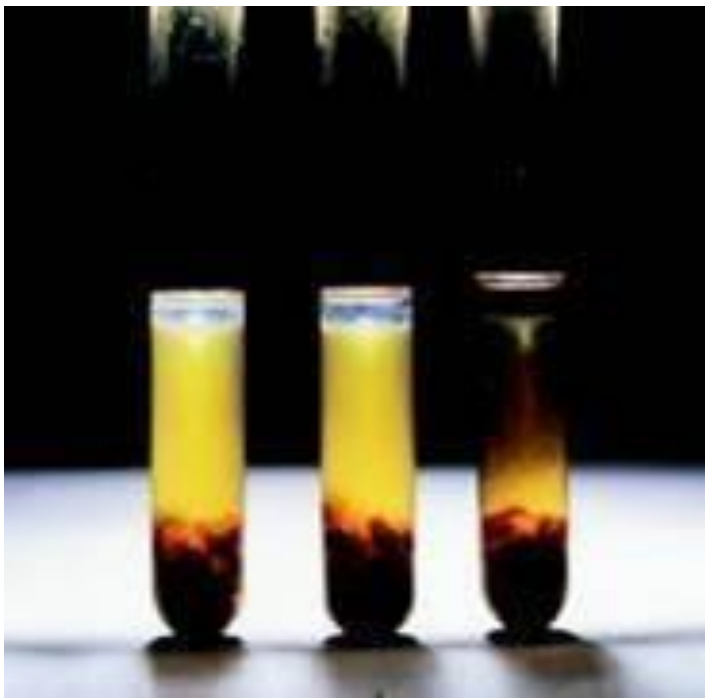


Рис.2. Среда Китта-Тароцци

Ответ к задаче № 5.

1. Метод индикаторных дисков.
2. Бумажные диски, пропитанные антибиотиками, помещают на поверхность МПА в чашки Петри, предварительно засеянного «газоном» исследуемой бактериальной культуры. Посевы инкубируют в течение 18-24 часов, после чего учитывают результаты опыта по образованию светлых зон задержки роста бактерий. По диаметру этих зон ориентировочно судят о чувствительности бактерий к антибиотикам (рис.3).

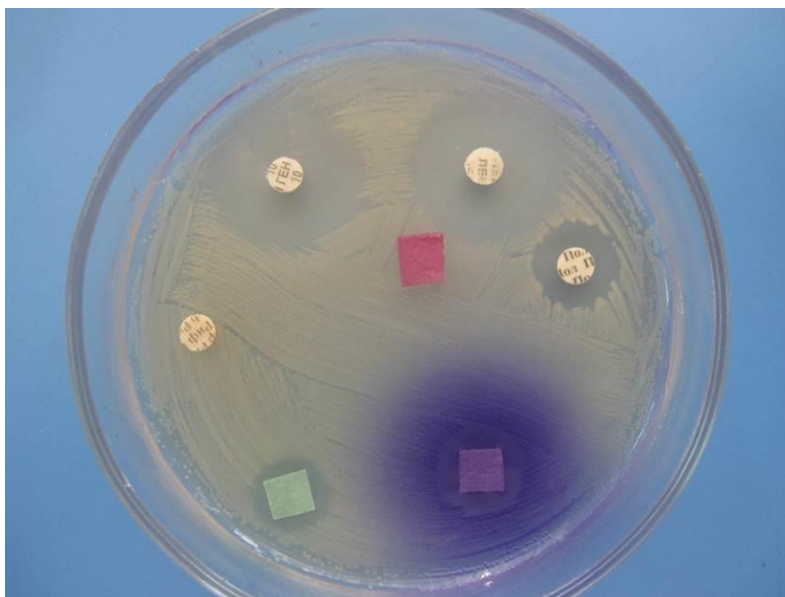


Рис. 3. Определение антибиотикочувствительности бактерий методом бумажных дисков

Ответ к задаче № 6.

1. Нагноение ожоговой поверхности вызвано в данном случае несколькими микробами. Необходимо каждого из них выделить в чистой культуре и определить чувствительность каждого в отдельности к антибиотикам. Суммарное определение антибиотикочувствительности допускается для дачи сигнального ответа.
2. Различной скоростью роста микробов – ассоциантов.

Ответ к задаче № 7.

1. В целях выяснения механизма заражения необходимо провести бактериологическое исследование воздуха родильного зала, операционной, палаты новорожденных, послеоперационной палаты.

2. Для оценки санитарно-бактериологического состояния воздуха определяют следующих показателей: микробного числа воздуха, наличие зеленыша *S. pyogenes* путем посева воздуха на кровяной агар с добавлением генцианового фиолетового, для обнаружения *S. aureus* – на желточносоловой агар, для обнаружения других патогенных бактерий – соответствующие элективные питательные среды.

Этапы определения микробного числа воздуха методом Коха:

1 этап. Отбор пробы воздуха. Стерильные чашки Петри с МПА открывают в месте отбора проб воздуха и выдерживают в течение 10 мин, после чего закрывают и инкубируют при 37⁰С в течение 48 часов.

2 этап. Учет результатов и определение количества микробов в 1м³ воздуха (X), пользуясь правилом Омелянского:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 1000}{v \cdot 10}$$

a – число колоний, выросших на чашке Петри; v – площадь чашки Петри.

Метод Кротова является более точным методом определения микробного числа воздуха с помощью специального прибора.

Ответ к задаче № 8.

1. Любое количественное и/или качественное изменение типичного для данного биотипа состава нормальной микрофлоры, возникающее в результате воздействия различных факторов.

2. Классификация по этиологии: стафилококковый, протейный, кандидовый, эшерихозный, псевдомонадный и др., ассоциированный.

Выделяют 3 степени дисбактериоза:

1 степень. Анаэробная флора преобладает над аэробной, высеваются не более 2-х видов условно-патогенных микробов в небольших разведениях испражнения (10^2 - 10^4).

2 степень. Количество суммарных анаэробных бактерий примерно равно содержанию аэробов. Условно-патогенные микробы выделяются в ассоциациях в больших разведениях испражнения (10^6 - 10^7). Появляются атипичные кишечные палочки (лактозонегативные, гемолизующие).

3 степень. Преобладает аэробная флора. Резко возрастает количество условно-патогенных бактерий.

3. Количество бифидумбактерий.

Ответ к задаче № 9.

1. Заключение врача обосновано (культуральные свойства, факторы патогенности – гемолизины (рис.4).

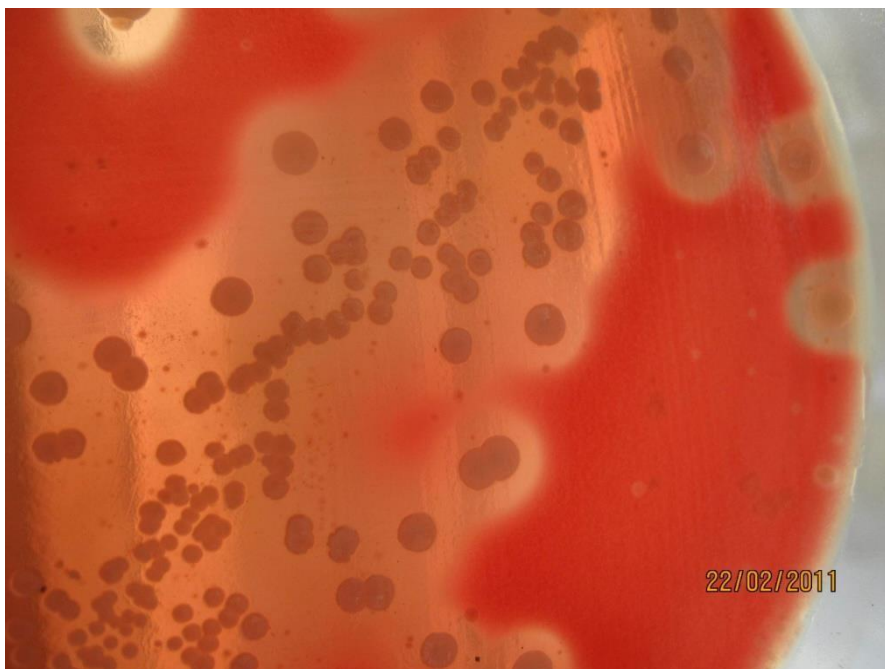


Рис.4. Колонии с зоной гемолиза на кровяном агаре

2. Необходимы дополнительные исследования (выделение чистой культуры, ее идентификация по биохимическим, антигенным свойствам, серотипирование, обнаружение токсина А), так как стрептококк – это условно-патогенный микроорганизм и может быть выделен из материала от больного ошибочно.

