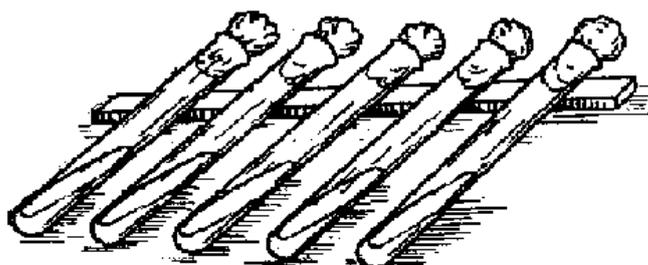


МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ

Практикум

Ч.1 Общая микробиология

Инфектология. Инфекционная иммунология



**ХАНТЫ-МАНСИЙСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**



**ХАНТЫ-МАНСИЙСК
2013**

**ДЕПАРТАМЕНТ ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
ХАНТЫ-МАНСИЙСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА-ЮГРЫ**

**ГБОУ ВПО ХМАО-ЮГРЫ
ХАНТЫ-МАНСИЙСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

Кафедра биологии с курсом микробиологии

МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ

Практикум

Ч.1 Общая микробиология

Инфектология. Инфекционная иммунология

**Ханты-Мансийск
Информационно-издательский центр ХМГМА
2013**

УДК 616 – 093/ – 098 : 616 – 08: 616 – 053.2 : 614.4 (075.8)
ББК 52.64 + 51.1 (2) + 57.3

Рекомендовано к изданию Центральным координационно-методическим советом медико-биологических дисциплин ХМГМА в качестве практикума по микробиологии и вирусологии для студентов, обучающихся по специальности 060101 Лечебное дело (решение от 14.06.2012 г., протокол №5)

Составители:

Коллектив кафедры биологии с курсом микробиологии ХМГМА:
В.В. Леонов, Л.Н. Деревянко, Т.Н. Соколова

Рецензенты:

Зав. кафедрой микробиологии ГБОУ ВПО Тюменской государственной медицинской академии Росздрава, д.б.н., доцент Т.Х. Тимохина

Зав. кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО ХМАО-ЮГРЫ Ханты-Мансийской государственной медицинской академии д.м.н., профессор Ф.И. Петровский

Микробиология, вирусология. Практикум Ч.1 Общая микробиология. Инфектология. Инфекционная иммунология. Практикум для студентов 2 курса лечебного факультета, обучающихся по специальности 060101 – Лечебное дело / В.В. Леонов, Л.Н. Деревянко, Т.Н. Соколова – Ханты-Мансийск: Издательский центр ХМГМА, 2013. – 76 с.

В практикуме представлены тематический план практических занятий, требования к уровню знаний и умений, вопросы и задания для подготовки к занятиям, задания и задачи для выполнения практической работы, список рекомендуемой литературы.

Практикум составлен в соответствии с ФГОС ВПО по направлению подготовки (специальности) 060101 Лечебное дело и предназначен для студентов 2 курса лечебного факультета для подготовки и работы на практических занятиях по микробиологии и вирусологии.

© Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2013
© В.В. Леонов, Л.Н. Деревянко, Т.Н. Соколова

СОДЕРЖАНИЕ	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ	7
ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	8
ЗАНЯТИЕ №1 Микробиологическая лаборатория. Морфология бактерий. Техника безопасности. Микроскопический метод исследования. Простые способы окраски микропрепаратов.....	10
ЗАНЯТИЕ №2 Клеточная стенка бактерий и грибов. Сложные способы окраски микропрепаратов.....	13
ЗАНЯТИЕ №3 Строение бактериальной клетки. Морфология грибов. Методы выявления различных структур бактерий и изучения морфологии грибов....	16
ЗАНЯТИЕ №4 Питание, дыхание и размножение микроорганизмов. Бактериологический метод диагностики.....	20
ЗАНЯТИЕ №5 Питание, дыхание и размножение микроорганизмов. Бактериологический метод диагностики (продолжение).....	24
ЗАНЯТИЕ №6 Асептика. Методы стерилизации и дезинфекции.....	28
ЗАНЯТИЕ №7 Бактериофаги. Практическое использование бактериофагов, методы культивирования и титрования бактериофагов.....	33
ЗАНЯТИЕ №8 Генетика и изменчивость микроорганизмов. Методы изучения генетических рекомбинаций и мутаций у бактерий. ПЦР.....	34
ЗАНЯТИЕ №9 Микробный антагонизм. Антибиотики. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Практическое использование бактериоциногении.....	41
ЗАНЯТИЕ №10 Микробиота организма человека. Методы изучения и оценки микробиоценозов человека Дисбактериозы.....	45
ЗАНЯТИЕ №11 Санитарная микробиология Методы санитарно-микробиологических исследований.....	49
ЗАНЯТИЕ №12 КОЛЛОКВИУМ №1: Общая микробиология	54
ЗАНЯТИЕ №13 Инфекционный процесс. Факторы патогенности микроорганизмов. Методы изучения факторов патогенности.....	60
ЗАНЯТИЕ №14 Инфекционный процесс. Биологический метод диагностики.....	64
ЗАНЯТИЕ №15 Реакции иммунитета. Использование реакций иммунитета с целью определения антигенов (I принцип диагностики).....	67
ЗАНЯТИЕ №16 Реакции иммунитета. Использование реакций иммунитета с целью определения антител (II принцип диагностики).....	71
ЗАНЯТИЕ №17 Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний. Вакцины. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины.....	74
ЗАНЯТИЕ №18 КОЛЛОКВИУМ №2: Инфектология. Инфекционная иммунология	77
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	81

ВВЕДЕНИЕ

Уважаемые студенты!

Это введение Вам следует прочитать перед началом первого занятия.

Микробиология занимает особое положение среди всех дисциплин медицинского ВУЗа. С одной стороны она вооружает будущего врача знаниями, обеспечивающими решение задач по профилактике и лечению инфекционных заболеваний, с другой стороны знания биологии и экологии патогенных микроорганизмов способствует приобретению фундаментальных знаний необходимых для понимания клинических дисциплин, которые затрагивают вопросы взаимодействия микро- и макроорганизма.

Составляя этот практикум, мы имели желание помочь Вам сориентироваться в большом объеме и содержании учебного материала, который необходимо усвоить за два учебных семестра. Выполняя задания практикума и самостоятельно готовясь к практическим занятиям Вы увидите, как вопросы, изучаемые в микробиологии и вирусологии пересекаются и дополняют Ваши знания по нормальной и патологической физиологии, биохимии, фармакологии и другим дисциплинам медико-биологического и клинического цикла. В практикуме Вы найдете тематический план и подробное описание практических занятий.

Все виды учебной деятельности по микробиологии стандартно разделены на лекции, практические занятия и самостоятельную работу во внеучебное время.

Лекции проводятся еженедельно для всего потока студентов, основная цель дать мотивацию темы, вызвать интерес и настроить Вас на необходимость знания основных учебных элементов темы.

По каждому разделу курса предусмотрено определенное количество практических занятий. Выполняя задания практикума, Вы освоите практические навыки работы с микроорганизмами, проведения тех аналитических работ, которые распространены в бактериологических лабораториях. Кроме того, Вы научитесь делать выводы по результатам микробиологических исследований. Выполнение практической работы должно проводиться с соблюдением правил работы в микробиологической лаборатории, с которыми Вы познакомитесь на первом занятии. Помните, работа в микробиологической лаборатории сопряжена с реальной опасностью (инфицирование, ожоги химическими веществами, поражения глаз, отравления и т.п.). Расписавшись в журнале прохождения инструктажа, Вы определенную часть ответственности за несчастный случай берете на себя, снимая ее с преподавателя.

Практические занятия также как и лекции будут еженедельными и строятся по единому принципу: 40-60 мин семинар по теме занятия и 110-90 мин выполнение заданий

практикума. На семинарской части занятия в форме собеседования обсуждаются наиболее важные вопросы по теме занятия, кроме того, можно задать преподавателю интересующие Вас вопросы. В ходе семинара преподаватель поможет Вам лучше понять наиболее сложные разделы и, если необходимо, сообщит дополнительную информацию по изучаемой теме. При подготовке к практическому занятию необходимо внимательно изучить все Вопросы и задания для подготовки, используя литературу из списка рекомендуемой. Конспекты лекций помогут Вам оптимизировать самостоятельную работу при подготовке.

В течение 2-х семестров изучения микробиологии Вам необходимо вести тетрадь для практических занятий. Каждое практическое занятие оформляется в виде протоколов и сдается на практическом занятии ведущему преподавателю. Обращаем Ваше внимание, что задания для подготовки также необходимо выполнять письменно в тетради для практических занятий. В протоколы необходимо зарисовывать все препараты, поэтому при себе всегда нужно иметь набор цветных карандашей и линейку.

Допуск до практических занятий осуществляется при наличии сменной обуви, белого халата, колпака, оформленных в тетради заданий для подготовки и заготовок протоколов выполнения заданий практикума по теме текущего занятия. Кроме того, необходимо иметь отдельную тетрадь для ведения записей на семинарской части занятия.

Пропущенные занятия отрабатываются в соответствии с установленным кафедрой графиком отработок. Обращаем ваше внимание, что по каждому циклу дисциплины предусмотрено всего 2 отработки.

По каждому разделу курса предусмотрена сдача коллоквиума в устной (собеседование с преподавателями кафедры) или письменной формах, а также сдача контрольным микро- и макропрепаратам. О процедуре проведения коллоквиума Вы узнаете на первом практическом занятии.

Зачет в конце весеннего семестра выставляется при условии посещения и выполнения всех практических занятий, а также сданных на положительную оценку контрольных занятий.

Желаем успехов в изучении одной из самых интересных дисциплин в медицинском ВУЗе – микробиологии и вирусологии!

*Преподаватели
кафедры биологии с курсом микробиологии*

ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

Раздел I. Общая микробиология

1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. Техника безопасности. Микроскопический метод исследования. Простые способы окраски микропрепаратов
2. КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ. Сложные способы окраски микропрепаратов
3. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ. Методы выявления структур бактериальной клетки и изучения морфологии грибов
4. ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. Бактериологический метод диагностики
5. ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. Бактериологический метод диагностики (продолжение)
6. АСЕПТИКА. Методы стерилизации и дезинфекции
7. БАКТЕРИОФАГИ. Практическое использование, методы культивирования и титрования бактериофагов
8. ГЕНЕТИКА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ. Методы изучения генетических рекомбинаций и мутаций у бактерий. ПЦР
9. МИКРОБНЫЙ АНТАГОНИЗМ. АНТИБИОТИКИ. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Практическое использование бактериоциногении
10. МИКРОБИОТА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА. Методы изучения и оценки микробиоценозов человека. Дисбактериозы
11. САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. Методы санитарно-микробиологических исследований
12. КОЛЛОКВИУМ №1: ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Раздел III. Учение об инфекции и инфекционная иммунология

13. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ. Методы изучения факторов патогенности
14. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС. Биологический метод диагностики
15. РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА. Использование реакций иммунитета с целью определения антигенов (I принцип диагностики)
16. РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА. Реакции иммунитета. Использование реакций иммунитета с целью определения антител (II принцип диагностики)
17. ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. Вакцины. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины
18. КОЛЛОКВИУМ №2: ИНФЕКТОЛОГИЯ. ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Микробиологические лаборатории организуются при университетах, научно-исследовательских институтах, больницах и санитарно-эпидемиологических станциях. В соответствии с типами микроорганизмов, изучаемых в лаборатории, выделяют вирусологические, бактериологические, микологические и протозоологические лаборатории. Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий – патогенные и условно-патогенные микроорганизмы.

Возбудителей инфекционных заболеваний человека ВОЗ разделяет на несколько групп:

I группа – возбудители особо опасных инфекций (возбудитель чумы);

II группа – возбудители высококонтагиозных особо опасных инфекций (возбудители холеры, сибирской язвы и др.);

III группа – отдельные нозологические группы (возбудители коклюша, столбняка и др.);

IV группа – возбудители токсикоинфекций и интоксикации бактериальной природы, пневмонии и др;

V группа – облигатная непатогенная микробиота, населяющая слизистые.

Все лаборатории должны в обязательном порядке получать разрешение на работу с микроорганизмами каждой группы патогенности в центрах Госсанэпиднадзора. В зависимости от степени опасности или вирулентности микроорганизмов условия работы лабораторий по-разному регламентируются.

I группа – лаборатории особого режима (высокий индивидуальный и общественный риск);

II группа – режимные лаборатории (высокий индивидуальный риск);

III группа – базовые лаборатории (умеренный общественный и индивидуальный риск);

IV группа – базовые лаборатории (минимальный общественный и индивидуальный риск).

Учебные микробиологические лаборатории ВУЗов относятся, как правило, к III-IV группе опасности. Поэтому для предупреждения заражения студенты и персонал обязаны строго соблюдать правила внутреннего распорядка.

1. Все сотрудники и студенты должны работать в медицинских халатах, сменной обуви и колпаках. Вход в лабораторию без халата категорически воспрещен.

2. В помещении микробиологической лаборатории категорически запрещается курить, принимать пищу, хранить продукты питания.

3. В лаборатории всегда должны быть дежурные, которые следят за соблюдением техники безопасности и помогают преподавателю во время занятия.

3. Рабочее место должно содержаться в образцовом порядке. Личные вещи следует хранить в специально отведенном для этого месте.

4. При попадании инфицированного материала на руки, стол и предметы на рабочем месте их необходимо немедленно обработать дезинфицирующим раствором (руки – антисептиком).

5. Нельзя касаться микробиологических препаратов руками.

6. В течение работы весь инструмент и пробирки с культурами держать в штативе.

7. Весь материал, поступающий в лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный. его регистрируют в специальном журнале и маркируют.

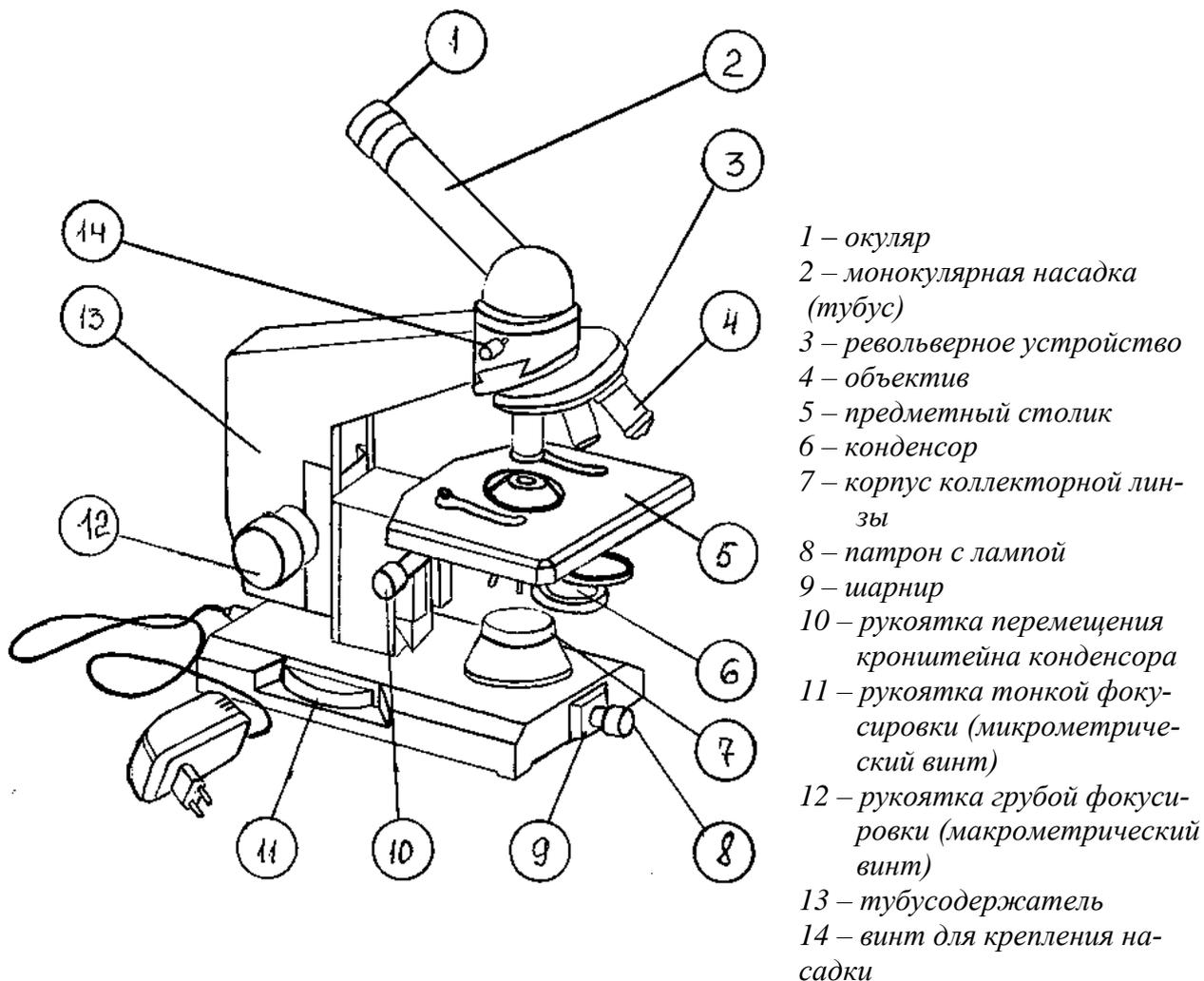
8. В конце занятия руки следует тщательно вымыть, а при необходимости обработать антисептиком.