Ответ к задаче № 10.

1. Окончательный диагноз ставить нельзя.
2. Необходимо провести бактериологическое исследование, сделать посев на чашки с кровяным и желточно-солевым агаром, определить лецитиназную, гемолитическую, каталазную, плазмокоагулирующую активность, способность разлагать глюкозу и маннит в анаэробных условиях, антибиотикограмму. Кроме того, этиологически значимым является около 10^5 микробных тел в материале (рис.5).

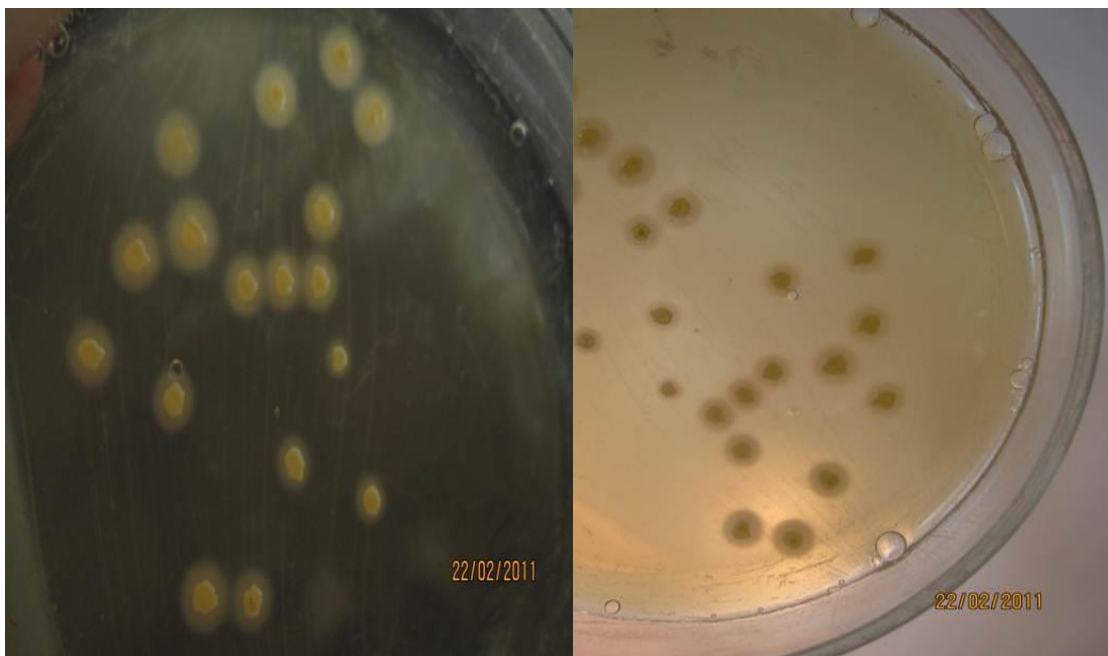


Рис. 5. Желточно-солевой агар

3. Для лечения назначить антибиотики с учетом результата антибиотикограммы.

Ответ к задаче № 11.

N. meningitidis требуют свежеприготовленных, теплых питательных сред. Стимулирует выращивание, содержание в атмосфере 5%-10% CO₂.

Для этого выращивают в эксикаторе с зажженной свечой.

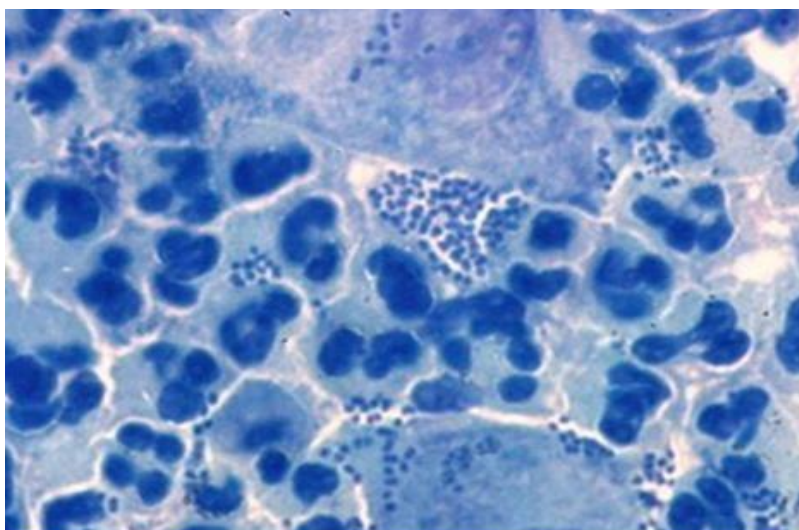
Ответ к задаче № 12.

1. Это не *N. meningitidis*.
2. Следует предположить, что это одна из сходных нессерий, которые отличаются неприхотливостью к питательным средам (растут на бессывороточном агаре) растут при комнатной температуре -22°C.

3. Для достоверности следует исследовать рост на кровяном агаре, на агаре с 0,2 % желчи, по йодному тесту, сахаролитической активности, по наличию каталазы, цитохромиоксидазы, уреазы, способности агглютинироваться специфическими сыворотками.

Ответ к задаче № 13.

1. *Neisseria gonorrhoeae*
2. Микроскопический метод (обнаруживается незавершенный фагоцитоз диплококков при окраске метиленовым синим), бактериологический метод (рис.22).



N.gonorrhoeae. Мазок из гноя. Окраска метиленовым синим.

Рис.22. Незавершенный фагоцитоз

Ответ к задаче № 14.

Пищевые токсикоинфекции — острые инфекции, возникающие в результате употребления пищи, инфицированной микроорганизмами, и характеризуется симптомами гастроэнтерита. В том случае, если в пище находятся только токсины бактерий, говорят о пищевых интоксикациях.

Возбудители пищевых токсикоинфекций: *E.coli*, *C. perfringens*, *S.*

entredtidis и др.сальмонеллы, *Y. enterokolitica*, *P.vulgaris*, клебсиеллы, вибрионы, стафилококки, энтерококки и др. Возбудители пищевых интоксикаций: *C.botulinum*, *S.aureus*, некоторые грибы.

1. **Ответ к задаче № 15.**

2. Основные компоненты среды Ресселя: Скошенный МПА, 1% лактозы, 0,1% глюкозы, индикатор Андреде..

Покраснение всей среды наблюдается при ферментации лактозы, покраснение только столбика - при ферментации глюкозы, а разрывы агара свидетельствуют о газообразовании.

3. При росте *E.coli* наблюдаются изменение цвета всей среды и разрывы агара, т.к. она ферментирует углевод до кислоты и газа.

Ответ к задаче № 16.

1. Основные компоненты среды Эндо: МПА, лактоза, основной фуксин, раствор сульфата натрия.

2. *E.coli* дает окрашенные в цвет индикатора колонии, т.к. расщепляет лактозу (рис.19).



Рис.19. Среда Эндо. При росте лактозоположительных бактерий их колонии окрашиваются в темно-красный цвет с металлическим блеском; лактозоотрицательные энтеробактерии образуют бесцветные колонии

Ответ к задаче № 17

1. Диагноз – ботулизм. Необходимо провести биологическую пробу *in vivo* (остатки пищевых продуктов, рвотные массы и т.д. вводят мышам в смеси с антитоксической сывороткой).
2. Определить ботулинический токсин в реакциях ИФА, РПГА и др.
3. Противоботулиническую антитоксическую сыворотку: сначала поливалентную к типам А, В, Е, затем – моновалентную, если известен тип токсина.

Ответ к задаче № 18.

План микробиологического обследования:

1. Микроскопия мокроты по Цилю-Нильсену.
2. При отрицательном результате – микроскопия мокроты с использованием методов гомогенизации и флотации.

3. Посев мокроты на селективные среды Левенштейна-Йенсена или Финна, оценка роста колоний в течение 1-1,5 месяцев. Идентификация выделенной культуры по наличию корд-фактора, ниациновому тесту, тесту на термолабильную каталазу.
4. При отрицательном результате – проведение ПЦР для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза в мокроте.

Ответ к задаче № 19.

1. Возбудитель дифтерии *C. diphtheria* (рис.7).
2. Дополнительные методы окраски: по Нейссеру и синькой Леффлера.
3. См.ответ задачи №7, пункт 2.

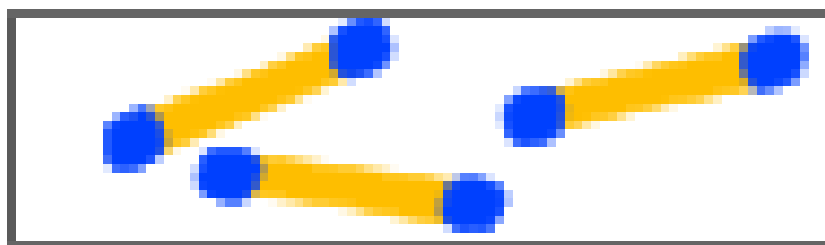


Рис.7.*C. diphtheriae*. Окраска по Нейссеру

Ответ к задаче № 20.

1. Кетгут может быть инфицирован *C. tetani* (рис.11).
2. Необходимо сделать посев кетгута на среду Китта-Тароцци и фильтрат среды ввести двум группам белых мышей. Одной – только фильтрат материала, и мыши погибают при специфическом симптомокомплексе «хвост трубой» – ригидный негибачаемый хвост – восходящий столбняк; другой группе мышей ввести фильтрат материала и противостолбнячную

антитоксическую сыворотку – животные выживают, т.к. происходит реакция нейтрализации экзотоксина антитоксином.

Ответ к задаче № 21.

1. В рану могли быть занесены возбудители газовой гангрены – *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. hystolyticum* и др. и столбняка – *C. tetani*.
2. Для специфической профилактики столбняка вводят столбнячный анатоксин, для лечения – противостолбнячную сыворотку и при подозрении на газовую гангрену – противогангренозную поливалентную антитоксическую сыворотку.

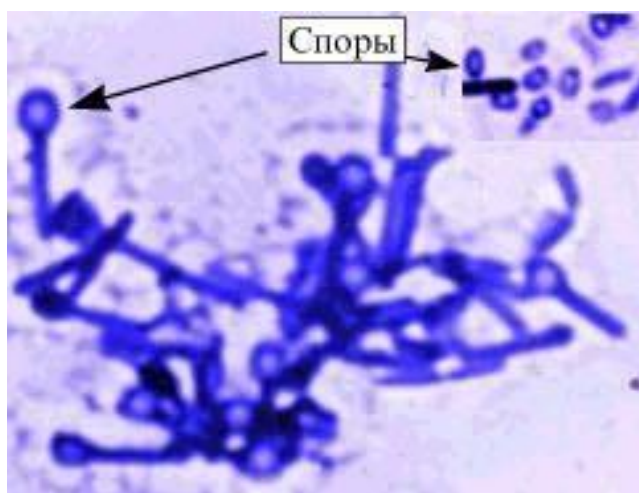


Рис.8. Мазок из чистой культуры *C.tetani*. Окраска по Граму

Ответ к задаче № 22.

1. На скошенный щелочной МПА.
2. См. ответ задачи № 9, пункт 3.
3. *Vibrio cholerae* классический биовар, *Vibrio cholerae* биовар ЭльТор, *Vibrio cholerae* O139 (рис.9).

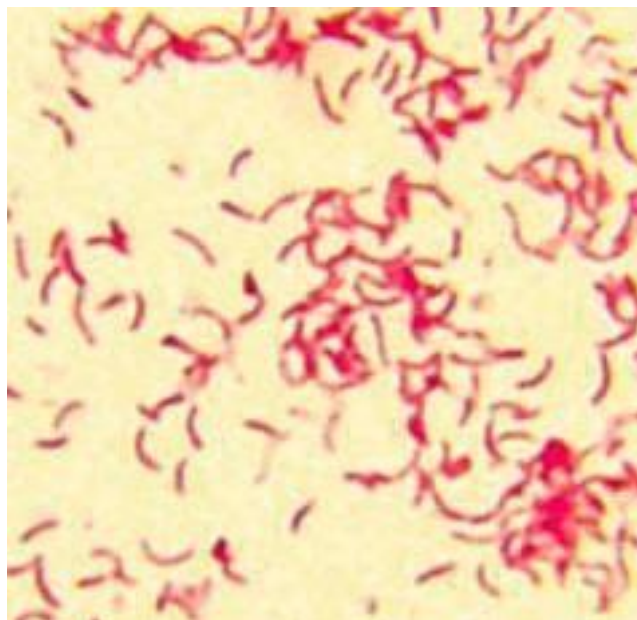


Рис.9. Чистая культура *V.cholerae*. Окраска по Грамму

Ответ к задаче № 23.

Данных недостаточно, так как микроскопическое исследование дает только ориентировочное заключение (по морфологии нельзя точно сказать, что это возбудитель чумы *Yersinia pestis* – овоидная палочка с bipolarным окрашиванием, возможна эта другая иерсиния) (рис.10).

Для подтверждения диагноза «чума» необходимо также произвести бактериологическое исследование с последующей постановкой биопробы.

Используют также экспресс-метод РИФ и серодиагностику.

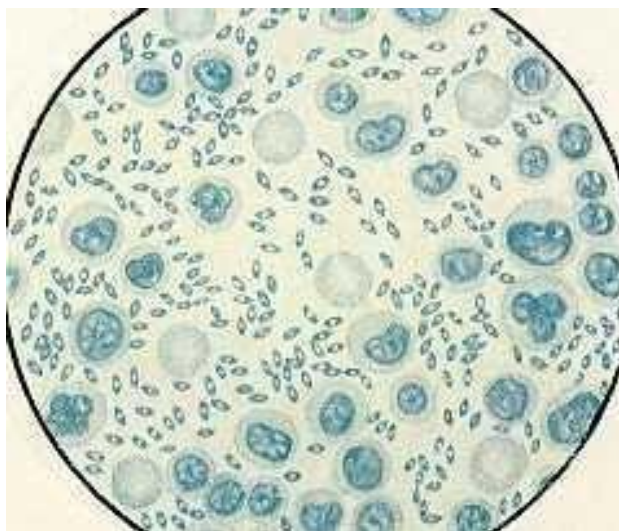


Рис.10. *Y.pestis* в гное из бубона. Окраска метиленовым синим

Ответ к задаче № 24.

1. Отделяемое из первичного очага (сибирязвенного карбункула).

2. Бактериоскопический, бактериологический, биологический и аллергический методы, выявление антигена (РИФ, ИФА, реакция Асколи).

3. Крупные неподвижные грамположительные палочки, располагаются цепочками, окруженными общей капсулой. Образуют споры, которые располагаются центрально (рис.11).

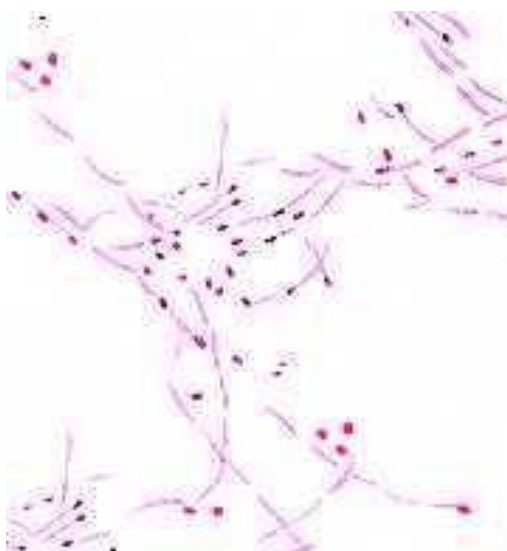


Рис.11. Споры *B.anthraxis*. Окраска по Ожешке

На плотных средах растут в виде крупных шероховатых R-форм колоний. Под микроскопом колонии напоминают «львиную гриву». На средах с пенициллином образуют протопласты (шары в виде цепочки – феномен "жемчужного ожерелья"), выявляемый при микроскопии.