9. Культуры микроорганизмов после работы сдают дежурным, которые их обезвреживают или при необходимости сохраняют в холодильнике. Материал, требующий продолжения исследования, ставят в термостат. При хранении патогенных

культур их регистрируют в специальном журнале. Указывают количество культур, даты их поступления, посева и уничтожения.

10. Дежурные в конце занятия приводят в порядок рабочие места, тщательно дезинфицируют и при необходимости облучают бактерицидными лампами. Ежедневно обрабатывают стены, полы, инвентарь.

Схема устройства светового биологического микроскопа



**ЗАНЯТИЕ №1: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ**
Техника безопасности. Микроскопический метод исследования. Простые способы окраски микропрепаратов

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *1. Познакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.
2. Овладеть навыками приготовления микропрепаратов и техникой иммерсионной микроскопии.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Инструктаж по технике безопасности работы в микробиологической лаборатории.
2. Оптическая микроскопия: полезное увеличение, разрешающая способность микроскопа. Устройство светового микроскопа.
3. Подготовка микроскопа к работе в светлом поле. Техника микроскопирования с иммерсионной системой. Уход за микроскопом.
4. Методы микроскопии, используемые в микробиологии. Принципы темнопольной, фазово-контрастной, флуоресцентной и электронной микроскопии. Достоинства и недостатки.
5. Приготовление препаратов живых и фиксированных клеток микроорганизмов для светлопольной микроскопии. Простые методы окраски, цели их использования.
6. Основные морфологические группы микроорганизмов – кокки, палочки и извитые формы.
7. Подходы к классификации микроорганизмов. Классификационные категории (царство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид). Бинарная номенклатура.
8. Классификация бактерий по Берджи (1995 г).

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Составить и заполнить таблицу «Микроскопические методы исследования»:

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

2. Составить и заполнить таблицу «Основные таксономические группы микроорганизмов, имеющих медицинское значение»:

Определение	Пример
Царство Эукариота –	
Простейшие –	
Грибы –	
Царство Прокариота –	
Бактерии –	
Микоплазмы –	

Риккетсии –	
Хламидии –	
Спирохеты –	
Актиномицеты –	
Царство Вира –	

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить морфологию бактерий и овладеть методом иммерсионной микроскопии

Задание. Микроскопировать с объективом 90× и иммерсией фиксированные препараты, приготовленные из чистых культур бактерий. Все препараты зарисовать и подписать (увеличение, способ окраски). На рисунках необходимо точно передать форму и расположение клеток. Все рисунки выполнить в стандартных кружках, имитирующих поле зрения микроскопа. В протокол записать технику микроскопирования с иммерсией.

Методические указания

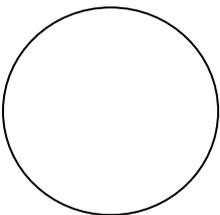
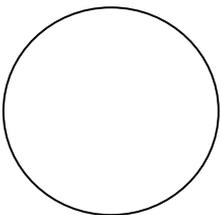
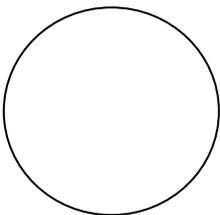
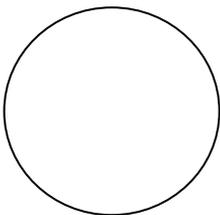
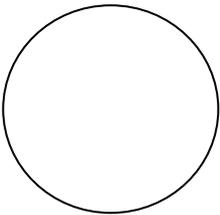
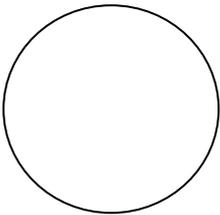
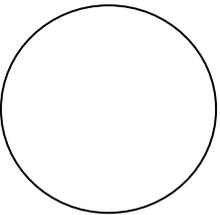
Техника микроскопирования с иммерсией

1. Нанести на высушенный мазок каплю иммерсионного масла.
2. Под контролем зрения погрузить иммерсионный объектив (90× с черной полоской) в каплю масла, фронтальная линза не должна касаться предметного стекла.
3. Установить освещение.
4. С помощью макровинта фокусируют объект, тонкую фокусировку осуществить с помощью микровинта.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Методика микроскопирования с иммерсией:

Препарат №1 Стафилококки <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	Препарат №2 Стрептококки <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	Препарат №3 Палочки <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	Препарат №4 Стрептобацилла <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)
			
Препарат №5 Вибрионы <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	Препарат №6 Спирохеты <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	Препарат №7 Бифидобактерии <hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> (способ окраски, увеличение)	
			

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Что такое разрешающая способность микроскопа? От чего она зависит и как ее увеличить? 2. Почему в микробиологической практике используется метод иммерсионной микроскопии?)

Работа №2

Цель: Овладеть навыком приготовления и простой окраски микропрепаратов из чистой культуры бактерий.

Задание. Приготовить фиксированный препарат из суточной культуры бактерий на плотной питательной среде, окрасить фуксином или метиленовым синим, микроскопировать с увеличением 90× и иммерсией. Препарат зарисовать. Определить морфологию бактерий. Внести в протокол методику приготовления препарата.

Методические указания

Приготовление фиксированного (постоянного) препарата

1. Приготовление мазка.

- с помощью стерильной бактериологической петли на обезжиренное предметное стекло нанести каплю суспензии исследуемого микроорганизма или материала;
- микробный материал равномерно тонким слоем растереть на площади 1,5-2,0 см²;
- высушить приготовленный мазок при комнатной температуре;
- после высушивания мазок зафиксировать в пламени горелки, держа стекло мазком вверх, трижды проводя его через пламя горелки. Во избежание перегрева микроорганизмов время прямого воздействия пламени не должно превышать 3-4 с.

2. Окраска мазка.

- мазок обильно покрыть фуксином (следя за тем, чтобы краситель не высох), красить 3 мин, можно использовать и другие красители – метиленовый синий (окрашивают 2-3 мин).
- слить краску и промыть препарат большим количеством воды;

3. Высушить препарат на воздухе или аккуратно промокнуть полоской фильтровальной бумаги.

ПРОТОКОЛ

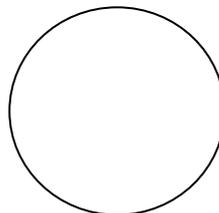
Цель:

Методика приготовления препарата:

Препарат

(название)

(способ окраски, увеличение)



Вывод: (Ответить на вопрос какая группа красителей наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов? Почему? Приведите примеры)



ЗАНЯТИЕ №2: КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ
Сложные способы окраски микропрепаратов

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: Изучить строение клеточной стенки микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Сложные способы окраски, цели их использования. Тинкториальные свойства бактерий.
2. Строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Техника и механизм окраски по Граму.
3. Строение клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий. Техника и механизм окраски по Цилю-Нильсену.
4. L-формы бактерий, определение понятия, причины возникновения. Роль в патологии человека. Отличия L-форм бактерий от протопластов и микоплазм.
5. Строение клеточной стенки грибов и дрожжей.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Выполнить рисунки клеточных стенок грамположительных, грамотрицательных, кислотоустойчивых бактерий и грибов в альбоме, подписать все структурные компоненты:

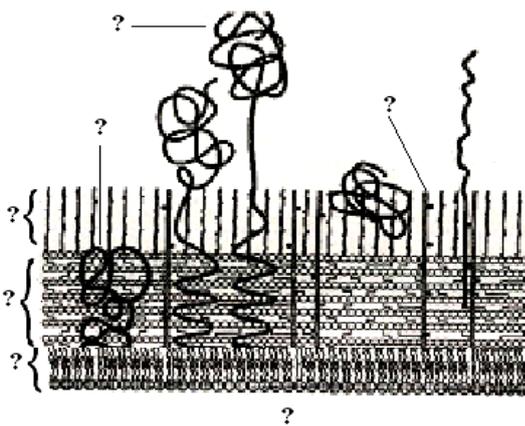


Рис. 1 Клеточная стенка грамположительных бактерий

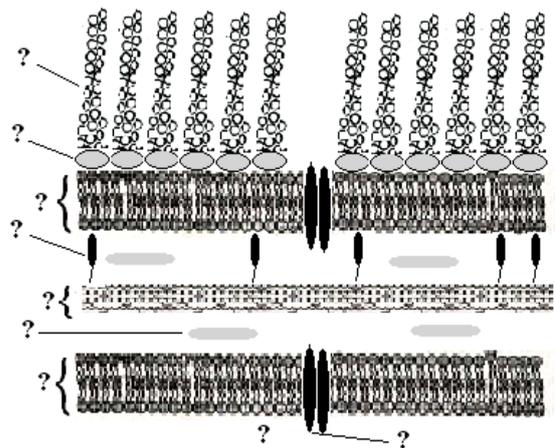


Рис. 2 Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

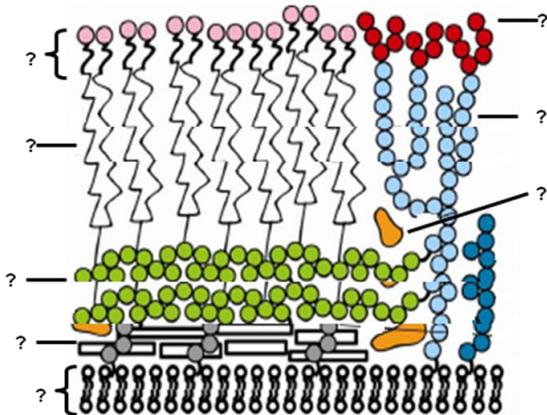


Рис. 3 Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий

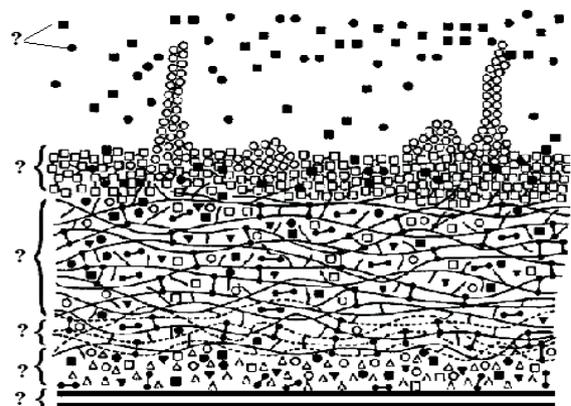


Рис. 4 Клеточная стенка грибов

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Освоить сложный способ окраски бактерий по Граму.

Задание. Приготовить фиксированный микропрепарат из смеси двух бактерий *Bacillus cereus* и *Escherichia coli*, окрасить по Граму, микроскопировать с объективом 90× и иммерсией. При микроскопии определить форму бактерий и отношение их к окраске по Граму. Препарат зарисовать. Заполнить таблицу.

Методические указания

Окраска по Граму

1. Приготовить тонкий и равномерный мазок, без скоплений клеток в определенном участке.
2. Высушить мазок на воздухе.
3. Зафиксировать жаром.
4. Окрасить мазок 1%-ным \ раствором генцианового фиолетового, красить 1-2 мин.
5. Слить краситель (**не в коем случае не промывать водой!!!**).
6. Обработать мазок раствором Люголя 1-2 мин.
7. Обильно промыть препарат водой.
8. Погрузить мазок в раствор 95%-ного этанола на 60 с, препарат слегка покачивать для равномерного отхождения фиолетовых струек краски.
9. Промыть препарат водой.
10. Окрасить препарат дополнительно фуксином.
11. Высушить препарат на воздухе.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Ингредиенты окраски по Граму	Назначение основных ингредиентов	Рисунок с обозначениями
1.		
2.		
3.		
4.		

Вывод: (Ответить на вопрос каков механизм окраски по Граму?)

Работа №2

Цель: Освоить сложный способ окраски кислотоустойчивых бактерий по Цилю-Нильсену.

Задание. Приготовить фиксированный микропрепарат из смеси двух бактерий *Mycobacterium tuberculosis* и *Staphylococcus aureus*, окрасить по Цилю-Нильсену, микроскопировать с объективом 90× и иммерсией. При микроскопии определить наличие в препарате и форму кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий. Препарат зарисовать. Заполнить таблицу.

Методические указания

Окраска по Цилю-Нильсену

1. Приготовить тонкий и равномерный мазок, без скоплений клеток в определенном участке.
2. Высушить мазок на воздухе.
3. Зафиксировать жаром.
4. Окрасить мазок карболовым фуксином Циля (**наносить через фильтровальную бумагу!!!**) с подогреванием до появления паров, но не доводя краситель до кипения, красить 3-5 мин.
5. Слить краситель и промывать препарат водой.
6. Погрузить препарат на 3-5 с в 5%-ный раствор серной или соляной кислоты для обесцвечивания.
7. Обильно промыть препарат водой.
8. Докрасить препарат метиленовым синим Леффлера в течение 3-5 мин.
9. Высушить препарат на воздухе.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Ингредиенты окраски по Цилю-Нильсену	Назначение основных ингредиентов	Рисунок с обозначениями
1.		
2.		
3.		

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Каков механизм окраски по Цилю-Нильсену? 2. В диагностике каких заболеваний используется данный способ окрашивания?)



**ЗАНЯТИЕ №3: СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ
МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ
Методы выявления структур бактериальной клетки и
изучения морфологии грибов**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *Изучить строение бактериальной клетки и морфологию грибов.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Прокариотическая клетка как система. Химический состав одноклеточных организмов. Сравнительная характеристика строения прокариотической и эукариотической клетки.
2. Цитоплазма прокариот. Строение, химический состав и функции.
3. Цитоплазматическая мембрана. Строение, химический состав и функции. Методы выявления.
4. Цитоплазматические структуры (нуклеоид, рибосомы, «мезосомы» и др.). Строение, химический состав и функции. Методы выявления.
5. Жгутики и ворсинки (пили и фимбрии). Строение и основные функции. Подвижность бактерий. Классификация бактерий в зависимости от расположения жгутиков. Примеры. Методы выявления.
6. Строение спирохет, особенности подвижности, методы изучения морфологии.
7. Слизи и капсулы. Химический состав и функции. Виды капсул. Примеры. Техника и механизм окраски по Бурри-Гинсу.
8. Эндоспоры. Индукция спорообразования, стадии. Классификация бактерий в зависимости от расположения спор. Примеры. Техника и механизм окраски по Ожешко и Пешкову.
9. Некультивируемые формы, определение понятие, функции. Примеры.
10. Внутрицитоплазматические включения бактерий (жироподобные вещества, нейтральные жиры, полифосфаты и др.). Химический состав и функции. Методы выявления.
11. Классификация и размножение грибов, морфологические особенности. Диморфизм грибов и роль в патологии человека. Примеры.
12. Негативный способ окраски, цель, достоинства и недостатки. Примеры.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Заполнить таблицу «Структура бактериальной клетки»:

Органоид	Функции	Метод выявления
Обязательные органоиды		
Клеточная стенка		
Цитоплазматическая мембрана		
Нуклеоид		
Рибосомы		
Необязательные органоиды		
Пили		
Жгутики		
Капсула		
Эндоспоры		
Плазмиды		
Включения		
«Мезосомы»		

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

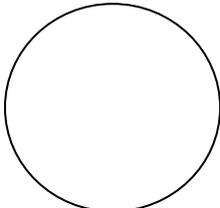
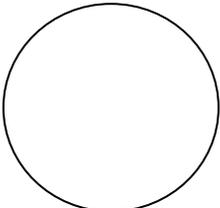
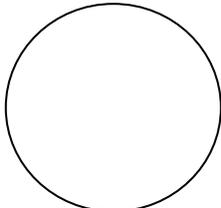
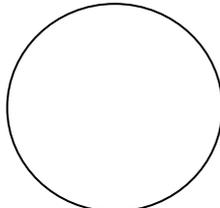
Цель: Изучить строение бактериальной клетки.

Задание. Микроскопировать с объективом 90× и иммерсией фиксированные препараты, приготовленные из чистых культур бактерий с целью выявления компонентов бактериальной клетки (эндоспора, капсула, жгутики, включения).