Дают гемолиз на кровяном агаре, разжижают желатин в виде елочки, патогенны для лабораторные животных и отличаются по специфичности.

Ответ к задаче № 25.

1. Это сифилис (первичный период). Для проведения микробиологического исследования необходимо взять отделяемое твёрдого шанкра, материал из язвочек, биоптат региональных лимфоузлов.
2. С целью выявления возбудителя в исследуемом материале применяются микроскопический метод (рис.12), ИФА, РИФ, ПЦР. Результаты серодиагностики (РСК Вассермана, ИФА, РИФ, РИБТ) будут положительными не сразу, а только через 6-7 недель.



Рис.12. *Treponema pallidum* в мазках из твердого шанкра.

Окраска по Романовскому-Гимзе

Ответ к задаче № 26.

1. Реакция Вассермана (РВ) применяется для серодиагностики сифилиса.

2. При заражении больного сифилисом проба на реакцию Вассермана дает положительный результат не сразу, а только через 6-7 недель.

3. При серонегативной стадии первичного сифилиса отрицательная реакция Вассермана не может служить показателем отсутствия болезни и для того, чтобы подтвердить или опровергнуть диагноз, используются комплекс серологических реакций (КСР): ИФА, РИФ, РИБТ. РИФ дает положительный результат на более ранних стадиях сифилиса, чем РВ, из-за ее большей чувствительности. РИБТ позволяет распознать ложноположительный результат РВ, который иногда может быть у здорового человека, поэтому обычно при положительном анализе на РВ его подтверждают или опровергают при помощи данного анализа.

Точнейшим методом диагностики возбудителя является ПЦР-диагностика (до 95% точности).

Ответ к задаче № 27.

1. Возникновение пандемии и эпидемии гриппа связано с вирусом гриппа А.

2. Возникновение пандемии и эпидемии гриппа обусловлено высокой антигенной и генотипической изменчивостью вируса гриппа А. Вытесненные варианты вируса сохраняются и через определенный промежуток времени могут снова вызвать эпидемию.

Ответ к задаче № 28.

1. Диагноз «грипп» базируется на выделении (заражение куриного эмбриона и тканевых культур) и идентификации вируса (по ЦПД, гемагглютинирующей активности, антигенной и генетической структуре), определении вирусных АГ в клетках больного (РИФ, ИФА), РНК вируса (ПЦР) и вирусоспецифических антител в сыворотке больного (РСК и др.).
2. Материал для исследования — носоглоточное отделяемое, которое берут тампонами или отсасывают с задней стенки глотки и носа в первые три дня болезни. Иногда исследуют мазки-отпечатки со слизистой носа.

Для определения антител исследуют парные сыворотки крови больного

Ответ к задаче № 29.

Подтверждением активного инфекционного процесса является обнаружение в крови вирусной ДНК, HBsAg, HBeAg, антиHBe-IgM и антиHBcIgM (рис.13).

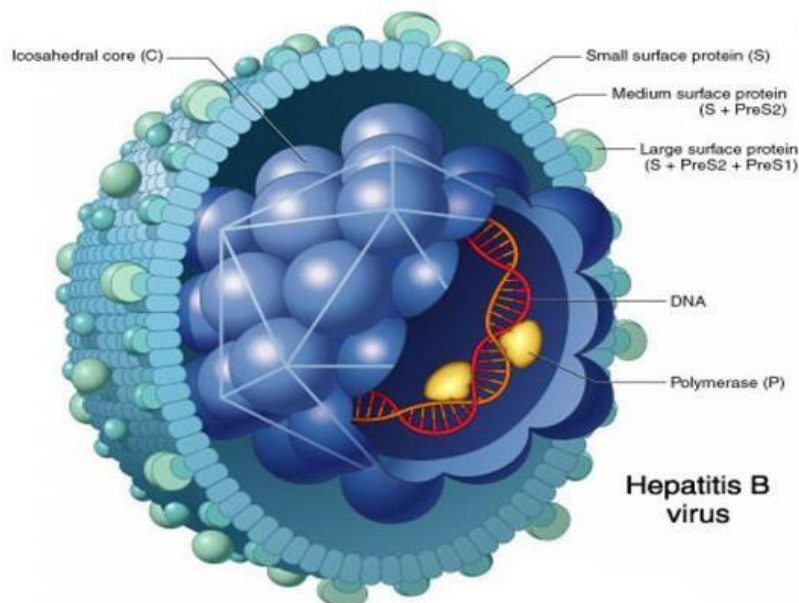


Рис. 13. Вирус гепатита В

Ответ к задаче № 30

1. Возбудитель проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и глаз, откуда попадает в подслизистую оболочку, лимфатические узлы. После репродукции он поступает в кровь (вирусемия) и поражает эндотелий кровеносных капилляров, обуславливая тем самым появление сыпи.
2. Вирус кори можно обнаружить в исследуемом материале (смыв с носоглотки, соскобы с элементов сыпи, кровь, моча) и в зараженных культурах клеток с помощью РИФ, РТГА и реакции нейтрализации. Для серодиагностики применяют ИФА и др. реакции.
3. Активную специфическую профилактику кори проводят введением детям 1-го года жизни живой коревой вакцины или ассоциированной вакцины (против кори, паротита, краснухи). В очагах кори ослабленным детям вводят нормальный иммуноглобулин человека.

Ответ к задаче № 31.

1. Для профилактики бешенства применяются антирабическая культуральная инактивированная вакцина и гетерогенный гамма-глобулин.

2. Вакцина против бешенства была разработана и предложена Л.Пастером. Данная вакцина, полученная из мозга зараженных животных (кроликов, овец), могут вызывать осложнения, поэтому их используют редко.

Ответ к задаче № 32.

1. Исследуемые материалы: сыворотка крови, лимфоциты, сперма, слюна, содержимое влагалища и др.

2. Основанием для диагноза ВИЧ-инфекции является трехкратный положительный результат тестового метода (ИФА для обнаружения анти- ВИЧ-АТ) и однократный положительный результат одного из экспертных методов: иммуноблотинг (для обнаружения АТ к отдельным антигенам

ВИЧ), молекулярная гибридизация и ПЦР (для обнаружения РНК вируса).

Тесты по микробиологии:

1) Какой, из перечисленных химиотерапевтических препаратов используется, как противовирусный?

- 1! ремантадин
- 2! левамизод
- 3! пенициллин
- 4! Т-активин
- 5! Тетрациклин

2) Какое из приведенных, вещество используется для антисептики при обработке ран?

- 1! перекись водорода
- 2! формалин
- 3! крезол
- 4! хлорная известь
- 5! физиологический раствор

3) Какие антибиотики вырабатывают высшие растения?

- 1! фитонциды
- 2! полимиксин
- 3! левомецетин
- 4! аминоглюкозиды
- 5! макромеры

4) Назовите метод качественного определения чувствительности бактерий к антибиотикам?

- 1! бумажных дисков
- 2! агглютинация
- 3! титрование бактерий
- 4! серийных разведений
- 5! РНГА

5) Какой компонент вводят в ассоциированную вакцину АКДС для специфической профилактики столбняка?

- 1! анатоксин
- 2! корпускулярная вакцина
- 3! ослабленная живая вакцина
- 4! химическая вакцина
- 5! гретая вакцина

6) Аппарат для стерилизации при высокой температуре?

- 1! печь Пастера
- 2! термостат
- 3! автоклав
- 4! аппарат Кротова
- 5! аппарат Коха

7) Какое дезинфицирующее вещество обладает бактерицидным действием?

- 1! спирт 96°
- 2! спирт 70°
- 3! перманганат калия
- 4! хлорамин
- 5! сулема

8) Какой из приведенных антибиотиков имеет антигрибковое действие?

- 1! нистатин
- 2! синтомицин
- 3! тетрациклин
- 4! грамицидин
- 5! пенициллин

9) Метод количественного определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

- 1! метод серийных разведений
- 2! метод нейтрализации
- 3! метод флокуляции
- 4! метод бумажных дисков
- 5! метод гемагглютинации

10) Что такое "антисептика"

- 1! очищение ран от микробов
- 2! стерилизация перевязочного материала
- 3! уничтожение вегетативных форм микробов
- 4! стерилизация хирургических инструментов
- 5! обработка рук хирурга

11) Какой из перечисленных препаратов относится к противовирусным?

- 1! интерферон
- 2! анатоксин
- 3! сульфаниламиды
- 4! антибиотики
- 5! антитоксические сыворотки

12) Каким методом стерилизуются витамины?

- 1! тиндализация
- 2! текучим паром
- 3! сухим паром
- 4! кипячением
- 5! автоклавированием

13) Какой антибиотик является антибиотиком широкого спектра действия?

- 1! тетрациклин
- 2! грамицидин
- 3! бензилпенициллин
- 4! пенициллин
- 5! гентамицин

14) Какие препараты применяются для специфической профилактики дифтерии?

- 1! анатоксин
- 2! фаги
- 3! гаммаглобулин
- 4! антибиотики
- 5! сульфаниламиды

15) Какой препарат применяется для специфической профилактики коклюша?

- 1! вакцина АКДС
- 2! антибиотики
- 3! иммунная сыворотка
- 4! вакцина БЦЖ
- 5! анатоксин

16) Кто из микроорганизмов является активным продуцентом антибиотиков?

- 1! грибы
- 2! эшерихии
- 3! вирусы
- 4! сальмонеллы

5! спирохеты

17) Что такое дезинфекция?

- 1! уничтожение патогенных микробов химическим фактором
- 2! полное уничтожение всех форм микробов физическим фактором
- 3! уничтожение спор
- 4! сохранение микробов
- 5! уничтожение переносчиков заболеваний

18) Кто первооткрыватель антибиотиков?

- 1! А.Флеминг
- 2! И.И.Мечников
- 3! Р.Кох
- 4! П.Эрлих
- 5! Л.Пастер

19) Механизм действия пенициллина на бактерии?

- 1! ингибирует синтез клеточной стенки
- 2! действует на цитохромную систему
- 3! блокада дыхания
- 4! нарушает синтез белка
- 5! нарушает обмен веществ бактериальной стенке

20) Какие препараты вводят людям при обширных травмах?

- 1! вакцины
- 2! антитоксические сыворотки
- 3! антибиотики
- 4! фаги
- 5! сульфаниламиды

21) Каким из перечисленных методов определяют морфологию бактерий?

- 1! микроскопическими
- 2! культуральными
- 3! биологическими
- 4! биохимическими
- 5! в толстой капле

22) Какая основная функция цитоплазматической мембраны бактерий?

- 1! выполняет функцию осмотического барьера
- 2! формирование скелета клетки
- 3! синтез структурных белков
- 4! передача информации
- 5! сохранение вида

23) Какое из перечисленных свойств бактерий связано с капсулообразованием?

- 1! вируленность
- 2! размножение
- 3! спорообразование
- 4! синтез ферментов
- 5! подвижность

24) Причиной какого из перечисленных заболеваний может являться использование антибиотиков?

- 1! кандидамикоз
- 2! пневмонии
- 3! гепатит
- 4! диабет
- 5! дизентерия

25) Какие из приведенных микробов преобладают в толстом кишечнике человека?

- 1! бактероиды
- 2! актиномицеты
- 3! сарцины
- 4! эшерихии
- 5! стафилококки

26) Какой из приведенных микроорганизмов относится к условно-патогенному обитателю кишечника?

- 1! кишечная палочка
- 2! сарцины

- 3! сальмонеллы
- 4! шигеллы
- 5! Риккетсии

27) Какой из перечисленных морфологических признаков характерен для возбудителя дифтерии?

- 1! зерна волютина
- 2! спора
- 3! жгутики
- 4! капсула
- 5! биполярное окрашивание

28) Какая группа заболеваний, вызываемая сальмонеллами, называется сальмонеллёзами?

- 1! гастроэнтериты
- 2! с поражением нервной системы
- 3! с поражением кожи
- 4! ОРЗ
- 5! гнойно-воспалительные

29) Какой симптом наиболее характерен при коклюше?

- 1! судорожный кашель
- 2! конъюнктивит
- 3! насморк
- 4! высокая температура
- 5! диарея

30) Морфология возбудителей холеры?

- 1! вибрион
- 2! бациллярная
- 3! палочковидная
- 4! овоидная
- 5! спирохета

31) Какое заболевание вызывает кишечная палочка?

- 1! колиэнтериты
- 2! сальмонеллёз

- 3! дизентерия
- 4! холера
- 5! гастрит

32) Какое условие учитывают при доставке материала с подозрением на менингококковую инфекцию?

- 1! изменение температуры
- 2! количество материалов
- 3! время доставления матерала
- 4! рН среды
- 5! период года

33) Какие бруцеллы являются наиболее патогенными для людей?

- 1! бруцелла мелитензис
- 2! бруцелла бовис
- 3! бруцелла суис
- 4! бруцелла овис
- 5! бруцелла канис

34) К какой таксономической категории относят родственные микробы, близкие по морфологии, физиологии, генетике и патогенным свойствам?

- 1! вид
- 2! отдел
- 3! семейство
- 4! род
- 5! порядок

35) Каким термином обозначаются микроорганизмы одного вида, различающиеся по антигенной структуре?

- 1! серовар
- 2! клон
- 3! биовар
- 4! штамм
- 5! популяция

36) Укажите, где происходит дифференцировка Т-лимфоцитов у человека?

- 1! в тимусе
- 2! в селезёнке
- 3! в печени
- 4! в костном мозгу
- 5! в лимфатических узлах

37) Как под микроскопом располагаются стафилококки?

- 1! гроздевидно
- 2! цепочкой
- 3! по два
- 4! по четыре
- 5! пакетами

38) Что такое протопласты?

- 1! бактерии, лишенные клеточной стенки
- 2! спорообразующие бактерии
- 3! капсульные бактерии
- 4! подвижные бактерии
- 5! ветвящиеся бактерии

39) Какую функцию выполняет спора?

- 1! сохранение вида
- 2! защита от фагоцитоза
- 3! передача информации
- 4! размножение
- 5! движение

40) С какой целью используется йод-люголь при окраске по Граму?

- 1! закрепление красителя
- 2! цветовой идентификации
- 3! связывание фуксина
- 4! обесцвечивание генцианвиолетом
- 5! нейтрализация спирта

41) Какую функцию выполняет ДНК-бактерии?

- 1! передача наследственной информации
- 2! резистентность к физическим факторам
- 3! резистентность к химическим факторам
- 4! синтез белка
- 5! процесс дыхания

42) К какому типу питания относится большая часть патогенных бактерий?

- 1! гетеротрофы
- 2! хемотротрофы
- 3! ауксотрофы
- 4! фототрофы
- 5! метатрофы

43) Какие функции выполняют рибосомы в клетках?

- 1! синтез АТФ
- 2! синтез ДНК
- 3! синтез белка
- 4! переваривании пищи
- 5! накопление запасных веществ

44) Укажите представителя облигатной микрофлоры кожи?

- 1! эпидермальный стафилококк
- 2! микоплазмы
- 3! кишечные палочки
- 4! клостридии
- 5! нейссерии

45) Чем отличаются эукариоты от прокариотов?

- 1! структурой ядра
- 2! характером митохондрий
- 3! строением оболочки
- 4! расположением рибосом
- 5! наличием гранул

46) В чем заключается губительное действие высокой температуры на микроорганизм?

- 1! вызывает коагуляцию белков

- 2! нарушает обмен веществ
- 3! разрушает оболочку
- 4! разрушает рибосому
- 5! нарушает деление клетки

47) Что обозначает "бинарная номенклатура" бактерий?

- 1! название рода и вида
- 2! название семейства и вида
- 3! название рода и штамма
- 4! название порядка и семейства
- 5! название семейства и рода

48) Какое свойство бактерий определяет характер роста их на питательных средах?

- 1! культуральные
- 2! биохимические
- 3! ферментативные
- 4! антигенные
- 5! тинкториальные

49) Какое вещество входит в состав нуклеотида бактерий?