Все препараты зарисовать и подписать (увеличение, способ окраски, выявляемый объект).

ПРОТОКОЛ

Цель:

Препарат №1	Препарат №2	Препарат №3	Препарат №4
(исследуемый материал)	(исследуемый материал)	(исследуемый материал)	(исследуемый материал)
(способ окраски, увеличение)	(способ окраски, увеличение)	(способ окраски, увеличение)	(способ окраски, увеличение)
			

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какое функциональное значение имеют изученные компоненты бактериальной клетки? 2. Какие два рода клинически значимых споробразующих бактерий Вы знаете? Чем они отличаются друг от друга по морфологическим свойствам?)

Работа №2

Цель: Изучить морфологию плесневых грибов.

Задание. Приготовить и микроскопировать с объективом 40× прижизненные препараты «раздавленная капля» из мицелия грибов родов *Mucor*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Все препараты зарисовать, на рисунках обозначить:

1. Тип плесени (лещинная, головчатая, кистевая);
2. Тип мицелия (септированный /несептированный);
3. Конидиеносец;
4. Везикул;
5. Конидии;
6. Фиалиды.

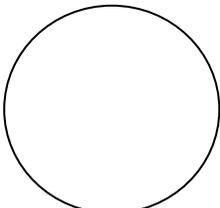
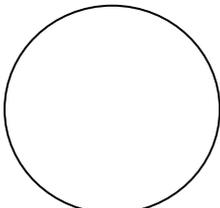
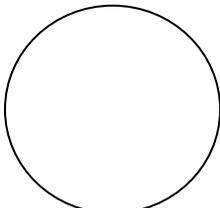
Методические указания

Препарат «раздавленная капля»

1. На предметное стекло нанесите каплю 5%-ной уксусной кислоты (т.к. мицелий грибов плохо смачивается водой).
2. При помощи препаровальной иглы и пинцета перенести кусочек мицелия в каплю и равномерно распределить.
3. На край капли опустить ребром покровное стекло под углом 45°.
4. Накрывать препарат покровным стеклом.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Препарат №1 <i>Mucor sp.</i>	Препарат №2 <i>Aspergillus sp.</i>	Препарат №3 <i>Penicillium sp.</i>
(способ окраски, увеличение)	(способ окраски, увеличение)	(способ окраски, увеличение)
		

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какова роль плесневых грибов в патологии человека? 2. Чем плесневые грибы отличаются от дрожжей?)

Работа №3

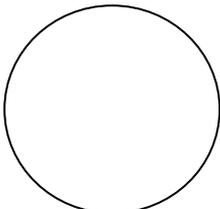
Цель: Изучить морфологию дрожжеподобных грибов.

Задание. Микроскопировать с объективом 90× и иммерсией фиксированный микропрепарат из дрожжеподобного гриба рода *Candida*, окраска метиленовым синим. Препарат зарисовать, на рисунке обозначить:

1. Дрожжевые клетки;
2. Псевдомицелий;
3. Ростовые трубки.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Препарат	
(название)	
(способ окраски, увеличение)	

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Чем дрожжеподобные грибы отличаются от дрожжей? 2. Возбудителями каких заболеваний являются дрожжеподобные грибы?)

Работа №4

Цель: Изучить морфологию дрожжей и освоить негативный способ окраски тушью.

Задание. Приготовить и негативно окрасить тушью прижизненный препарат из взвеси пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Готовый препарат микроскопировать с объективом 90× и иммерсией. Препарат зарисовать, на рисунках обозначить:

1. Фон препарата
2. Дрожжевые клетки

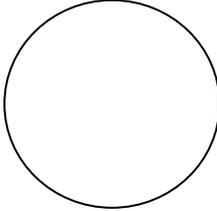
Методические указания

Негативный способ окраски тушью

1. Нанести каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе на предметное стекло.
2. Добавить каплю разведенной 1 : 9 черной туши.
3. С помощью покровного стекла равномерно распределить каплю по поверхности предметного стекла.
4. Высушить препарат на воздухе.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Препарат	

(название)	

(способ окраски, увеличение)	

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой метод исследования применен? 2. В чем достоинства и недостатки негативного способа окрашивания?)



**ЗАНЯТИЕ №4: ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ
МИКРООРГАНИЗМОВ
Бактериологический метод диагностики**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *1. Изучить условия и методы культивирования бактерий и грибов.
2. Овладеть бактериологическим методом диагностики (1-й и 2-й день исследования).*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Питательные субстраты бактерий. Типы питания прокариот – автотрофы, гетеротрофы, прототрофы, ауксотрофы и т.д.
2. Механизмы транспорта питательных веществ в клетку – пассивная диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт.
3. Питательные среды, их классификация, состав и назначение. Примеры.
4. Принципы культивирования микроорганизмов в условиях лаборатории (температура, влажность, аэрация, окислительно-восстановительный потенциал, рН среды, освещенность). Факторы роста, их химическая природа.
5. Кривая роста бактериальной популяции на жидкой питательной среде, ее подробный анализ. Система проточного культивирования бактерий, ее использование в промышленной микробиологии.
6. Пигменты микроорганизмов. Классификация по химическому составу и растворимости. Биологический смысл пигментобразования.
7. Методы выделения чистых культур бактерий. Определение понятий: «чистая культура», «накопительная культура», «биовар», «штамм», «колония».
8. Бактериологический метод диагностики (I и II этапы/дни исследования). Цель и задачи. Морфолого-культуральные свойства бактерий.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Заполнить таблицу «Некоторые приемы выделения чистых культур микроорганизмов»:

Метод	Принцип метода	Область применения
Посев по Коху (серийные разведения)		
Посев методом «истощения»		
Посев по Дригальскому		
Посев на элективные среды		
Посев газоном		
Обработка исследуемого материала кислотой или щелочью		
Прогревание исследуемого материала при 80°C		
Фильтрация исследуемого материала через мембранные фильтры		
Посев по Шукевичу		

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить состав и классификацию питательных сред часто используемых в медицинской микробиологии.

Задание. Внимательно прочитайте аннотации к питательным средам и заполните таблицу.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Питательная среда	Происхождение		Консистенция			Назначение			Состав**
	Естественная	Искусственная	Жидкая	Полужидкая	Плотная	Общая	ДДС*	Элективная*	

*указать дифференцирующий/элективный фактор

**указать для одной питательной среды назначение каждого компонента

Вывод:

Работа №2

Цель: Изучить культуральные свойства бактерий на жидких и плотных питательных средах. Освоить выделение чистых культур бактерий из исследуемого материала методом «истощения».

Задание. Описать культуральные свойства бактерий на жидких питательных средах. Описать культуральные свойства бактерий на МПА. Провести пересев колоний с чашки Петри на скошенный МПА методом «истощения» для накопления чистой культуры. Результаты оформить в виде рисунков с комментариями и таблицы (для колоний микроорганизмов на плотных питательных средах).

Методические указания

При описании роста микроорганизмов на жидких питательных средах отмечают: помутнение среды, образованием пленки, нитей или осадка. Отмечают степень помутнения – слабая, умеренная; особенности пленки – слабая, окрашенная, хрупкая, тонкая; свойства осадка – слизистый, хлопьевидный, рыхлый и др.

При описании роста микроорганизмов по штриху отмечают следующие особенности: скудный, умеренный, обильный, диффузный или четковидный рост. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

При описании колоний микроорганизмов обращают внимание на следующие признаки:

форма колонии – округлая, неправильная, ризоидная и т.д.

размер (диаметр) колонии измеряют в мм; если размер колонии не превышает 1 мм, то их называют точечными.

цвет колонии – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат. При описании колоний грибов отмечают пигментацию воздушного мицелия.

поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кольцами или радиально исчерченная.

характер края – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д. Край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа.

консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, пленчатой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Пересев из чашки Петри в пробирку

1. Зажечь спиртовку.
2. Взять в правую руку бактериологическую петлю и обжечь ее в пламени спиртовки (держать петлю как карандаш).
3. Приоткрыть чашку Петри левой рукой.
4. Остудить петлю в конденсационной воде или проколоть агар в свободном от микробных колоний месте (охлажденная петля не должна вызывать расплавления среды).
5. Взять небольшое количество клеток из подозрительной колонии.
6. Закрывать чашку Петри.
7. Взять пробирку со скошенным МПА в левую руку поместить ее наклонно между большим и указательным пальцем на расстоянии 3-5 см от пламени спиртовки (следить затем, чтобы поверхность агара была хорошо видна).
8. Мизинцем правой руки зажать пробку, повернуть, вынуть ее и держать, не касаясь окружающих предметов.
9. Ввести петлю с клетками микроорганизмов в пробирку с питательной средой, не касаясь стенок или края пробирки.
10. Погрузить петлю с клетками в конденсат и скользящими движениями тщательно растереть зигзагообразными движениями снизу вверх.
11. Вынуть петлю из пробирки, обжечь горлышко пробирки и пробки в пламени спиртовки и закрыть пробирку.
12. Обжечь в пламени спиртовки петлю.

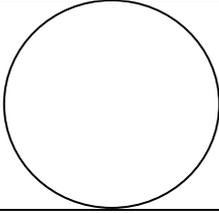
ПРОТОКОЛ

Цель:

Рост микроорганизмов на жидких питательных средах



Рост микроорганизмов на плотных питательных средах

Признак	Рост бактериальных колоний на МПА(рисунок с обозначениями)	
Описание морфолого-культуральных свойств		
Форма		
Размер		
Цвет		
Характер края		
Консистенция		
Примечание		

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Как микроорганизмы могут расти на жидких питательных средах? Почему? 2. Какова цель использования плотных питательных сред в микробиологии? 3. С какой целью проводят описание морфолого-культуральных свойств бактерий?)



**ЗАНЯТИЕ №5: ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ
МИКРООРГАНИЗМОВ
Бактериологический метод диагностики (продолжение)**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *1. Изучить условия и методы культивирования бактерий и грибов.
2. Овладеть бактериологическим методом диагностики (3-й и 4-й день исследования).*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Конструктивный метаболизм: биосинтез углеводов и аминокислот у прокариот. Энергетические затраты клетки.
2. Общая характеристика энергетических процессов у прокариот – брожение (классификация, продукты) и дыхание. Выход АТФ.
3. Классификация микроорганизмов по типу дыхания (строгие аэробы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы, микроаэрофилы, капнофилы). Дыхательные цепи аэробов, факультативных анаэробов и облигатных анаэробов. Биохимическая сущность анаэробноза.
4. Методы культивирования анаэробов. Питательные среды.
5. Ферменты бактерий. Конститутивные и индуцибельные ферменты, их роль в сохранении вида. Понятие «хемовар».
6. Бактериологический метод диагностики (III и IV этапы/дни исследования). Цель и задачи. Этапы идентификации чистой культуры микроорганизмов:
 - а) методы изучения протеолитических свойств у бактерий.
 - б) методы изучения сахаролитических свойств у бактерий: среды Гисса («пестрый ряд»), комбинированные среды типа Ресселя, Олькеницкого.
 - в) панели биохимической идентификации и система индикаторных бумаг (СИБы), их преимущество.
 - г) автоматизированные системы идентификации микроорганизмов. Принцип, достоинства и недостатки.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Заполнить таблицу «Среды для культивирования разных групп микроорганизмов»:

Группа микроорганизмов	Тип питания	Тип дыхания	Пример питательной среды
Стафилококки			
Клостридии			
Риккетсии			
Хламидии			

2. Заполнить таблицу «Схемы дыхательных цепей»:

Аэробы	Факультативные анаэробы	Облигатные анаэробы

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить методы культивирования анаэробов.

Задание. Рассмотреть учебные демонстрации методов и питательных сред для культивирования анаэробных микроорганизмов. Результаты оформить в виде таблицы.

Методические указания

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

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

2. Ознакомиться с условиями создания анаэробноза в эксикаторе (свеча, тиогликолевая кислота).

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

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

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

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

Среда Китта-Тароцци – питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных. Глюкоза и кусочки органов обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла.

Среда контроля стерильности (СКС) – 0,3% агар с добавлением тиогликолевой кислоты (редуцент O₂), посев уколом.

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

ПРОТОКОЛ

Цель:

Метод, среда	Условия создания анаэробноза	Рисунок с обозначениями
Методы		
Физический		
Химический		
Биологический		
Специальные среды		
Китта-Тароцци		
Вильсона-Блер		
СКС (среда для контроля стерильности или тиогликолевая среда)		

Вывод:

Работа №2

Цель: Освоить бактериологический метод диагностики.

Задача. В бактериологическую лабораторию поступил исследуемый материал (рвотные массы) от больного с клиническим диагнозом: «Пищевая интоксикация?» При микроскопии материала обнаружены грамположительные кокки и грамотрицательные палочки. Выделить чистые культуры микроорганизмов, провести их идентификацию. Сделать заключение об этиологии пищевой интоксикации. Оформить протокол бактериологического исследования по дням.

Методические указания

1-й день исследования: Приготовление фиксированного препарата из рвотных масс, окраска по Граму. Посев исследуемого материала на МПА в чашку Петри методом Дригальского.

2-й день исследования: Изучение культуральных свойств выросших колоний. Дифференцируют разные типы колоний. Проводят расчет показателя микробной обсемененности на 1 г рвотных масс (ПМО). ПМО (КОЕ/г) = $m10^{(n+1)}$, где m – количество колоний, выросших на чашке, n – величина разведения.

Из материала части колоний готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Остаток колоний отсеивают петлей в пробирку на скошенный МПА для получения чистой культуры. Посевы ставят в термостат при 37°C на 12-18 ч.

3-й день исследования: Проверяют чистоту выделенных культур бактерий по изучению характера роста бактерий на скошенном агаре (см. предыдущее занятие) и микроскопии мазков из этих культур (окраска по Граму). Делают высев чистой культуры с агара на биохимические панели идентификации, среды Гисса и в МПБ с целью изучения сахаролитических и протеолитических свойств бактерий. Посевы ставят в термостат при 37°C на 12-18 ч.

4-й день исследования: Оценивают результаты биохимической активности по изменению цвета в лунках биохимической панели или сред Гисса и СИБ-полосок. На средах Гисса с углеводами отметить наличие кислых продуктов расщепления углеводов и газообразование. На МПБ обратить внимание на характер роста, отметить наличие продуктов гидролиза белков (сероводорода и индола).

По результатам изучения свойств выделенных чистых культур определяют виды микроорганизмов. Используют определитель Берджи.

Выдают окончательный ответ.

ПРОТОКОЛ

Цель:

1 этап. Выделение чистой культуры					
1 день				2 день	
Исследуемый материал	Микроскопия исследуемого материала (рис.)	Метод выделения чистой культуры	Среда для посева	Характеристика колоний, расчет ПМО	Микроскопия колоний (рис.)

2 этап. Идентификация чистой культуры							
3 день							
Микроскопия чистой культуры (рис.)							
4 день Биохимические свойства							
Посев на среды Гисса							
Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Манноза	Маннит	Индол	Сероводород	
Стафитест							
1	2	3	4	5	6	7	8

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

Справочный материал для оформления протоколов

Дифференциальные признаки некоторых бактерий

Род и вид	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Морфология	палочка	кокк	палочка	палочка
Окраска по Граму	грам-	грам+	грам-	грам-
Рост по Шукевичу	–	–	–	–
Капсула	–	–	+	+/-
Пигмент	–	–	–	+
Лактоза	кГ	–	кГ	–
Глюкоза	кГ	кГ	кГ	-/+
Сахароза	–	+	кГ	–
Манноза	–	кГ	–	–
Индол	+/-	–	–	–
H ₂ S	+	–	–	–
Уреаза	–	+	–	–



ЗАНЯТИЕ №6: АСЕПТИКА
Методы стерилизации и дезинфекции

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: 1. Изучить действие физических и химических факторов на микроорганизмы.
2. Ознакомиться с практическим использованием в медицине результатов действия абиотических факторов на микроорганизмы.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Влияние физических факторов на микроорганизмы: высушивание, замораживание, лиофильное высушивание (сублимация); воздействие температуры; ионизирующие излучения (УФЛ, электромагнитное излучение α -, β - γ - и рентгеновское излучения); ультразвук.

2. Действие химических факторов на микроорганизмы: окислители, спирты, альдегиды, кислоты, щелочи, поверхностно-активные вещества.

3. Определение понятий: «асептика», «антисептика», «дезинфекция» и «стерилизация».

4. Методы стерилизации (прокаливание, кипячение, сухой жар, текучий пар, пар под давлением). Оборудование, режимы, объекты стерилизации и область применения.

5. Паровая стерилизация. Устройство парового стерилизатора (автоклава). Методы контроля работы.