- 1! ДНК
- 2! белок
- 3! липопротеиды
- 4! глюкозамины
- 5! муреины

50) В каком препарате можно определить подвижность бактерий?

- 1! висючая капля
- 2! по Бурри
- 3! мазок с простым методом окраски
- 4! мазок со сложным методом окраски
- 5! толстая капля

51) Какой метод окраски позволяет выявить капсулу?

- 1! Бурри-Гиса
- 2! Циль-Нильсена

- 3! Романовского-Гимза
- 4! Граму
- 5! Ожешко

52) Какие лучи используют для стерилизации воздуха операционной?

- 1! ультрафиолетовые
- 2! радиоактивные
- 3! рентгеновские
- 4! световые
- 5! ультразвук

53) По какому свойству различают серовары бактерии

- 1! по морфологии
- 2! по чувствительности к фагу
- 3! по чувствительности к антибиотикам
- 4! по химическому составу
- 5! по антигенной структуре

54) Какую форму имеют кокки?

- 1! изогнутую
- 2! шаровидную
- 3! палочковидную
- 4! нитевидную
- 5! спиралевидную

55) Что является органами движения бактерии?

- 1! жгутики
- 2! пили
- 3! псевдоподии
- 4! фибриллы
- 5! осевая нить

56) Какой метод окраски позволяет обнаружить споры?

- 1! Циль-Нильсена
- 2! Романовского-Гимза
- 3! Грама
- 4! Бурри-Гинса

5! Нейссера

57) В каком случае возникает пассивный искусственный иммунитет?

- 1! после вакцинации
- 2! после введения иммунной сыворотки
- 3! после перенесенного заболевания
- 4! после введения бактериофага
- 5! после введения антибиотиков

58) Какое инфекционное заболевание человека передаётся через воду?

- 1! брюшной тиф
- 2! возвратный тиф
- 3! сыпной тиф
- 4! сифилис
- 5! бешенство

59) Какой термин обозначает враждебную ассоциацию микробов?

- 1! антагонизм
- 2! симбиоз
- 3! метабиоз
- 4! саттелитизм
- 5! паразитизм

60) Ворота инфекции при гонорее

- 1! раневая поверхность
- 2! половые органы
- 3! слизистая полости рта
- 4! пищеварительный тракт
- 5! кожные покровы

61) Какой продукт питания может стать причиной заражения ботулизмом?

- 1! консервы
- 2! кондитерские изделия
- 3! картофель

- 4! молоко
- 5! свежие овощи

62) Какое заболевание может вызвать гонококк

- 1! бленоррея
- 2! дерматиты
- 3! пневмония
- 4! стоматит
- 5! сальпингит

63) К какому роду относится возбудитель дизентерии?

- 1! шигеллы
- 2! клебсиеллы
- 3! иерсинии
- 4! эшерихии
- 5! сальмонеллы

64) Какие морфологические особенности характерны для возбудителей чумы при микроскопии?

- 1! биполярное окрашивание
- 2! тинкториальные свойства
- 3! наличие споры
- 4! наличие капсулы
- 5! размер

65) Какой из ниже перечисленных является возбудителем эпидемического возвратного тифа?

- 1! боррелии реккурентс
- 2! трепонема пертуно
- 3! трепонема беджель
- 4! трепонема паллидум
- 5! боррелия даттони

66) Какие осложнения развиваются при полиомиелите?

- 1! параличи
- 2! отиты
- 3! колиты
- 4! пневмония

5! артриты

67) С какой целью используется реакция Асколи при сибирской язве?

- 1! инфицированности сырья
- 2! диагностической
- 3! определение антител
- 4! аллергическая реакция
- 5! чувствительности антибиотиков

68) Какие биологические особенности характерны для возбудителя туберкулеза в отличие от других бактерий?

- 1! очень медленный рост
- 2! рост в анаэробных условиях
- 3! быстрый рост на питательной среде
- 4! рост в живой клетки
- 5! не отличается

69) Какая из питательных сред является элективной для стафилококков?

- 1! желочно-солевой агар
- 2! желчный бульон
- 3! сывороточный агар
- 4! среда Лиффлера
- 5! среда Левина

70) Один из основных специфических симптомов при сибирской язве?

- 1! розеолезная сыпь
- 2! образование карбункула
- 3! потеря аппетита
- 4! головная боль
- 5! высокая температура

71) Метод окраски туберкулезных бактерий?

- 1! Циль-Нильсена
- 2! Грам
- 3! Нейссера

- 4! Ожешко
- 5! Бурри-Гинса

72) Место локализации возбудителя дизентерии у больных?

- 1! в толстой кишке
- 2! в желудке
- 3! в тонкой кишке
- 4! в тощей кишке
- 5! в полости рта

73) На какой дифференциально-диагностической среде шигеллы образуют характерные колонии?

- 1! среда Плоскирева
- 2! кровяной агар
- 3! среда Леффлера
- 4! МПА
- 5! КУА

74) Какую вакцину используют для специфической профилактики сибирской язвы?

- 1! БЦЖ
- 2! СТИ
- 3! анатоксин
- 4! ТАБТЕ
- 5! гриппозная

75) По какому признаку дифференцируют условнопатогенные эшерихии от энтеропатогенных?

- 1! по антигенным свойствам
- 2! по культуральным свойствам
- 3! по морфологии
- 4! по чувствительности к антибиотикам
- 5! по клинике

76) Возбудителем какого заболевания могут быть менингококки?

- 1! коклюш
- 2! бленоррея

- 3! назофарингит
- 4! скарлатина
- 5! Ревматизм

77) Каким методом окрашивают возбудителя чумы?

- 1! метиленовой синькой
- 2! Бурри-Гинса
- 3! Грама
- 4! Ожешко
- 5! Морозова

78) Какие свойства отсутствуют у Клостридии перфрингенс?

- 1! жгутики
- 2! спора
- 3! токсинооброзование
- 4! капсула
- 5! свертывание молока

79) Какая реакция используется для определения сероварианта кишечной палочки?

- 1! агглютинации на стекле
- 2! иммунофлюоресценции
- 3! РНГА
- 4! РСК
- 5! иммуноферментная

80) Морфология возбудителя бруцеллёза?

- 1! коккобактерии
- 2! шаровидная
- 3! бацилла
- 4! изогнутая
- 5! палочковидная

81) С какой целью ставят реакцию Дика при скарлатине?

- 1! определение иммунитета
- 2! постановка аллергической реакции
- 3! диагностический
- 4! определение резистентности

5! определение вирулентности возбудителя

82) Какая из клостридий является возбудителем газовой анаэробной инфекции?

- 1! клостридия перфрингенс
- 2! клостридия эдематиенс
- 3! клостридия септикум
- 4! клостридия хистолтикум
- 5! клостридия сорделии

83) Специфический фермент вируса ВИЧ-инфекции, связанный с нуклеокапсидом?

- 1! обратная транскриптаза
- 2! РНК-зависимая РНК-полимераза
- 3! ДНК-зависимая ДНК-полимераза
- 4! нейраминидаза
- 5! гемагглютинин

84) Какая реакция применяется при серологической диагностике коклюша?

- 1! РСК
- 2! реакция преципитации
- 3! опсоно-фагоцитарная реакция
- 4! РПГА
- 5! реакция агглютинации

85) Какая форма чумы дает 100% летальность?

- 1! легочная
- 2! бубонная
- 3! кожно-бубонная
- 4! бубонно-язвенная
- 5! кишечная

86) Морфологические особенности возбудителя сибирской язвы?

- 1! образование капсулы
- 2! наличие жгутиков

- 3! наличие включений
- 4! биполярное окрашивание
- 5! полиморфизм

87) Что понимают под термином "клон" в микробиологии?

- 1! совокупность микробов, происходящих от одной клетки
- 2! совокупность микробов, адаптированных к одним условиям внешней среды
- 3! совокупность микроорганизмов с общими патогенными свойствами
- 4! совокупность микроорганизмов, выделенных из одного объекта
- 5! совокупность микроорганизмов, выделенных из одной колонии

88) Какая основная функция цитоплазматической мембраны бактерий?