6. Стерилизация фильтрованием: оборудование (свечи Шамберлана, фильтры Зейтца, стеклянные и мембранные фильтры), режимы и объекты стерилизации.

7. Стерилизация облучением: оборудование, режимы и объекты стерилизации.

8. Тиндализация и пастеризация: оборудование, режимы и объекты стерилизации.

9. Стерилизация шприцев, металлических инструментов, бумаги, марли, ваты, резиновых изделий, питательных сред с углеводами и без них, витаминов, антибиотиков, оптических приборов, применяемых для эндоскопических исследований. Подготовка к стерилизации.

10. Методы дезинфекции, классификация. Дезинфектанты, классификация, механизм действия, способы приготовления растворов и применение.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Заполнить таблицу «Основные методы дезинфекции и контроля качества дезинфекции»:

Объект	Метод дезинфекции	Метод контроля
Воздух в перевязочных, операционных		
Поверхности		
Инструменты, белье, перевязочный материал		

2. Заполнить таблицу «Методы стерилизации»:

Метод стерилизации	Действующий фактор	Режим стерилизации	Контроль качества стерилизации
Автоклавирование			
Сухожаровой шкаф			
Дробная стерилизация			

3. Решить ситуационную задачу.

Бактериолог в течение дня работал с культурами синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), протей (*Proteus sp.*) и золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*). По окончании работы стол был обработан 20%-ным раствором хлоргексидина. До и после обработки со стола сделаны смывы, которые посеяли на МПА. Используя результаты, приведенные в таблице, оцените эффективность дезинфекции.

Таблица. Результаты исследования

До обработки 20%-ным раствором хлоргексидина			
Микроорганизм	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>S. aureus</i>
Число колоний на МПА	15	3	20
После обработки 20%-ным раствором хлоргексидина			
Число колоний на МПА	5	0	11

Объясните причины появления указанных микроорганизмов в смывах со стола. Дайте свои рекомендации по улучшению сложившейся ситуации.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить действие УФЛ на микроорганизмы и оценить качество дезинфекции.

Задача. При посеве воздуха из операционной комнаты выделена культура золотистого стафилококка – *Staphylococcus aureus* и сенной палочки – *Bacillus cereus*. Необходимо установить эффективный временной режим стерилизации воздуха операционной УФЛ. Учесть результаты опыта и проанализировать их.

Методические указания

Культуры золотистого стафилококка и сенной палочки, суспендируют в 2 мл стерильного физиологического раствора и засевают газоном в чашки Петри с МПА. После посева с чашек Петри снимают крышки, прикрывают картоном, в центре которого вырезана буква М и ставят под кварцевую лампу на 10 и 30 минут. После облучения чашки накрывают крышками, маркируют и помещают в термостат на 18-24 часа.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Вид бактерий	Результат действия УФЛ	
	Экспозиция 10 минут (рисунок)	Экспозиция 30 минут (рисунок)
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Как действуют УФЛ на бациллы и стафилококки? 2. Какой режим Вы рекомендуете для обработки воздуха операционной УФЛ?)

Работа №2

Цель: Изучить действие ПАВ на микроорганизмы и оценить качество антисептики.

Задание. Разделить поверхность 5%-ного кровяного агар в чашке Петри на 2 сектора и каждый подписать. Один студент из группы делает отпечатки 2-х пальцев до мытья рук на 1 секторе; затем моет руки с мылом, высушивает на воздухе и повторно делает от-

печатки пальцев на 2 секторе. Чашку Петри с посевами инкубировать в термостате в течение суток. Учесть результаты опыта на следующем занятии и проанализировать их (для этого подсчитывается число колоний, выросших на секторах).

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результат: рисунок чашки Петри с ростом микроорганизмов на КА и обозначениями

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Как подействовало ПАВ на микробиоту рук? 2. Каков механизм действия ПАВ?)

Работа №3

Цель: Изучить действие антисептиков и дезинфектантов на микроорганизмы, научиться оценивать эффективность и проводить рациональный подбор дезинфектантов и антисептиков.

Задание. Даны антисептики и дезинфектанты, культуры кишечной палочки (*Escherichia coli*), синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), капсульной палочки (*Klebsiella pneumoniae*) и золотистого стафилококка (*S. aureus*) выделенные от больных в стационаре. Учесть результаты определения чувствительности этих штаммов к антисептикам и дезинфектантам, результаты занести в таблицу и проанализировать.

Методические указания

Исследуемые штаммы микроорганизмов засеваются на чашку Петри с МПА газоном. На посев наносят по одной капле антисептика. Если штамм чувствителен к данному антисептику/дезинфектанту, то в месте его нанесения образуется стерильная зона – отсутствие роста бактерий. Если в месте нанесения антисептика/дезинфектанта отмечается рост микроба – это клинически устойчивый штамм и применять данные препараты в отделении нецелесообразно.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Антисептик/дезинфектант	Штаммы-возбудители			
	<i>E. coli</i> (+/-)	<i>P. aeruginosa</i> (+/-)	<i>K. pneumoniae</i> (+/-)	<i>S. aureus</i> (+/-)

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какие дезинфектанты и антисептики нельзя использовать в данном стационаре? Почему? 2. Какие дезинфектанты и антисептики Вы рекомендуете для использования в данном стационаре? Почему? 3. Перечислите механизмы действия дезинфектантов на микроорганизмы?)

Справочный материал для оформления протоколов

Таблица 1

Изменение температуры пара под давлением

Температура пара, °С	Давление пара, атм.	Температура пара, °С	Давление пара, атм.
112	0,5	128	1,5
121	1,0	132	2,0

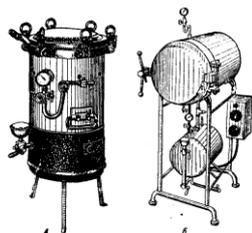


Рис. 1. Автоклавы. А – вертикальный; Б – горизонтальный

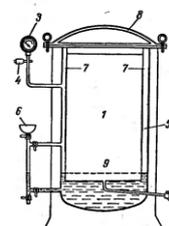


Рис. 2. Схема автоклава. 1 – стерилизационная камера; 2 – кран для выхода воздуха; 3 – манометр; 4 – предохранительный клапан; 5 – водопаровая камера; 6 – воронка для заполнения автоклава водой; 7 – отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 – крышка; 9 – подставка для размещения стерилизуемых материалов

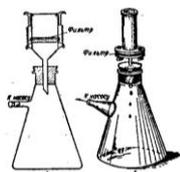


Рис. 3. Приборы для стерилизации фильтрованием А – со стеклянным держателем; Б – с металлическим держателем

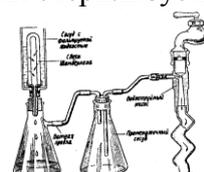


Рис. 4. Фильтровальный прибор со свечой Шамберлена

Таблица 2

Показатели температуры плавления порошков-индикаторов используемых, в качестве термотестов*

Для паровых стерилизаторов			
Название	$T_{пл}, °C$	Название	$T_{пл}, °C$
Бензонафтол	110	Резорцин	118
Антипирин	115	Бензойная кислота	121
Сера	120	Мочевина	132
Для воздушных стерилизаторов			
Название	$T_{пл}, °C$	Название	$T_{пл}, °C$
Тиомочевина	180	Янтарная кислота	183
Барбитал	191	Пилокарпин-гидрохлорид	200

* – на 100 г порошка-индикатор прибавляют 0,01 г сафранина , 0,005 г фуксина или метиленовой сини.

Таблица 3. Наиболее часто применяемые антисептики и дезинфектанты

Класс веществ	Дезинфектант/ Антисептик	Товарное название	Способ применения	Механизм действия
Спирты	/+	спирт медицинский	60-70%-ные водные растворы	на ту ра ци я бе лк

Галогены	/+	йодиол	готов к применению	
Фенолы	+/+	салол, резорцин	растворы	
Галогено-производные орг. веществ	+/+	хлорамин Б, део-хлор, хлоргексидин биглюканат	используют 3%-ный водный раствор хлорамина Б	
Альдегиды	+/+	формидрон, лизоформ, циминаль	часто готовы к применению	
Окислители	+/+	перекись водорода	готовят 3-5%-ные водные растворы	
Неорг. соли	+/-	медный купорос	водные растворы	
Кислоты и щелочи	+/-	борная, уксусная, бензойная кислоты	1-2%-ные спиртовые растворы	
ПАВ	+/-	много	готов к применению	Нарушение проницаемости клеток



ЗАНЯТИЕ №7: БАКТЕРИОФАГИ
Практическое использование бактериофагов, методы культивирования и титрования бактериофагов

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *1. Изучить действие бактериофагов на микроорганизмы.
2. Усвоить принципы использования фагов в диагностике, терапии и профилактике инфекционных заболеваний.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Бактериофаги, строение и свойства. Морфологические группы бактериофагов.
2. Взаимодействие вирулентного бактериофага с чувствительной бактериальной клеткой.
3. Взаимодействие умеренного бактериофага с чувствительной бактериальной клеткой. Определение понятий: лизогения, профаг, лизогенная (фаговая) конверсия. Примеры.
4. Методы культивирования и титрования бактериофагов по Грациа и Аппельману. Получение больших количеств фага, фаголизат бактериальной культуры, методы его очистки.
5. Практическое использование бактериофагов в диагностике – фагоиндикация и фаготипирование. Примеры.
6. Лечебно-профилактическое использование бактериофагов – фаготерапия и фагопрофилактика. Примеры.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Зарисовать в альбом основные морфологические группы бактериофагов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить методы культивирования и титрования бактериофагов.

Задача. В районе произошла вспышка дизентерии. Предположительно фактором передачи инфекции была вода из местного водохранилища. Выделить чистую культуру возбудителя из воды не удалось. Необходимо провести индикацию и титрование по Аппельману дизентерийного бактериофага в сточных водах. Используя готовые демонстрационные посева учесть результаты: а) индикации бактериофага; б) определения титра бактериофага; в) определения титра бактериофага после пассирования. Оформить протокол в виде рисунков. Сделать вывод по каждому этапу исследования.

Методические указания

На первом этапе проводят индикацию дизентерийного бактериофага в сточных водах методом фаговой дорожки:

а) на чашку Петри с МПА засевают газоном культуру дизентерийных бактерий, затем на поверхность посева закапывают фильтрат сточной воды стекающей каплей. Посевы инкубируют в термостате в течение 18 ч. При положительном результате проводят определение исходного титра бактериофага по Аппельману (второй этап).

б) Для титрования фага готовят его десятикратные разведения, в которые добавляют эталонную культуру дизентерийных бактерий (2 млрд. м.т. в 1 мл). Пробирки помещают в термостат на сутки.

в) Если титр недостаточен (необходимый титр для лечебных бактериофагов должен быть не менее 10^8), бактериофаги несколько раз пассируются на дизентерийных клетках, а затем вновь титруются.

Примечание: при достижении необходимого титра бактериофаг стерилизуется фильтрованием через бактериальные фильтры, проходит контроль на стерильность и расфасовывается в стерильные ампулы или флаконы (третий этап).

ПРОТОКОЛ

Цель:

Этап исследования	Результат (рисунок с обозначениями)
Фагоиндикация	
Титрование фага	
Титрование фага после пассирования	

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой принцип и метод диагностики применен? 2. С какой целью проводят индикацию дизентерийного бактериофага методом фаговой дорожки? 3. С какой целью проводят выделение бактериофагов из исследуемого материала?)

Работа №2

Цель: Овладеть навыком проведения фаготипирования бактерий.

Задача. В районе произошла вспышка брюшного тифа. Из воды у места водозабора выделен возбудитель *Salmonella typhi*. Для установления пути распространения инфекции рекомендовано определить фаготип выделенных штаммов *S.typhi* (из воды и от больных людей). Используя готовые результаты провести фаготипирование брюшнотифозных сальмонелл, установить фактор распространения данной инфекции. Оформить протокол в виде рисунка. Сделать вывод.

Методические указания

Исследуемую культуру засевают газоном на МПА. На газон наносят по 1 капле типовых бактериофагов. Учет результатов производят после инкубации по наличию «стерильных пятен» на месте нанесения соответствующих фагов.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Вид возбудителя	Результат	
	Исследуемая культура № 1 (вода) (рисунок с обозначениями)	Исследуемая культура № 2 (больной А) (рисунок с обозначениями)

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой принцип и метод диагностики применен? 2. Что такое типовые фаги? 3. Почему типовые фаги нельзя использовать с лечебно-профилактической целью? 4. Что явилось фактором передачи брюшного тифа? Почему?)

Работа №3

Цель: Научиться классифицировать препараты бактериофагов, используемые для терапии, профилактики и диагностики.

Задание. Используя аннотации к препаратам классифицировать набор бактериофагов по назначению, объяснить невозможность применения диагностических фагов для лечения. Результаты представить в виде схемы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Название (Н):

Классификационное положение (КП):

Действующее начало (ДН):

Состав (С):

Применение (Пр):

Способ применения (СПр):

Вывод:



ЗАНЯТИЕ №8: ГЕНЕТИКА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ
Методы изучения генетических рекомбинаций и мутаций у бактерий. ПЦР

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: 1. Изучить формы и механизмы изменчивости микробов.
2. Овладеть навыком интерпретации результатов ПЦР и молекулярной гибридизации.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Генетические элементы бактериальной клетки (бактериальная хромосома, плазмиды, мобильные генетические элементы), строение, функции и сравнительная характеристика. Генотип и фенотип.
2. Виды изменчивости бактерий и факторы, их вызывающие. Модификационная (фенотипическая) и генетическая изменчивость, их механизмы и значение.
3. Мутационная изменчивость: мутации, мутанты, мутагены. Механизмы развития мутаций. Репарации ДНК, механизмы и значение.
4. Рекомбинационная изменчивость: трансформация, трансдукция, конъюгация, их механизмы и биологическая значимость.
5. Генная инженерия, ее роль в фундаментальной медицине и биологии, применение в практической медицине и народном хозяйстве. Технология рекомбинантных ДНК.
6. Методы молекулярной диагностики инфекционных заболеваний. Классификация.
7. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), механизм, алгоритм постановки, достоинства и недостатки.
8. Метод молекулярной гибридизации. ДНК-зонды, их применение.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Заполнить таблицу «Плазмиды»:

Названия плазмид	Функции плазмид
F-плазида	
R-плазида	
Col-плазида	
Tox-плазида	

2. Заполнить таблицу «Диссоциация бактерий»:

Свойства	S-форма	R-форма
1. Морфологические капсула жгутики		
2. Биохимические		
3. Антигенные		
4. Вирулентные		

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить модификационную изменчивость микроорганизмов.

Задание. Учесть результаты опытов по выявлению модификационной изменчивости на примере:

- а) пигментообразование у *Serratia marcescens*

Бульонная культура *S. marcescens* засеяна на 2 чашки МПА. Одна чашка инкубировалась при 22°C, а другая – при 37°C.

б) О- и Н-форм у *Proteus vulgaris*

Штамм *P. vulgaris* засеян на чашку с МПА и средой Плоскирева.

Оформить протокол в виде рисунков. Объяснить наблюдаемые явления. Сделать вывод.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Модификация	Рисунок с обозначениями	Объяснение
Пигментообразование <i>S. marcescens</i>		
О- и Н-форм у <i>P. vulgaris</i>		

Вывод:

Работа №2

Цель: Изучить явление диссоциации бактерий на R- и S-формы.

Задание. Учесть результаты посева шигелл Зоне на МПА с добавлением и без добавления 0,1 г/л фенола, оформить протокол в виде рисунка. Сделать заключение.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Культура	Рисунок с обозначениями	Объяснение
	Рисунок чашки Петри с ростом шигелл Зонне на МПА с добавлением (а) и без добавления 0,1 г/л фенол (б)	

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какова причина диссоциации в данном опыте? Какой вид изменчивости? 2. Практическое использование диссоциации? 3. Какие свойства бактерий могут изменяться при диссоциации?)

Работа №3

Цель: Изучить явление трансдукции.