- 1! выполняет функцию осмотического барьера
- 2! формирование скелета клетки
- 3! синтез структурных белков
- 4! передача информации
- 5! сохранение вида

89) Какие из перечисленных микроорганизмов являются облигатными анаэробами?

- 1! грибы
- 2! клостридии
- 3! микоплазмы
- 4! вирусы
- 5! спирохеты

90) По какому типу питания относится бактерии, использующий в качестве источника CO_2 неорганический соединения?

- 1! хемотробы
- 2! ауксатрофы
- 3! паратрофы
- 4! гетеротрофы

5! фототрофы

91) Какая из перечисленных, питательная среда относится к дифферен-циально-диагностическим?

- 1! Среда Эндо
- 2! мясо-пептонная среда
- 3! щелочная среда
- 4! желочно-солевой агар
- 5! сывороточный агар

92) С какой целью в лабораториях используют термостаты?

- 1! культивирование бактерий
- 2! уничтожение вегетативных форм бактерий
- 3! сохранение микробов
- 4! обеспложивание лабораторной посуды
- 5! уничтожение спор

93) Рост и размножение микроорганизмов на плотной питательной среде?

- 1! образование колоний
- 2! образование мути
- 3! образование осадка
- 4! расщепление среды
- 5! образование газа

94) К какой таксономической категории относят родственные микробы, близкие по морфологии, физиологии, генетике и патогенным свойствам?

- 1! вид
- 2! отдел
- 3! семейство
- 4! род
- 5! порядок

95) Какой метод диагностики инфекционных заболеваний является основным?

- 1! бактериологический
- 2! аллергический

- 3! бактериоскопический
- 4! биологический
- 5! серологический

96) Какой элемент является окислителем в механизме дыхания бактерий?

- 1! водород
- 2! углекислый газ
- 3! кислород
- 4! азот
- 5! глюкоза

97) Что означает термин "лиофилизация"

- 1! высушивание микробов при низкой температуре в вакууме
- 2! высушивание бактерий при высокой температуре в вакууме
- 3! высушивание микробов при оптимальной температуре
- 4! сохранение микробов при низкой температуре
- 5! сохранение микробов в вакууме

98) Для изучения каких микроорганизмов используются иммерсионный микроскоп?

- 1! бактерии
- 2! вирусы
- 3! бактериофаги
- 4! простейшие
- 5! водоросли

99) Расположение стрептококков в поле зрения микроскопа?

- 1! цепочкой
- 2! гроздьями
- 3! по два
- 4! по четыре
- 5! пакетами

100) Какую функцию выполняют пили?

- 1! адгезии
- 2! защитную
- 3! синтез белка

- 4! движение
5! деления

Ответы к тестам по микробиологии:

1) 1	34) 1	68) 1
2) 1	35) 1	69) 1
3) 1	36) 1	70) 2
4) 1	37) 1	71) 1
5) 1	38) 1	72) 1
6) 3	39) 1	73) 1
7) 3	40) 3	74) 2
8) 1	41) 1	75) 1
9) 1	42) 1	76) 3
10) 1	43) 3	77) 1
11) 1	44) 1	78) 1
12) 1	45) 1	79) 1
13) 1	46) 1	80) 5
14) 1	47) 1	81) 1
15) 1	48) 1	82) 1
16) 1	49) 1	83) 1
17) 1	50) 1	84) 1
18) 1	51) 1	85) 1
19) 1	52) 1	86) 1
20) 2	53) 1	87) 1
21) 1	54) 2	88) 1
22) 1	55) 1	89) 2
23) 1	56) 1	90) 4
24) 1	57) 2	91) 1
25) 4	58) 1	92) 1
26) 1	59) 1	93) 1
27) 1	60) 2	94) 1
28) 1	61) 1	95) 1
29) 1	62) 1	96) 3
30) 1	63) 1	97) 1
31) 1	64) 1	98) 1
32) 1	65) 1	99) 1
33) 1	66) 1	100) 4
	67) 3	

Литература:

1. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.- М: МИА, 2012. Учебник
2. Хаитов Р.М.Иммунология: структура и функции иммунной системы.ГОЭТАР МЕД,2014. Учебное пособие.
3. Мухамедов И. ва бошқалар.Тиббиёт вирусологияси. - Тошкент: 2012. Ўқув қўлланма.
4. Ковальчук Л.В.,Ганковский Л.В.,Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. – М.:2011.Учебник.
5. Мухамедов И.М. ва бошқ. Клиник микробиология.Ўқув қўлланма.-Тошкент: 2016 й.
6. Диунов А.Г.,Жариков Г.П.,Тихомирова С.В.Медицинская паразитология для первокурсников. - Ярославль: 2012.Учебное пособие.
7. Бойченко М.Н.,Эверова В.В. Микробиология, вирусология.ГЭОТАР – Медиа.2015.Учебное пособие.
8. Y.Levinson.Медицинская микробиология и иммунология.США,Калифорния,2015.Учебник.
9. Gerald J.Tortora,BerdellR,Funke.Christine L.Case Microbiology – Benjamin Cummings USA,2015.
10. Мухамедов И.М., Хўжаева Ш.А., Ризаев Ж.А., Алматов Б.И., Нуралиев Н.А. Клиник микробиология. Шифокор мутахассисларга лаборатор ташхис учун қўлланма. Тошкент, “Янги аср авлоди” нашриёти, 2016. - 632 с.
11. Нуралиев Н.А., Гинатуллина Е.Н., Алматов Б.И. Научные и практические основы гидробиологического анализа качества вод объектов питьевого и рекреационного назначения // Методические рекомендации. - Ташкент, 2014. - 42 с.

12. Ананьева Е.П. Прокариоты морфолого – биологическая характеристика: учебное пособие / Е.П.Ананьева, С.В.Гурина, О.М.Тихомирова. – СПб. : Изд –во СПХФА, 2012. – 72 с.
13. Кочеровец В.И. Введение в фармацевтическую микробиологию/
В.И.Кочеровец, А.Э.Габилова, О.В.Гунар, В.А.Галынкин, Н.А.Зайкина. -СПб. : Проспект Науки, 2014. -240 с.
14. Микробиология/под.ред.В.В.Зверева, М.Н.Бойченко. – М.:ГЭОТАР-Медиа, 2012. -608с.
15. Ананьева Е.П. Микробиология. Часть I: Учебное пособие/ Е.П.Ананьева, С.В.Гурина, Т.С.Потехина, О.М.Тихомирова. – СПб.:Изд – во СПХФА, 2012 -120с.
16. Ананьева Е.П. Микробиология. Часть II: Учебное пособие/
Е.П.Ананьева, С.В.Гурина, И.П.Соколова, О.М.Тихомирова. – СПб.:Изд – во СПХФА, 2013. -196с.
17. Ш.Р.Алиев ва бошқ. Микробиологиядан лаборатория машгулотларига доир қўлланма. - Тошкент: 2013 й.
18. Е.Н.Эшбоев ва бошқ. Микробиологиядан амалий машгулотлар. Тиббий коллежлари учун дарслик. -Тошкент: 2011 й
19. И.М.Мухамедов Медицинская микробиология вирусология, иммунология. Учебник. – Ташкент, “Янги аср авлоди” 2011г.
20. I.M.Muhamedov, F.I.Inoytova, S.D.Dushanbiyeva. Tibbiyt virusologiyasi. Darslik. -Toshkent, Yangi asr avlodi . 2013y.
21. N.P.Elinov, Z.R.Fayzullaeva, D.E.Qodirova, K.Sh.Boltayeva, S.G‘.Ataulaeva Kimyoviy mikrobiologiya. Darslik. - Toshkent, “Saydana-print” MCHJ nashriyoti. 2011y.
22. Нуралиева Х.О., Миралимова Ш.М., Болтаева К.Ш., Кариева М.Т. Кимёвий микробиология. Ўқув қўлланма. - Тошкент. 2019 й.