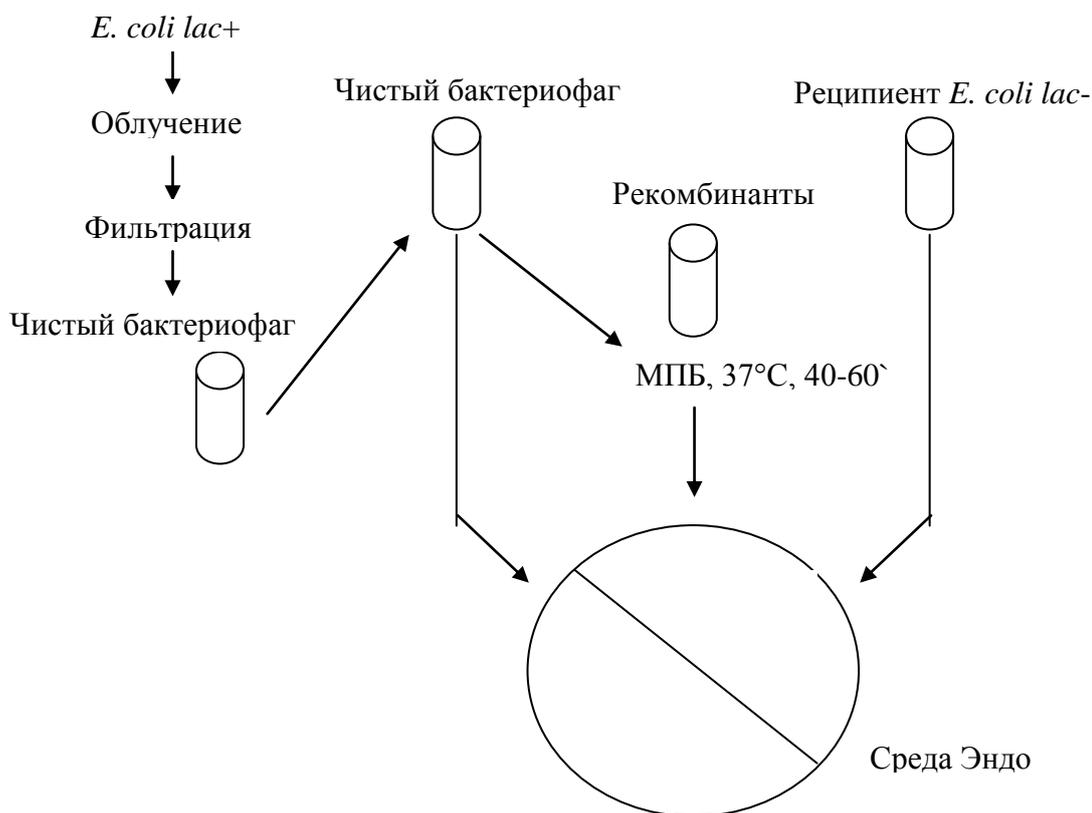
Задание. Учесть результаты готового опыта по трансдукции, поставленного с целью передачи гена β-галактозидазного оперона от фага λ *dgal E.coli lac-*. Оформить протокол, сделать вывод.

Методические указания

Реципиентная культура кишечной палочки, не утилизирующей лактозу (*E. coli lac-*), засеивается на чашку Петри со средой Эндо – «контроль». Фаголизат (продукт лизиса *E. coli lac+* умеренным бактериофагом λ *dgal*) смешивают с реципиентом, выдерживают в термостате 15 мин и засеивают на среду Эндо – «опыт». Посевы ставят в термостат на сутки. При учете результатов определяют наличие и характер роста микробов на секторах чашки Петри (опыт, контроль).

ПРОТОКОЛ

Цель:



Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Почему в опыте использовалась среда Эндо? 2. Зачем был сделан посев на контрольную чашку и как нужно оценить характер роста? 3. Как следует назвать всех выросших микробов в опытной чашке? 4. Отчего в опытной чашке колонии неоднородные? Как это расценить?)

Работа №4

Цель: Изучить явление конъюгации.

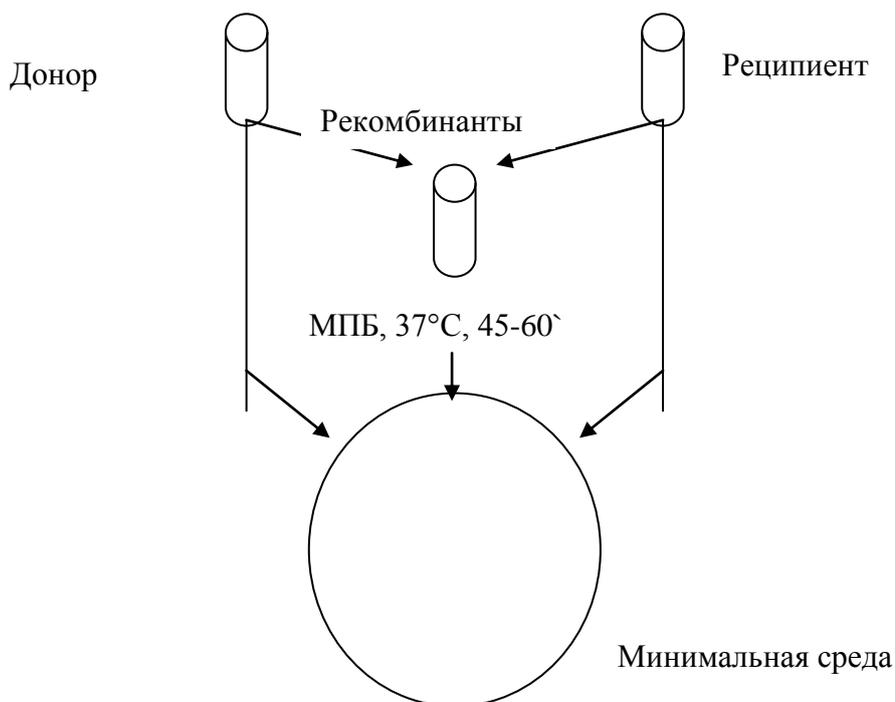
Задание. Учесть результаты готового опыта по конъюгации, поставленного с целью передачи фрагмента хромосомы, содержащего ген *leu*, контролирующего синтез лейцина. Оформить протокол, сделать вывод.

Методические указания

В пробирке смешивают два штамма кишечной палочки: №1 – *E. coli K12 Hfr leu+* и №2 – *E. coli K12 F⁻ leu-* (штамм аукомотрофный по лейцину). После этого производится посев исходных культур №1 и №2, а также их смеси на минимальную питательную среду, не содержащую лейцина. Посев ставится в термостат на сутки. При учете результатов определяют наличие и характер роста микробов в секторах чашки Петри (опыт, контроль №1, контроль №2).

ПРОТОКОЛ

Цель:



Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Удался ли опыт и почему? 2. Какой признак микроба подвергся изменению? 3. Отчего нет роста на секторе с посевом культуры №2? 4. Какой микроб был донором, а какой реципиентом? 5. Что передал донор реципиенту? 6. Какова характеристика рекомбинанта и как он был обнаружен?)

Работа №5

Цель: Познакомиться с постановкой и овладеть умением интерпретировать результаты ПЦР.

Задача. Больному Г. 48 лет и А. 46 лет поставили предварительный диагноз: «Холера», взяты фекалии для исследования. С целью ускоренной диагностики поставили ПЦР на индикацию генов холерного токсина (ctx АВ) и токсинорегулируемых пилей (tcp А). Учесть результаты постановки ПЦР. Сделать заключение.

Методические указания

Обработанный клинический образец (испражнения) 10 мкл вносят в пробирку, добавляют амплификационную смесь, состоящую из воды, буфера для проведения ПЦР, раствора дезоксирибонуклеотидфосфатов, раствора праймеров и раствора фермента Taq-полимеразы. Во вторую пробирку, маркированную «К+», вносят 2 мкл контрольного образца ДНК (содержит гены ctx АВ и tcp А) и 8 мкл воды, в пробирку, помеченную «К-», вносят 10 мкл деионизированной воды. Пробирки закрывают, центрифугируют 5 с при 3000 об/мин и помещают в амплификатор. После амплификации проводят регистрацию результатов методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле, приготовленном на трис-ацетатном буфере. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся красно-оранжевых полос – положительный результат; отсутствие красно-оранжевых полос – отрицательный результат. Результаты электрофореза сравнивают с положительным и отрицательным контролем.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Больной	Результаты ПЦР (рисунок электрофореграммы с обозначениями)
Обследуемый Г.	
Обследуемый А.	

Заключение: (Ответить на вопросы: 1. Подтвердился ли клинический диагноз? Почему? Можно ли на основании только ускоренного метода диагностики подтвердить диагноз «Холера»?)

Справочный материал для оформления протоколов

Принцип ПЦР

Первый этап амплификации системы ПЦР – это тепловая денатурация образца ДНК в результате повышения температуры в реакционной пробирке до 95°C. Кроме исходной ДНК, в реакционной пробирке содержится избыточное количество двух нуклеотидных праймеров, термостабильная ДНК-полимераза (Taq ДНК-полимераза, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*) и четыре дезоксирибонуклеотида. Высокая температура поддерживается в течение 1 мин.

На втором этапе температура в смеси медленно понижается до 55°C. На этом этапе праймеры спариваются с комплементарными им последовательностями в исходной ДНК.

На третьем этапе температура поднимается до 75°C, являющейся оптимальной для каталитической активности Taq ДНК-полимеразы. Синтез ДНК инициируется с 3'-гидроксильного конца каждого праймера.

Продукты ПЦР выявляются с помощью электрофореза в агарозном геле.



ЗАНЯТИЕ №9: МИКРОБНЫЙ АНТАГОНИЗМ. АНТИБИОТИКИ
Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам
Практическое использование бактериоциногении

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: 1. Изучить действие антибиотиков на микроорганизмы.
2. Изучить методы практического использования микробного антагонизма.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Микробный антагонизм, определение понятия, его формы, биологическое значение и методы выявления. Примеры.
2. Бактериоцины как факторы внутривидового антагонизма и защиты. Примеры.
3. Использование бактериоциночувствительности бактерий как эпидемиологического маркера для установления идентичности культур различного происхождения.
4. Антибиотики, определение понятия, способы получения. Требования, предъявляемые к антибиотикам. Примеры.
5. Классификация антибиотиков по происхождению, химическому составу, эффекту и спектру действия.
6. Молекулярные механизмы действия антибиотиков на микроорганизмы (по группам).
7. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (диск-диффузионный метод, метод серийных разведений, экспресс-методы).
8. Методы определения концентрации антибиотика в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча).
9. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, молекулярные механизмы формирования устойчивости (по группам) и пути преодоления. Примеры.
10. Принципы рациональной антибиотикотерапии. Недостатки, осложнения и неудачи антибиотикотерапии.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Составить и заполнить таблицу: «Общая характеристика основных групп анти-микробных химиотерапевтических препаратов»

Группа химиопрепаратов	Спектр действия (узкий/ широкий)	Тип действия (статический/цидный)	Механизм действия (мишень)	Пример
1. Сульфаниламиды 2. Хинолоны/ фторхинолоны 3. Нитрофураны 4. Имидазолы 5. Оксазолидоны 6. β-лактамы 7. Гликопептиды 8. Аминогликозиды 9. Тетрациклины 10. Макролиды 11. Хлорамфеникол 12. Полипептиды 13. Полиены				

2. Решить ситуационную задачу

В терапевтическом отделении среди больных, госпитализированных по поводу пневмонии, возникла вспышка острого кишечного заболевания. Лабораторная диагностика показала, что у всех больных заболевание вызвано кишечной палочкой одной серогруппы. Для проведения эпидемиологического анализа необходимо определить антибиотикочувствительность и колициночувствительность выделенных штаммов кишечных палочек.

Ответить на вопросы:

1. Какой метод и принцип диагностики применен?
2. Кто стал источником инфекции? Почему?
3. Какой антибиотик необходимо использовать для проведения рациональной антибиотикотерапии? Почему?

Таблица. Результаты исследования

Обследуемые	Антибиотики (d зоны подавления роста, мм)					Колицины**				
	Амп	Ген	Цеф	Цип	Лев	А	В	С	Д	Е
Больной А.	5	26	5	25	8	+	+	-	-	+
Сотрудник В.	24	20	23	40	5	+	+	+	-	+
Сотрудник С.	5	26	5	25	5	+	+	-	-	+

* Амп – ампициллин
Ген – гентамицин
Цеф – цефазолин
Цип – ципрофлоксацин
Лев – левомицетин

** «+» – чувствительна
«-» – не чувствительна

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить явление микробного антагонизма.

Задание. В середине чашки Петри с МПА сделан посев петлей протей (*Proteus vulgaris*), после чего полукругом вокруг посева была засеяна культура *B. cereus* (посев по Перетцу), чашки инкубировали в термостате в течение 24 ч при 37°C. Учитывая культуральные особенности протей учесть результат опыта (зарисовать в альбом) и объяснить механизм микробного антагонизма.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Вид микроорганизма	Микробный антагонизм (рисунок с обозначениями)

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Как растет протей в опытной чашке? Почему?
2. Что такое бактериоцины?)

Работа №2

Цель: Изучить практическое использование явления бактериоциногенности.

Задача. В детском терапевтическом отделении среди группы детей от 6 месяцев до 1 года, госпитализированных по поводу пневмонии, возникла вспышка острого кишечного заболевания. Лабораторная диагностика показала, что у всех детей заболевание вызвано кишечной палочкой. Для проведения эпидемиологического анализа необходимо определить колициночувствительность выделенных штаммов кишечных палочек. Используя готовые демонстрационные посева определить колициноотипы изучаемых культур, обозначив буквами (соответственно типам колицинов, выделяемых набором колициногенных штаммов). Оформить протокол в виде рисунка. Сделать вывод о возможном источнике инфекции.

Методические указания

Колициногенные музейные культуры, выделяющие разные типы колицинов, засевают уколом в чашку Петри, разделенную на маленькие квадратики, после проращивания посева убивают парами хлороформа. Сверху сплошным газоном засевают исследуемые штаммы бактерий, выделенные от больных и носителей (каждый на отдельной чашке).

Учет результатов проводится после суточной инкубации в термостате. При наличии колициночувствительности вокруг колициногенного штамма отмечается стерильная зона.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Обследуемые	Рисунок	Колицинотип
Ребенок А.		
Сотрудник В.		
Сотрудник С.		

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Кто стал источником инфекции? Почему? 2. Можно ли использовать колицины с лечебно-профилактической целью?)

Работа №3

Цель: Овладеть навыком постановки и оценки антибиотикограммы.

Задача. В клинику поступили больной А., 27 лет с диагнозом стафилококковой пневмонии и больной Б. Для успешного этиологического лечения при выборе эффективного антибиотика было рекомендовано определение антибиотикограммы возбудителя. Используя готовые демонстрационные посева учесть результаты определения чувствительности стафилококка к антибиотикам диско-диффузионным методом, составить антибиотикограмму. Оформить протокол, сделать заключение.

Методические указания

На поверхность плотной питательной среды засевают газоном исследуемую культуру. Накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиками, на расстоянии не менее 2-х см друг от друга (не более 6-ти дисков на чашку). После инкубации посевов в течение суток учитывают чувствительность культуры к антибиотикам по диаметрам зон отсутствия роста вокруг дисков.

Для измерения диаметра зон задержки роста чашки помещают сверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал под углом 45°. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряют с точностью до 1 мм с помощью линейки или штангенциркуля. Интерпретация результатов ведется по табличным данным предприятия-изготовителя дисков.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Вид возбудителя	Рисунок	Величина зон задержки роста, мм (S, R, I)*					
		Антибиотики					
<i>S. aureus</i>							

S – чувствительные ($d > 20$ мм), R – резистентные ($d < 10$ мм), I – умеренно чувствительные ($20 \text{ мм} > d > 10 \text{ мм}$)

Заключение: (Ответить на вопросы: 1. Какой принцип и метод диагностики применен? 2. Какой антибиотик необходимо назначит для рациональной антибиотикотерапии? Почему?)

Работа №4

Цель: Овладеть навыком подбора терапевтических концентраций антибиотиков.

Задача. В целях назначения больному рациональной схемы лечения пенициллином необходимо определить минимальную бактериостатическую (подавляющую) концентрацию (МПК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) препарата по отношению к возбудителю – золотистому стафилококку. Учесть готовые результаты. Сделать вывод. Оформить протокол.

Методические указания

В пробирки с 1 мл МПБ добавляют исследуемый антибиотик в различных концентрациях: от 1 до 128 ед/мл. Все пробирки засевают 1 мл бульонной культуры стафилококка. Посевы инкубируют в термостате при 37° в течение 24 ч. Учитывают результаты определения МПК.

МПК – это наименьшая концентрация антибиотика, при которой не происходит размножение бактерий и содержимое пробирки остается прозрачным.

Для определения МБК из пробирок с отсутствием видимого роста и из пробирки с минимальной концентрацией антибиотика, где есть рост (контроль) делают высев секторами в чашки Петри с МПА. На секторах обозначают концентрацию антибиотика, из которой сделан высев. Посевы ставят в термостат при 37°С на 18-24 ч. Учитывают результаты определения МБК по отсутствию роста бактерий на агаре в соответствующих секторах.

ПРОТОКОЛ**Цель:**

Материал	Концентрация антибиотика в МПБ, ед/мл									Результат (МПК, МБК)
	128	64	32	16	8	4	2	1	К	
Наличие роста микроба в МПБ										
Наличие роста микроба при высеве на МПА										

«+» – рост бактерий, «-» – отсутствие роста

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Чему равна МПК и МБК? 2. Почему МБК выше, чем МПК? 2. Может ли быть наоборот? Почему? 3. С какой целью поставлен контроль?)



ЗАНЯТИЕ №10: МИКРОБИОТА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА
Методы изучения и оценки микробиоценозов человека. Дисбактериозы

- УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ:**
1. Изучить количественный и качественный составы нормальной микробиоты биотопов организма человека.
 2. Овладеть основными методами лабораторной диагностики дисбиоза кишечника и принципами его коррекции.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Нормальная микробиота организма человека, классификация (резидентная, транзиторная).
2. Значение нормальной микробиоты для организма человека. Понятие о колонизационной резистентности, ее механизмы. Гнотобионты и гнотобиология.
3. Микробиота кожных покровов. Отдельные представители.
4. Микробиота ротовой полости и верхних дыхательных путей. Отдельные представители.
5. Микробиота урогенитального тракта мужчин и женщин. Отдельные представители.
6. Микробиота желудочно-кишечного тракта. Отдельные представители.
7. Микробиота новорожденных, этапы ее становления у детей при естественном и искусственном вскармливании.
8. Дисбактериоз, условия и причины возникновения на примере кишечника (стадии и степени). Методы микробиологического изучения дисбактериозов. Критерии оценки результатов исследования на дисбактериоз.
9. Препараты для восстановления нормальной микробиоты организма человека, классификация, принципы их получения, показания к применению.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Заполнить таблицу «Основные формы симбиоза в системе паразит – хозяин и микроб – микроб»:

Форма симбиоза	Механизм взаимодействий	Примеры взаимодействий
Комменсализм (микроорганизм – хозяин)		
Мутуализм (микроорганизм – хозяин)		
Паразитизм (паразит – хозяин)		
Антагонизм (межмикробные взаимодействия)		
Синергизм (межмикробные взаимодействия)		
Индифферентность (межмикробные взаимодействия)		

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить микробиоту зубного налета.

Задание. Взять зубной налет шейки зуба с помощью стерильной зубочистки, сделать мазок, окрасить способом Грама и микроскопировать. Выявить характерных представителей микробиоты зубного налета, обозначить на рисунке.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Микропрепарат	Рис. с обозначениями
---------------	----------------------

Вывод:

Работа №2

Цель: Овладеть навыком бактериологической диагностики дисбактериоза кишечника.

Задача. В бактериологическую лабораторию доставили материал (фекалии) от больного Р., 13 лет для исследования на дисбактериоз. Используя готовые демонстрации провести микробиологическое исследование кала на дисбактериоз. Оформить протокол. Сделать вывод.

Методические указания

Для постановки опыта из 1,0 г фекалий делают последовательные 10-кратные разведения в физиологическом растворе (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и т.д.) и засевают по 0,1 мл разведения на чашки Петри с элективными средами, предназначенными для роста определенных представителей микробиоты. Посевы инкубируют при 37°C в течение 2-3 суток. Далее изучают посевы.

1. Подсчитывают число выросших колоний на чашках Петри.
 - Энтеробактерии (общее содержание) – среда Эндо (разведение 10^{-1});
 - Эшерихии лактозопозитивные – среда Эндо (разведение 10^{-5});
 - Гемолизирующие эшерихии и стафилококки – кровяной агар (разведение 10^{-5});
 - Стафилококки – желточно-солевой агар (разведение 10^{-6});
 - Энтерококки – среда Калины (разведение 10^{-6});
 - Грибы кандиды – среда Сабуро (разведение 10^{-5});
 - Лактобациллы – среда МРС (разведение 10^{-5});
 - Бифидобактерии – Бифидум-среда;
 - Клостридии – клостридиальный агар (разведение 10^{-5});

2. Определяют количество микробов в 1,0 г фекалий по формуле:

$$N = m10^{(n+1)},$$

где N – общее количество микробов в 1,0 г фекалий, m – количество колоний, выросших на чашке, n – величина разведения.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результаты исследования фекалий на дисбактериоз
 ФИО _____ Возраст _____

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов в г фекалий, КОЕ/г		
	Норма (взрослые)	Норма (дети 1,5-2 лет)	У обследуемого
Патогенные энтеробактерии	нет	нет	
Общее количество энтеробактерий	10^7-10^8	10^7-10^8	

Эшерихии с нормальной ферментативной активностью	10^7-10^8	10^7-10^8	
Эшерихии с пониженной ферментативной активностью	10^6-10^7	$<10^6$	
Эшерихии лактозонегативные	10^5-10^6	$<10^2$	
Гемолизирующие эшерихии	нет	нет	
Протеи (общее количество)	$<10^3$	$<10^3$	
Другие условно-патогенные энтеробактерии	$<10^2$	$<10^2$	
Энтерококк	10^7-10^8	10^6-10^7	
Стафилококки (общее количество)	10^4-10^5	10^4-10^5	
Гемолизирующие стафилококки	нет	нет	
Бифидобактерии	10^9-10^{10}	$10^{10}-10^{11}$	
Лактобациллы	10^7-10^8	10^6-10^7	
Дрожжеподобные грибы	$<10^4$	$<10^2$	
Клостридии	нет	нет	

Заключение _____ Степень _____

Работа №3

Цель: Изучить препараты для коррекции дисбиотических состояний.

Задание. Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации к препаратам. Результаты представить в виде схемы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Название (Н):

Классификационное положение (КП):

Действующее начало (ДН):

Состав (С):

Применение (Пр):

Способ применения (СПр):

Вывод:

Справочный материал для оформления протоколов

Интерпретация результатов микробиологического исследования на дисбактериоз кишечника

Дисбактериоз I степени (субклиническая). Это латентная стадия, при которой происходит снижение количества одного из представителей индигенной микробиоты без изменения других составляющих микробиоценоза. Клинически 1-я стадия не проявляется и может быть диагностирована только с помощью лабораторного исследования. При этой форме дисбактериоза рекомендуется рациональная диета.

Дисбактериоз II степени (субкомпенсированная форма). Происходит снижение количества или элиминация отдельных представителей индигенной микробиоты (чаще всего бифидобактерий и лактобактерий) и увеличение содержания факультативной и/или транзитной условно-патогенной микробиоты. Сопровождается снижением концентрации основных представителей анаэробной микробиоты и количественными и качественными

изменениями колибактериальной микробиоты, включающей повышение уровня условно-патогенных микроорганизмов. Возможна дисфункция кишечника и местные воспалительные процессы – энтерит, стоматит и др. Для лечения рекомендуется диета, функциональное питание и применение корректирующих препаратов – пробиотиков и пребиотиков.

Дисбактериоз III степени (декомпенсированная форма). Основные тенденции: изменения микробиоты нарастают, условно-патогенные микроорганизмы становятся доминирующими, отдельные их представители распространяются за пределы биотопа и появляются в полостях, органах и тканях, в которых они обычно не встречаются. Например, *E.coli* – в желчных путях, *Candida spp.* – в моче и т.п. Развивается декомпенсированная форма дисбактериоза с выраженными проявлениями, чаще всего воспалительного характера, вплоть до тяжелых септических форм. Для коррекции микробиоты в этой стадии нередко используют «селективную деконтаминацию» путем назначения антибактериальных препаратов из группы фторхинолонов, монобактамов, аминогликозидов (перорально). Эти препараты обладают избирательной активностью, прежде всего, по отношению к разным представителям энтеробактерий. Коррекция микробиоты завершается с помощью длительного применения препаратов пробиотиков, пребиотиков и диетического питания.



ЗАНЯТИЕ №11: САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ **Методы санитарно-микробиологических исследований**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: 1. Изучить микробиоту окружающей среды и пищевых продуктов.
2. Овладеть санитарно-микробиологическими методами оценки объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Предмет изучения, цели и задачи санитарной микробиологии.
2. Санитарно-показательные группы микроорганизмов (СПМ), общая характеристика биологических свойств групп, критерии, предъявляемые к СПМ.
3. Микробиота окружающей среды (вода, воздух, почва), источники загрязнения, роль в распространении патогенных микроорганизмов, показатели санитарного состояния.
4. Пищевые продукты как объекты санитарно-микробиологических исследований – физико-химические свойства и состав. Правила хранения, технологические способы обработки и характер нормальной специфической микробиоты.
5. Роль пищевых продуктов в распространении патогенных микроорганизмов. Классификация пищевых отравлений микробной этиологии (пищевые токсикоинфекции и интоксикации), определение понятий, основные возбудители.
6. Санитарно-микробиологический контроль ЛПУ, аптек и лекарственных форм – цель, периодичность исследований, объекты контроля.
7. Классификация методов санитарно-микробиологических исследований. Показатели микробного загрязнения – ОМЧ, ОКБ, микробный титр и индекс. Способы определения.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Заполнить таблицу «Основные группы СПМ»

Показатели фекального загрязнения	Показатели воздушно-капельного загрязнения	Показатели загрязнения, разлагающимися отбросами

2. Заполнить таблицу «Характеристика основных групп СПМ пищевых продуктов»

Наименование группы	Морфобиологические свойства (заполняют студенты)	Объекты, в которых целесообразно определять (заполняют студенты)
Колиформные бактерии		
Энтерококки		
Споры сульфитредуцирующих клостридий		
Протей		

3. Решить ситуационную задачу

В лекарственной форме *Solutions glucosi* 5% для новорожденных обнаружено присутствие микроорганизма. В соотношении 1 : 10 проведен посев лекарственной формы на тиогликолевую среду и бульон Сабуро с гентамицином, посева культивировали при 37°C, в течение 14 суток. Результаты учитывались визуально по помутнению среды. Видимое помутнение произошло только в тиогликолевой среде на 12-е сутки инкубации. Среда Сабуро оказалась стерильной. Из колбы с помутневшей тиогликолевой средой сделан высев

на МПА и мазок. При последующей идентификации чистой культуры выделенного микроорганизма получены следующие результаты.

Таблица. Результаты исследования

Морфология	Окраска по Граму	Рост на МПА	Рост по Шукевичу
палочка	отрицательно	ползучий	+

На основании представленных в таблице свойств проведите идентификацию микроба и дайте заключение по стерильности исследуемого препарата.

Ответить на вопросы:

1. Какая вода используется для приготовления лекарственных стерильных форм (кроме инъекционных и инфузионных)?
2. Почему к лекарственным стерильным формам для энтерального применения не применяются требования апирогенности? Что такое пирогенность?
3. Почему данный микроорганизм не погиб при стерилизации?
4. Каким путем данный микроорганизм мог попасть в лекарственную форму?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Освоить бактериологический метод оценки санитарного состояния воздуха ЛПУ по Коху.

Задача. В родильном доме возникли случаи внутрибольничной инфекции: нагноение пупочного кольца у новорожденного, нагноение послеоперационного шва у роженицы. Из гноя выделены штаммы золотистого стафилококка. С целью выяснения механизмы заражения проведено бактериологическое исследование воздуха по методу Коха родильного зала, операционной, палаты новорожденных, послеоперационной палаты. Оценить результат исследований, оформите протокол опыта, сделать вывод.

Методические указания

Чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 40 минут, затем чашки закрывают и сутки инкубируют (37°C).

Учет результатов посева воздуха проводят путем подсчета общего числа колоний, определения типов колоний (по цвету, размеру, структуре краев и поверхности). Изучают морфологию микроорганизмов (окраска по методу Грама) в различных типах колоний.

Для подсчета выросших колоний при густом росте можно использовать прозрачные сетки с площадью квадрата 1 см²:

1. На дно чашки положить сетку и подсчитать количество колоний в 10 квадратах, расположенных по 2 диагоналям.
2. Определить среднее число колоний в одном квадрате.
3. Для определения общего числа колоний в чашке Петри необходимо среднее число колоний в одном квадрате умножить на площадь (S, см²) дна чашки Петри ($S = \pi R^2$, где R – радиус, равен 5 см). Число колоний соответствует числу микробов, так как одна микробная клетка дает рост одной колонии.
4. Рассчитать количество микробов в 1 м³ воздуха, для чего общее число колоний, выросших на чашке Петри, умножить на 100 (так как за 40 минут нахождения чашек открытыми оседает примерно столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха).

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования. В воздухе родильного зала и операционной должно быть менее 750 КОЕ/м³, а в палате – менее 3500 КОЕ/м³.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Объекты исследования воздуха (помещения)	Результаты посева воздуха		
	Количество колоний	Число типов колоний	Микробное число или обсемененность воздуха (количество микробов в 1 м ³ воздуха)
Операционная			
Родильный зал			
Палата			

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Соответствует ли санитарное состояние исследуемых помещений нормативным требованиям или превышает их? 2. Какие мероприятия следует провести для улучшения санитарного состояния помещений, если обсемененность воздуха выше нормы?)

Работа №2

Цель: Познакомиться с методом и научиться оценивать результаты определения фекального загрязнения воды по количеству общих колиформных бактерий.

Задача. В населенном пункте возникли случаи кишечных заболеваний. В санэпидемстанцию направлена водопроводная вода для определения фекального загрязнения. Дайте оценку качества воды по количеству общих колиформных бактерий (ОКБ) и определить пригодность использования ее для питья.

Методические указания

ОКБ воды определяют с использованием мембранных фильтров, задерживающих БГКП. Воду (300 мл) фильтруют через мембранные фильтры по 100 мл, которые после окончания фильтрации помещают на поверхность среды Эндо. После суточной инкубации (37°C) подсчитывают количество БГКП.

Согласно СанПиНу на питьевую водопроводную воду, в ней должны отсутствовать общие колиформные бактерии в 100 мл.

ПРОТОКОЛ**Цель:**

Результат: рисунок с обозначениями.

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Чему равно ОКБ исследуемой воды? 2. Пригодна ли вода для питья?)

Работа №3

Цель: Определить соответствие микробиоты кисломолочных продуктов микробиоте закваски.

Задача. В бактериологическую лабораторию ЦГСН поступил образец кефира и измененными органолептическими свойствами. С целью выявления микробов порчи был сделан микропрепарат и окрашен метиленовым синим. Оценить результаты микроскопии, сравнить с образцом закваски, отвечающим требованиям ГОСТа, сделать вывод.

Методические указания

В норме в кефире должны быть обнаружены молочнокислые стрептококки (часто в виде диплококков), небольшое количество молочнокислых палочек и единичные дрожжевые клетки.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Исследуемый материал	Результат микроскопии (рис. с обозначениями)
Кефирная закваска	
Поступивший образец кефира	

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Соответствует ли микробный пейзаж исследуемого образца кефира норме? 2. Какие отклонения были Вами отмечены?)

Работа №4

Цель: Усвоить принцип бактериологического исследования готовых кулинарных изделий из мяса и мясных продуктов.

Задача. В целях контроля технологии производства котлет в студенческой столовой необходимо провести бактериологическое исследование жареной котлеты. Определите микробное число, наличие в пробе колиформных бактерий, патогенных энтеробактерий и патогенного стафилококка.

Методические указания

1. Из внутренней части котлеты приготавливают 4 навески по 10,0 г. Каждую навеску эмульгируют в ступке с 90,0 мл физиологического раствора (разведение 1 : 10).

2. Для определения микробного числа делают посев на чашку: 0,1 мл разведения 1 : 10 заливают 9,9 мл расплавленного и отсуженного до 45°C МПА, после инкубации 24 часа при 37°C подсчитывают выросшие колонии.

Другие эмульсии сеют по 10,0 мл на среды накопления:

- а) для определения энтеропатогенных бактерий на селенитовую среду;
- б) для определения кишечной палочки – на среду Кесслера;
- в) для определения патогенного стафилококка – на МПБ + 6% NaCl. Посевы помещают в термостат на 24 часа при 37°C.

3. Производят пересев со сред накопления на дифференциально-диагностические среды:

- а) со среды Кесслера пересевают на среду Эндо;
- б) с селенитовой среды – на среду Плоскирева;
- в) с МПБ – в плазму крови, на желточно-солевой агар (ЖСА).

4. Учет результатов:

а) подсчитывают общее количество микробов в 1 г., т.е. число колоний на чашке $\times 10$.

б) при наличии на среде Эндо колоний, характерных для группы кишечной палочки, готовят препарат, окрашивают по Граму. Наличие грамтрицательных палочек подтверждает присутствие в пробах бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

в) рост на среде Плоскирева колоний, подозрительных на энтеробактерии (лактозо-негативных), требует их идентификации по общепринятой методике до определения вида.

г) наличие лецитовителлазы и плазмокоагулазы у выделенного стафилококка свидетельствует о его патогенности.