Содержание:

	Стр.
Введение	4
ГЛАВА I. ЗНАКОМСТВО С УСТРОЙСТВОМ И РАБОТОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА - МАЗКА. ПРОСТОЙ МЕТОД ОКРАСКИ ПРЕПАРАТОВ.	5
1.1 Микробиологические лаборатории	5
1.2. Правила поведения и работы в микробиологической лаборатории.	7
1.3 Систематика и номенклатура микроорганизмов.	8
1.4 Этапы приготовления мазков-препаратов.	12
1.5 Методы окраски препаратов	13
1.6. Изучение техники микроскопирования микробиологических объектов в иммерсионной системе. Пособие для лабораторных работ.	15
ГЛАВА II. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, СТРУКТУРА, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ. СТЕРИЛИЗАЦИЯ И ДЕЗИНФЕКЦИЯ.	16
2.1 Морфология микроорганизмов	16
2.2 Структура бактериальной клетки	24
2.3 Химический состав бактериальной клетки	26
2.4 Стерилизация и дезинфекция	27
2.5 Методы приготовления препаратов из посева патологического материала на жидкие и плотные питательные среды. Простые и сложные методы окраски. Пособие для лабораторных работ.	31
ГЛАВА III. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ: ДЫХАНИЕ, РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР	35
3.1 Физиология микроорганизмов	35
3.4 Выделение ферментов микроорганизмов	41
3.3 Классификация питательных сред.	42
3.4 Методы выделения аэробных и анаэробных чистых культур, методы идентификации. Пересевы бактерий на плотные и жидкие питательные среды. Пособие для лабораторных работ.	52
ГЛАВА IV ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ: СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ, РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ. БАКТЕРИОФАГИ.	56
4.1 Характеристика вирусов.	56
4.2 Бактериофаги	60

4.3Определение фаготипа бактерий.Пособие для лабораторных работ.	64
ГЛАВА V. МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ.ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОБЫ.МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ.АНТИБИОТИКИ.МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОБОВ К АНТИБИОТИКАМ.	65
5.1 Микрофлора лекарственных растений и растительного сырья.	65
5.2 Фитопатогенные микроорганизмы.	67
5.3 Борьба с фитопатогенными микроорганизмами.	68
5.4 Микрофлора растительного лекарственного сырья	69
5.5 Микрофлора готовых лекарственных форм	70
5.6 Определение микрофлоры в лекарственных формах	74
5.7 Антибиотики	76
5.8Возможные осложнения со стороны макроорганизма.	79
5.9Развитие устойчивости микроорганизмов к применяемым препаратам.	79
5.10Ускоренный метод определения чувствительности макроорганизма к антибиотик	80
5.11 Определение стерильности готовых лекарственных форм. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков.Пособие для лабораторных работ.	84
ГЛАВА VI. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА.	85
6.1. Микрофлора тела человека	85
6.2 Санитарная микробиология	89
6.3 Микрофлора воды	91
6.4 Микрофлора почвы	92
6.5 Микрофлора воздуха	97
6.6Оценка и определение количества и качественного состава нормальной микрофлоры организма человека. Пособие для лабораторных работ.	102
ГЛАВА VII. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ.ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ.7.1КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.	103
7.1 Инфекция	103
7.2 Формы проявления инфекционных болезней.	107
7.3 Методы диагностики инфекционных болезней:	108
7.4 Посещение вивария института. Изучение биологических методов диагностики.Пособие для лабораторных работ.	111
ГЛАВА VIII. ИММУНИТЕТ, ВИДЫ ИММУНИТЕТА.МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА.	112
8.1 Иммунитет	112

8.2 Аллергия	114
8.3 Реакции иммунитета	114
8.4 Методы оценки иммунного статуса организма человека.	116
ГЛАВА IX. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ. ПРИМЕНЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ВАКЦИНЫ И СЫВОРОТКИ.	121
9.1 Генетика бактерий	122
9.2 Формы проявления изменчивости	122
9.3 Медицинские биологические препараты для профилактики и лечения инфекционных заболеваний	126
ГЛАВА X. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ (СТАФИЛОКОККИ И СТРЕПТОКОККИ) И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОККИ (МЕНИНГОКОККИ И ГОНОКОККИ).	134
10.1 Патогенные кокки	134
10.2 Стрептококки	137
10.3 Менингококки	142
10.4 Гонококки	143
10.5 Определение чувствительности культуры стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков.	145
10.6 Приготовление нативного препарата из посева патологического материала на бульонные и агаровые культуры. Пособие для лабораторных работ.	150
ГЛАВА XI. КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ. ПИЩЕВАЯ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯ: (САЛЬМОНЕЛЛЁЗ, БОТУЛИЗМ).	152
11.1 Возбудители кишечных инфекций	152
11.2 Эшерихии	153
11.3 Сальмонеллы	156
11.4 Возбудители ботулизма	158
11.6 Препараты, применяемые для профилактики и лечения сальмонеллёзов	163
11.7 Постановка биологической пробы для обнаружения ботулинистического токсина в пищевом продукте.	164
11.8 Препараты для профилактики и лечения ботулизма.	164
ГЛАВА XII. ВОЗДУШНО КАПЕЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ (КОРИНЕБАКТЕРИИ, МИКОБАКТЕРИИ).	167
12.1 Патогенные микобактерии.	167
12.2 Возбудитель дифтерии.	170
ГЛАВА XIII. ПРОСТЕЙШИЕ (ПЛАЗМОДИИ МАЛЯРИИ, ЛЕЙШМАНИИ). ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ДЕРМАТОМИКОЗЫ, КАНДИДОЗЫ).	173
13.1 Возбудители малярии	173

13.2 Возбудители лейшманиозов	175
13.3 Возбудители микозов	176
ГЛАВАХІV. ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ. ВОЗБУДИТЕЛИ СТОЛБНЯКА, ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ.	180
14.1 Патогенные клостридии	180
14.2 Возбудители газовой анаэробной инфекции	180
14.3 Возбудитель столбняка	183
14.4 Препараты для профилактики и лечения анаэробных инфекций	185
ГЛАВАХV. ОСОБО ОПАСНЫЕ ЗООНОЗНЫЕ ИНФЕКЦИИ(СИБИРЕЯЗВЕННЫЕ БАЦИЛЛЫ,ВИБРИОНЫ ХОЛЕРЫ).	188
15.1 Возбудитель сибирской язвы	188
15.2 Возбудитель холеры	191
15.2 Правила, предусмотренные инструкцией о режиме работы с возбудителями особо опасных инфекций:	192
15.3 Возбудитель холеры	193
ГЛАВАХVІ. ПАТОГЕННЫЕ СПИРОХЕТЫ (ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА).ОНКОГЕННЫЕ ВИРУСЫ.	202
16.1 Спирохеты.	202
16.2 Сифилис	202
16.3 Онкогенные вирусы	204
16.4 ДНК-содержащие онкогенные вирусы	204
16.5 РНК-содержащие онкогенные вирусы	207
16.6 Темнопольная микроскопия. Пособие для лабораторных работ.	212
ГЛАВАХVІІ. ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. (ВИРУСЫ ГРИППА,ВИРУС КОРИ).ВИРУСЫ ГЕПАТИТА.	213
17.1 Принципы диагностики вирусных заболеваний	213
17.2 Грипп	214
17.3 Вирус кори	217
17.4 Вирусные гепатиты.	219
ГЛАВАХVІІІ РАБДОВИРУСЫ (ВИРУС БЕШЕНСТВА), СПИД, ЭНТЕРО-, НЕЙРОВИРУСЫ (ПОЛИОМИЕЛИТ).	227
18.1 Вирус бешенства	227
18.2 Вирус иммунодефицита человека	231
18.3 Вирус полиомиелита (<i>Poliovirus</i>).	238
Ответы к ситуационным задачам	246
Тесты по микробиологии	263
Ответы к тестам по микробиологии	281
Литература	282
Содержание	283

Болтаева К. Ш.

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ПО МОДУЛЮ МИКРОБИОЛОГИЯ

Издательство "IBN-SINO", 2022.

Изд.лиц. № 8606. 02.03.2022. Формат 60x84 1/20

Гарнитура «Times New Roman».

Напечатано методом цифровой печати.

Усл. печ.л.17.7 . Изд. печ.л.22.1

Тех. редактор: С.Аширова

Дизайнер: С.Аширова

Подписано в печать 11.03.2022 г, Тираж - 20 экз.

Подготовлено к печати и отпечатано в издательство редакционно-
издательского отдела

Ташкентского фармацевтического институт
100015, г. Ташкент, ул.Айбек 45.