Примечание: При бактериологическом исследовании жареной котлеты (внутренняя часть) кишечная палочка, патогенные энтероабактерии и патогенный стафилококк должны отсутствовать. Микробное число не должно превышать 1000 КОЕ в 1 г продукта.

ПРОТОКОЛ

Цель:

№ исследуемого образца	Рост на МПА	Рост на средах накопления			Рост на дифференциально-диагностических средах, микроскопия колоний			
	ОМЧ, КОЕ/г	Селенитовая	Кесслера	МПБ+ 6%-й NaCl	Эндо (лактозопозитивные колонии)	Плоскирева (лактозопозитивные колонии)	Цитратная плазма (плаз-мокоагулаза)	ЖСА (лецитовителлаза)
1								
2								

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Чему равно микробное число продукта? 2. Соответствует ли технология приготовления котлет нормативным требованиям? Почему?)

Справочный материал для оформления протоколов

Санитарно показательные микроорганизмы в воде централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения (СанПиН 2.1.4.1074-01)

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)	Число бактерий в 100 мл ^{а)}	Отсутствие
Общие колиформные бактерии ^{б)} (ОКБ)	Число бактерий в 100 мл ^{а)}	Отсутствие
Общее микробное число ^{б)} (ОМЧ)	Число образующих колонии бактерий в 1 мл	Не более 50
Колифаги ^{в)}	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий ^{г)}	Число спор в 10 мл	Отсутствие
Цисты лямблий ^{в)}	Число цист в 50 л	Отсутствие

Примечание:

а) При определении проводится трехкратное исследование по 100 мл отобранной пробы воды.

б) Превышение норматива не допускается в 95% проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

в) Определение проводится только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

г) Определение проводится при оценке эффективности технологии обработки воды.



**ЗАНЯТИЕ №12: КОЛЛОКВИУМ №1
ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *Проверка знаний и умений студентов по разделу общая микробиология.*

ПРОГРАММА КОЛЛОКВИУМА

ИСТОРИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Введение

Микробиология как фундаментальная наука, изучающая закономерности жизнедеятельности микроорганизмов. Значение медицинской микробиологии в практической деятельности врача, ее связь с другими биологическими и медицинскими дисциплинами. Задачи медицинской микробиологии в изучении возбудителей инфекционных заболеваний, патогенеза вызываемых ими болезней, методов их лабораторной диагностики, специфической профилактики и терапии.

История микробиологии, основные этапы развития

Зарождение микробиологии. А. Ван Левенгук. Формирование представлений о микробной природе инфекционных заболеваний – Гиппократ, Авиценна, Д.С. Самойлович. Пастеровский период в развитии микробиологии. Значение работ Л. Пастера и его школы в развитии микробиологии. Вклад Р. Коха и его школы в развитие общей и медицинской микробиологии. Открытие возбудителей инфекционных заболеваний человека. История развития химиотерапии (П. Эрлих, А. Флеминг, З. Ваксман и др.).

Вирусология как самостоятельная наука. Д.И. Ивановский – основоположник вирусологии. Становление вирусологии как самостоятельной науки. Открытие вирусов, поражающих животных и человека, бактерии (бактериофагов) и вызывающих опухоли у животных (онкогенные вирусы).

Иммунология как самостоятельная наука. Вклад Л. Пастера, И.И. Мечникова, П. Эрлиха, Э. Беринга, Э. Ру и др. в развитие инфекционной иммунологии.

Прогресс медицинской микробиологии, вирусологии, инфекционной иммунологии, вакцинологии и химиотерапии в XX веке, вклад Н.Ф. Гамалея, Л.А. Зильбера, З.В. Ермольевой, П.Ф. Здродовского, В.Д. Тимакова. Перспективы развития микробиологии в XXI веке.

МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Систематика и номенклатура прокариот

Основные принципы систематики прокариот. Биогенетическая и нумерическая классификации. Определитель прокариот по Берги (Bergey). Таксономические категории: семейство, род, вид, биовар, хемовар, морфовар. Популяция, штамм, культура, клон. Бинарная номенклатура бактерий.

Морфология бактерий. Структура бактериальной клетки

Нуклеоид бактерий, функции и методы его выявления. *Цитоплазма. Рибосомы*: величина, строение, функции. Цитоплазматические включения, их химическая природа; *зерна волютина*, значение, методы окраски. Строение *цитоплазматической мембраны* и *мезосом*, их роль в жизнедеятельности бактерий. *Клеточная стенка*, ее строение у грамположительных и грамотрицательных бактерий, функции. Протопласты, сферопласты и L-формы бактерий, их свойства. *Капсула*, условия образования, химическая природа, значение, методы выявления. *Жгутики*, типы расположения, ультраструктура, значение, способы выявления. *Ворсинки* (фимбрии, пили), подразделение, строение, значение. *Споры* (эн-

доспоры), их расположение, строение, причины устойчивости спор к воздействиям внешней среды, условия и стадии образования, значение, методы выявления спор.

Морфология и ультраструктура прокариот и микроскопических грибов

Актиномицеты. Таксономическое положение. Особенности морфологии чистой культуры Друза в тканях, структура. Методы изучения в световом микроскопе. Роль в инфекционной патологии человека.

Спирохеты. Таксономическое положение. Ультраструктура (цитоплазматический цилиндр, двигательный аппарат, клеточная стенка). Морфологические отличия спирохет рода *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. Методы изучения спирохет в живом состоянии. Методы окраски спирохет. Роль спирохет рода *Borrelia*, *Treponema* в инфекционной патологии человека.

Риккетсии. Таксономическое положение. Морфологические типы риккетсий. Методы окраски (методы Здродовского, Романовского-Гимзы). Обязательный внутриклеточный паразитизм. Методы культивирования. Роль в инфекционной патологии человека.

Хламидии. Таксономическое положение. Ультраструктура элементарных и ретикулярных телец. Методы изучения. Роль в инфекционной патологии человека.

Микоплазмы. Таксономическое положение. Особенности морфологии (полиморфизм). Методы изучения (фазово-контрастная микроскопия). Роль в инфекционной патологии человека.

Микроскопические грибы. Морфология. Основные отличия в организации клетки эукариотов и прокариотов. Морфологические особенности плесневых грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Методы изучения грибов в световом микроскопе. Диморфизм грибов. Роль микроскопических грибов в инфекционной патологии человека.

Микроскопическое изучение живых (нативных) и фиксированных микробов

Устройство и правила ухода за световым биологическим микроскопом. Разрешающая способность микроскопа, пути ее повышения. Метод микроскопии с иммерсионной системой, его техника и значение. Метод фазово-контрастной микроскопии, техника и значение. Метод темнопольной микроскопии, отличие «темного» поля от «затемненного». Методика исследования микроорганизмов в живом состоянии. Электронная микроскопия, принцип метода, особенности приготовления препаратов.

Основные краски и красящие растворы, применяемые в микробиологии. Простые методы окраски. Сложные методы окраски. Подразделение сложных методов окраски. Дифференциальные методы окраски по Граму и Цилю-Нильсену, их сущность, механизм и значение. Методы Романовского-Гимзы, Бурри-Гинса, Ожешко (Ауески), Нейссера, сущность, применение.

Физиология микроорганизмов. Химический состав

Химический состав бактериальной клетки. Роль воды, минеральных солей, белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов в жизнедеятельности бактерий.

Понятие о метаболизме. Подразделение микробов по типу питания в зависимости от источника энергии, углерода и доноров электронов. Способы поступления растворенных питательных веществ в бактериальную клетку. Конструктивный метаболизм. Фазы развития микробной популяции в жидкой питательной среде в стандартных условиях.

Принципы культивирования микроорганизмов. Вещества и условия, необходимые для роста и размножения микробной популяции: оптимальный состав питательных веществ, температурный режим, концентрация водородных ионов (рН), окислительно-восстановительный потенциал, абсолютная стерильность. Факторы роста, их химическая природа.

Культивирование облигатных анаэробов. Способы создания бескислородных условий. Применяемая аппаратура для культивирования облигатных анаэробов.

Особенности культивирования микоплазм и облигатных внутриклеточных паразитов – риккетсий и хламидий.

Питательные среды, их классификация по консистенции, происхождению, целевому назначению. Основные и специальные питательные среды. Среда с повышенной питательной ценностью, элективные, синтетические, применение. Дифференциально-диагностические среды, принцип действия, применение.

Механизмы транспорта питательных веществ в клетку – пассивная диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт.

Методы выделения чистых культур бактерий, их подразделение на методы, основанные на принципе механического разобщения микроорганизмов в питательной среде и методы, основанные на использовании биологических особенностей микроорганизмов.

Метод выделения чистых культур по Дригальскому, его этапы. Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов, этапы.

Ферменты бактерий, их классификация по механизму действия, характеру субстратов и условиям синтеза. Методы дифференциации бактерий по их биохимической активности. Дифференциально-диагностические тест-системы (API-20, Энтеро-тест и др.)

Энергетический метаболизм микроорганизмов. Основные типы биологического окисления субстрата. Типы дыхания микробов: аэробное и анаэробное. Получение энергии путем субстратного фосфорилирования. Брожение, его сущность. Типы брожения: спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое, пропионовокислое. Особенности организации дыхательной цепи аэробов, факультативных анаэробов и облигатных анаэробов.

ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Действие физических факторов на микроорганизмы: высушивание, замораживание, лиофильное высушивание (сублимация); воздействие температуры (температурный режим, температурный оптимум); ионизирующие излучения (УФЛ, электромагнитное излучение α -, β - γ - и рентгеновское излучения); ультразвук. Основные методы стерилизации и их характеристика, применяемая аппаратура. Режимы стерилизации медицинского инструментария, питательных сред. Контроль и подготовка к стерилизации.

Действие химических факторов на микроорганизмы, механизмы их повреждающего действия. Стерилизация и дезинфекция. Основные типы дезинфектантов.

Химиотерапия инфекционных болезней, история открытия и развития. Механизм действия сульфаниламидных препаратов.

Антибиотики

Определение. История открытия антибиотиков, А. Флеминг, З. Ваксман. Классификация антибиотиков по происхождению, спектру и типу антимикробного действия (бактериостатическое и бактерицидное). Представление о молекулярном механизме действия β -лактамных антибиотиков, аминогликозидов, тетрациклинов, левомицетина (хлорамфеникола), макролидов, хинолонов, полиеновых соединений.

Генетические и биохимические механизмы лекарственной устойчивости бактерий, типы устойчивости, пути ее преодоления.

Методы определения чувствительности микробов к антибиотикам *in vitro*: метод бумажных дисков (диффузия в агаре), метод серийных разведений и метод *in vivo* (на животных гнотобионтах).

Побочное действие антибиотиков на макроорганизм: токсическое действие, дисбактериоз, аллергическое, иммунодепрессивное действие.

Принципы рациональной антибиотикотерапии.

Бактериофаги

История открытия. Природа и свойства фагов. Особенности химического состава. Основные морфологические группы фагов. Анатомическое строение Т-четного фага. Вирулентные фаги, стадии взаимодействия с бактериальной клеткой. Умеренные фаги, особенности их взаимодействия с бактериальной клеткой, профаг, явление лизогении, фаговая конверсия. Метод определения титра фага по Грациа. Практическое применение бактериофагов в диагностике: эпидемиологическое маркирование – определение фаговара. Применение бактериофагов в профилактике и терапии инфекционных заболеваний.

Генетика бактерий

Организация генетического аппарата бактерий. Генотип и фенотип бактерий. Модификации у бактерий. *Бактериальная хромосома*, строение, размеры, функции.

Внехромосомные факторы наследственности. *Плазмиды*, их природа и свойства. Подразделение: конъюгативные и неконъюгативные, совместимые и несовместимые, однокопийные и мультিকопийные. Виды плазмид (F, R, Co1, Ent, H1y и др.), их роль в детерминировании патогенных признаков и лекарственной устойчивости бактерий. *Транспозоны*. *Is-последовательности*, умеренные и дефектные фаги, их природа, функции, значение для бактериальных клеток. Геномные острова («острова патогенности»), их природа, функции, значение для патогенных бактерий.

Мутации у бактерий. Характеристика типов мутаций: спонтанные и индуцированные, протяженные и точковые, прямые и обратные, супрессорные мутации. Морфологические, культуральные и биохимические мутанты. Мутагены, их природа, молекулярные механизмы действия. Значение мутаций. Репаративные системы у бактерий, их роль в сохранении стабильности генома.

Генетические рекомбинации у бактерий. Отличие от генетических рекомбинаций у эукариот. Типы генетических рекомбинаций: гомологичная, сайт-специфическая, незаконная.

Трансформация. Сущность. Природа трансформирующего агента. Состояние компетентности реципиентных клеток. Стадии трансформации. Значение трансформации. *Трансдукция*. Сущность. Типы трансдукции: неспецифическая, специфическая, abortивная. Стадии трансдукции. Значение трансдукции. *Конъюгация* у бактерий. Сущность. Донорные и реципиентные клетки, их отличия. Половой фактор F, его свойства. Типы штаммов-доноров: F⁺, Hfr, F', их особенности, результаты скрещивания. Этапы процесса конъюгации. Значение.

Изменчивость и регуляция активности генов прокариот. Теория оперона, амплификация и делеция генов, геномные перестройки, система «*Quorum sensing*», механизм, значение для патогенных микроорганизмов. Фазовые вариации и антигенная изменчивость.

Основы генной инженерии. Цели и задачи. Этапы генно-инженерной технологии: принципы получения рекомбинантных ДНК. Рестриктазы, лигазы, полимеразы и их применение, создания векторов (плазмид, ДНК-фагов, вирусов, космид). Введение рекомбинантных ДНК в клетку; экспрессия и секреция. Препараты, получаемые генно-инженерным способом (вакцины, антигены, диагностикумы, гормоны, интерфероны, иммуномодуляторы и др.) их практическое использование.

Перспективы развития биотехнологии и генной инженерии в XXI веке.

Молекулярно-генетические методы исследования. Молекулярная гибридизация (метод молекулярных зондов). Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Сущность. Практическое применение.

Микроэкология тела человека

Микробиота организма человека. Резидентная и транзиторная микробиота. Микробные биоценозы. Микробиота отдельных экологических ниш: кожи, ротовой полости, зева, дыхательных путей, влагалища, желудочно-кишечного тракта. Микробиота толстого ки-

шечника как главного резервуара микробной флоры макроорганизма, состав и краткая характеристика.

Роль нормальной микробиоты для организма человека: морфокинетическая, детоксикационная, иммуногенная, метаболическая, регуляторная, антиинфекционная. Роль в развитии эндогенных инфекций.

Дисбактериоз. Определение. Факторы, оказывающие влияние на количественный и видовой состав микробиоты организма человека. Степени дисбактериоза. Методы изучения. Принципы профилактики и лечения дисбактериоза. Биотерапевтические препараты, пробиотики, пребиотики, синбиотики, их характеристика.

Гнотобиология как наука. Определение. Применение гнотобиологических методов в микробиологии для подбора индивидуальных схем антимикробной терапии. Гнотобиологические технологии в клинике.

Санитарная микробиология

Предмет, задачи и цели санитарной микробиологии как науки. Почва, вода, воздух, пищевые продукты как объекты исследования санитарной микробиологии и их санитарно-эпидемиологическое значение.

Санитарно-показательные микроорганизмы и требования, предъявляемые к ним. Бактерии р. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и др как основные санитарно-показательные бактерии. Оценка и их значение в гигиенической, эпидемиологической характеристике объектов внешней среды и пищевых продуктов. Условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, наиболее часто встречающиеся в объектах окружающей среды и пищевых продуктах. Общая характеристика энтерококков, стафилококков, протей, клостридий, спорообразующих бацилл, сальмонелл, шигелл.

Микробиота почвы. Загрязнение и самоочищение почвы. Почва, как источник передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Очистка и обеззараживание почвы. Санитарная оценка почвы по микробиологическим показателям: общему количеству сапрофитных микроорганизмов, количеству БГКП, *Clostridium perfringens*, термофильных бактерий, нитрифицирующих, денитрифицирующих бактерий, целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

Санитарно-микробиологическая характеристика воды. Сапрофитные и санитарно-показательные микроорганизмы воды. Зоны микробного загрязнения водоемов (полисапробная, мезосапробная, олигосапробная). Загрязнение водоемов атмосферными и сточными водами. Самоочищение водоемов и роль микроорганизмов. Сточные воды и их очистка. Санитарная оценка воды по микробиологическим показателям: общему микробному числу (ОМЧ), ОКБ.

Санитарно-микробиологическая характеристика воздуха. Микробиота воздуха. Патогенные микроорганизмы воздуха и передача инфекций аэрогенным путем. Очистка и обеззараживание воздуха закрытых помещений. Санитарная оценка воздуха закрытых помещений по микробиологическим показателям: общему микробному числу (ОМЧ), количеству стафилококков и α - и β -гемолитических стрептококков, микроскопических плесневых грибов и дрожжей.

Санитарно-микробиологическая характеристика пищевых продуктов и сырья для их изготовления. Санитарно-микробиологические показатели молочных, мясных, рыбных, хлебобулочных, плодово-овощных натуральных и консервированных пищевых продуктов. Методы санитарно-микробиологического контроля производства пищевых продуктов по следующим показателям: величине общей микробной обсемененности (ОМЧ), количеству мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), наличию санитарно-показательных бактерий группы кишечных палочек (БГКП), присутствию условно-патогенных бактерий (золотистого стафилококка, протей, клостридий, энтерококков, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*), патогенных бактерий (сальмонелл, шигелл), наличию специфических возбудителей микробной порчи пищевых продуктов (микроско-

пических плесневых грибов, дрожжей, гнилостных бактерий). Микробиологические исследования пищевых продуктов проводят в соответствии с ГОСТами, СанПиНами, инструкциями и другими нормативными документами.

Санитарно-микробиологическая характеристика ЛПУ, аптек и лекарственных форм. Цель, периодичность исследований, объекты контроля. Нормативные документы.

КОНТРОЛЬНЫЕ МИКРОПРЕПАРАТЫ

1. Кишечная палочка (окр. по Граму).
2. Стрептобацилла (окр. фуксином осн.).
3. Палочка со спорой (окр. по Граму).
4. Дифтерийная палочка (окр. метиленовой синькой Леффлера).
5. Палочка с капсулой (окр. по Бурри-Гинсу).
6. Стафилококки (окр. генцианвиолетом).
7. Стрептококки (окр. генцианвиолетом).
8. Смесь кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий (окр. по Цилю-Нильсену).
9. Смесь толстостенных и тонкостенных бактерий (окр. по Граму).
10. Дрожжеподобный гриб *Candida albicans* (окр. метиленовой синькой)

Схема описания микропрепарата:

1. Цель приготовления препарата.
2. Способ окраски.
3. Описание микроскопической картины.
4. Функциональная характеристика объекта.

КОНТРОЛЬНЫЕ МАКРОПРЕПАРАТЫ

1. Чашки с:
 - фаготипированием;
 - определением чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков;
 - бактериоциногией;
 - биологическим методом культивирования анаэробов;
 - определением ОКБ воды.
2. Результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений;
3. Среды с ростом анаэробов.
4. Приборы для создания анаэробных условий: анаэроустат, эксикатор.
5. Планшет «Стафитест» и «Энтеротест», среды Гисса для идентификации кишечной палочки.
6. Набор препаратов: химиотерапевтические препараты (антибиотики и др.), бактериофаги, эубиотики.
7. Тест контроля стерильности при автоклавировании (ампула с бензойной кислотой).

Схема описания макропрепарата:

1. Цель приготовления препарата.
2. Методика приготовления препарата.
3. Функциональная характеристика объекта (механизм).
4. Описание и интерпретация результатов.



**ЗАНЯТИЕ №13: ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС
ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ
Методы изучения факторов патогенности**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: 1. Изучить факторы патогенности микроорганизмов.
2. Овладеть умением оценить результат идентификации факторов вирулентности и персистенции микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Определение понятий: «Инфекция», «Инфекционный процесс», «Инфекционная болезнь».
2. Виды симбиоза между микроорганизмами и макроорганизмом. Условно-патогенные микроорганизмы, паразиты – облигатные и факультативные.
3. Патогенность и вирулентность микроорганизмов – определение понятия, критерии патогенности (инфективность, инвазивность и токсигенность). Методы измерения вирулентности.
4. Механизмы транспорта веществ из бактериальной клетки. Системы секреции прокариот, строение и функции. Примеры.
5. Факторы патогенности микроорганизмов, классификация и биологические функции.
6. Факторы адгезии и колонизации. Тропизм микроорганизмов к определенным клеткам и тканям. Адгезины грамположительных и грамотрицательных микробов, строение, функции, примеры.
7. Факторы вирулентности микроорганизмов – ферменты инвазии, функции, примеры и механизмы действия.
8. Микробные эндотоксины, строение, функции и механизм действия. Примеры. Механизм развития эндотоксического шока.
9. Микробные экзотоксины (пороформирующие, контактные и АВ-токсины), классификация, строение, функции и механизмы действия. Примеры.
10. Факторы кратковременной и долговременной защиты микроорганизмов, функции и механизмы действия. Примеры.
11. Генетические детерминанты патогенности – плазмиды, транспозоны, острова патогенности (РАI), определение понятий, признаки и функции. Примеры.
12. Регуляция уровня экспрессии генов вирулентности у прокариот. Примеры.
13. Понятие о системе QS («*Quorum Sensing*») ее роль в размножении и патогенности микроорганизмов.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Заполнить таблицу «Некоторые факторы патогенности микроорганизмов»:

Название фактора	Назначение фактора	Факторы (для внесения в незаполненный столбец таблицы)
1	Фермент защиты	Плазмокоагулаза Лизоцим Лецитовителлаза Антилизоцимная активность Капсула Тейхоевые кислоты Гемолитическая активность (гемолизин) Гиалуронидаза
2	Экзотоксин	
3	Фактор микробного антагонизма	
4а, 4б	Ферменты, усиливающие проницаемость (ферменты агрессии)	
5	Секретируемый фактор персистенции	
6	Иммуносупрессивный фактор (подавляет фагоцитоз)	
7а, 7б, 7в	Фактор адгезии	

		Пили
--	--	------

2. Заполнить таблицу «Ферменты инвазии»:

Фермент	Субстрат	Значение для микроорганизма
Нейраминидаза		
Гиалуронидаза		
Уреаза		
Лецитиназа		
Фибринолизин		

3. Заполнить таблицу «Классификация экзотоксинов»:

Группа токсинов	Механизм действия	Примеры
Пороформирующие		
Контактные токсины		
АВ _x -токсины		
Модулины		

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Изучить адгезивные свойства микроорганизмов.

Задание. Микроскопировать фиксированный препарат, приготовленный по Брилису с целью изучения адгезивных свойств *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli*. Определить средний показатель, индекс адгезии и коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе. Оформить протокол в виде рисунка с обозначениями. Сделать заключение.

Методические указания

На предметное стекло наносят каплю буферного раствора (рН 7,2), в котором суспендируют взвесь изучаемого микроорганизма и отмытых стандартных формализированных эритроцитов человека I (0) группы крови. Препарат на 30 мин помещают во влажную камеру при 37°C, после чего высушивают при той же температуре, фиксируют метанолом, окрашивают метиленовым синим и микроскопируют.

Степень адгезивной активности оценивают с помощью среднего показателя адгезии (СПА), под которым понимается среднее число микроорганизмов, прикрепившихся к одному эритроциту. Адгезивность считается нулевой при СПА от 0 до 1,00, низкой – при СПА от 1,01 до 2,00, средней – от 2,01 до 4,00 и высокой при СПА свыше 4,00.

При оценке адгезивных свойств микроба также используют показатели СПА, К и ИАМ.

К (коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе) – процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микробы.

ИАМ (индекс адгезивности микроорганизма) – среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците, вычисляется по формуле:

$$\text{ИАМ} = \frac{\text{СПА} \cdot 100}{\text{К}}$$

Микроорганизм считается неадгезивным при ИАМ < 1,75, низкоадгезивным – от 1,76 до 2,5, среднеадгезивным – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивным при ИАМ выше 4,0.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями

Расчет СПА, К и ИАМ:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Чему равен СПА, К и ИАМ для данного штамма микроорганизма? 2. Оцените адгезивные свойства исследуемого штамма. 3. За счет чего происходит адгезия исследованного микроорганизма на поверхности эритроцита? 4. Почему использовали эритроциты человека I (0) группы крови? 5. На каком этапе инфекционного процесса работает данный фактор?)

Работа №2

Цель: Изучить факторы вирулентности стафилококков.

Задание. Используя готовые учебные демонстрации изучить факторы вирулентности трех видов стафилококка. Оформить протокол.

Методические указания

Гиалуронидаза выявляется при посеве испытуемой культуры в пробирку с субстратом содержащим гиалуроновую кислоту. Посевы инкубируют в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляют 2-3 капли концентрированной уксусной кислоты. В случае выработки фермента после добавления уксусной кислоты сгусток муцина не образуется, а в контроле при взаимодействии с уксусной кислотой муцин выпадает в осадок.

Плазмокоагулаза выявляется при посеве испытуемой культуры в стерильную цитратную плазму крови. Посевы инкубируют при 37°C в течение 2-5 ч. В случае выработки фермента происходит свертывание плазмы, а в контроле она остается жидкой.

Гемолизин определяют путем посева испытуемой культуры «бляшками» в чашки Петри с кровяным агаром. Чашки инкубируют в термостате при 37°C в течение суток. В положительном случае вокруг «бляшек» образуется зона гемолиза.

Лецитоветиллаза выявляется путем посева испытуемой культуры «бляшками» в чашки Петри с желточно-солевым агаром (содержит лецитин). Чашки инкубируют в термостате при 37°C в течение суток. В положительном случае вокруг «бляшек» образуется желто-оранжевый налет («радужный венчик»).

ПРОТОКОЛ

Цель:

Фактор вирулентности	Принцип выявления	Рисунок	Назначение фактора

Фактор Стафилококк	Гиалуронидаза	Плазмокоагулаза	Гемолизин	Лецитоветиллаза
<i>S. aureus</i>				
<i>S. epidermidis</i>				
<i>S. saprophyticus</i>				

«+» – наличие фактора, «-» – отсутствие фактора

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой из исследованных стафилококков наиболее агрессивный? Почему? 2. На каких этапах инфекционного процесса работают данные факторы? 3. Какие инфекционные заболевания могут вызывать исследуемые стафилококки? Почему?)

Работа №3

Цель: Изучить факторы персистенции микроорганизмов на примере антилизоцимной активности (АЛА).

Задание. Используя готовые учебные демонстрационные посеы по определению АЛА, выявить наличие или отсутствие антилизоцимного признака у трех штаммов золотистого стафилококка. Оформить протокол в виде рисунка с обозначениями. Сделать заключение.

Методические указания

В плотную питательную среду добавляют определенное количество лизоцима, на поверхность засевают в виде бляшек исследуемые бактерии, а через сутки после обработки хлороформом наносят второй слой агара с микрококком (*Micrococcus luteus*). Учет результатов проводят по росту микрококка вокруг культур, инактивировавших лизоцим.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой из исследованных штаммов обладает большим персистентным потенциалом? Почему? 2. Почему в качестве субстрата для определения АЛА используют лизоцим? 3. С какой целью используют микрококк? 4. Каков механизм АЛА микроорганизмов? 5. На каких этапах инфекционного процесса работает данный фактор?)



ЗАНЯТИЕ №14: ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС **Биологический метод диагностики**

- УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ:**
- 1. Выяснить роль макроорганизма и внешней среды в инфекционном процессе.*
 - 2. Изучить методы воспроизведения и оценки экспериментальной инфекции.*
 - 3. Овладеть навыком оценки результатов биологического метода диагностики.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Триада инфекционного процесса.
2. Роль макроорганизма в инфекционном процессе (понятие о восприимчивости, инфекционной чувствительности).
3. Причины и условия, влияющие на восприимчивость и инфекционную чувствительность макроорганизма.
4. Факторы естественной резистентности организма человека.
5. Стадии инфекционной болезни (инкубация, продрома, стадия выраженных клинических проявлений, исход болезни), характеристика этих стадий.
6. Пути распространения микроорганизмов и их токсинов по организму. Определение понятий: бактериемия, сепсис, септический шок, токсемия, токсинемия.
7. Эпидемический процесс. Пути и механизмы передачи возбудителей по Л.В. Громашевскому. Формы инфекционных болезней по их распространению в человеческой популяции (спорадические заболевания, эпидемии, пандемии).
8. Классификация инфекций по этиологическому фактору, происхождению и среде обитания возбудителя.
9. Классификация инфекций по числу инфекционных агентов, по характеру встреч с возбудителем (первичная, вторичная, рецидив, реинфекция, суперинфекция) и наличию симптомокомплекса.
10. Бактерионосительство, его характеристика (транзиторное, резидентное, «злостное») Причины микробного носительства.
11. Биологический метод диагностики, цели и задачи. Способы заражения животных, бактериологическое исследование трупов павших животных.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Цель: Овладеть навыком проведения и оценки результатов биологического метода диагностики.

Задача. В хирургическое отделение поступил больной с ранением голени. В отделяемой ране микроскопическим методом обнаружены грамположительные палочки. Чистую культуру бактериологическим методом выделить не удалось. С целью выделения возбудителя, изучения его вирулентных свойств исследуемый материал был доставлен в лабораторию для проведения биологической пробы. Провести исследование и оценить его результат. Оформить протокол бактериологического исследования по дням. Составить примерную схему дальнейшего исследования (после 3-го дня).

Методические указания

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

1. изучения вирулентности микробов;

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

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

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

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

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

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

- на специальную доску, покрытую ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, помещают труп мышки вверх брюшком и фиксируют за лапки металлическими булавками;

- вскрытие трупа производят стерильными инструментами;

- проводят отсепаровку кожи от подлежащей ткани, вскрывают грудную полость, делают посев крови из сердца на кровяной агар и готовят мазок на предметном стекле;

вскрывают брюшную полость, осматривают органы брюшной полости, проводят посев ткани печени и селезенки (при необходимости других органов и тканей) на кровяной агар и готовят мазки-отпечатки из этих органов на предметном стекле. Микропрепараты окрасить, исследовать на обнаружение капсулы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

1-й день исследования

Дата заражения	Вид животного	Материал для заражения	Микроскопия материала для заражения (рисунок)

2-й день исследования

Дата гибели животного	Дата вскрытия трупа животного	Результат микроскопии (рисунок)		
		крови	печени	селезенки

	го			

3-й день исследования

Результаты посева (рисунки чашек Петри)		
крови	печени	селезенки

Примерная схема дальнейшего исследования:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой метод исследования и принцип диагностики применен? 2. Можно ли назвать данный инфекционный процесс инфекционной болезнью? 3. Вирулентна ли палочка для мышей? 4. Какие факторы вирулентности бактерий Вы обнаружили? 5. От какой формы инфекции по локализации и длительности течения погибла мышь?)



ЗАНЯТИЕ №15: РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА
Использование реакций иммунитета с целью определения антигенов (I принцип диагностики)

- УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ:**
- 1. Изучить механизм взаимодействия антигенов с организмом человека и в системе антиген-антитело.*
 - 2. Изучить принципы и овладеть методами постановки и оценки реакций иммунитета с целью определения неизвестного антигена.*
 - 3. Ознакомиться с принципами изготовления и применения диагностических препаратов.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Антигенная структура бактерий. Классификация бактериальных антигенов по специфичности. Значение для практической медицины.
2. Реакции «антиген – антитело» в диагностике инфекционных заболеваний. Две цели реализации этих реакций. Классификация реакций иммунитета. Стадии и механизм.
3. Реакция простой агглютинации, ингредиенты, механизм, применение.
4. Реакция Ко-агглютинации и латекс-агглютинации, ингредиенты, механизм, применение.
5. Реакции преципитации (кольцепреципитации, микропреципитации, флоккуляции, реакция преципитации в геле, иммуноэлектрофорез), определение, ингредиенты, механизм, применение.
6. Реакции нейтрализации, классификация, ингредиенты, механизм, применение.
7. Реакция иммунофлюоресценции, ингредиенты, механизм, применение.
8. Преципитирующие и антитоксические иммунные сыворотки, получение, применение.
9. Микробные диагностикумы, состав, получение, применение.
10. Агглютинирующие иммунные сыворотки (комплексные и монорецепторные): определение, специфичность, получение, применение.
11. Флюоресцирующие иммунные сыворотки. Получение, применение.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

Цель: Овладеть методикой постановки и учета ориентировочной и развернутой реакции агглютинации для определения типа выделенной культуры.

Задание. Выделена чистая культура бактерий, которая по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам определена как сальмонелла тифа. Проведите сероидентификацию чистой культуры с целью определения вида выделенной сальмонеллы (брюшного тифа или паратифа?). Оформить протокол исследования. Сделать вывод.

Методические указания

1. Ориентировочная реакция агглютинации

На обезжиренное предметное стекло наносится петлей капля иммунной сыворотки. В каплю сыворотки вносят петлей культуру бактерий и перемешивают до легкого помутнения. Стекло слегка покачивают. При положительном результате через 2-5 мин видны мелкие зерна, а позднее – крупные хлопья, смещающиеся на край капли, а жидкость становится прозрачной. В контроль вместо сыворотки вносят физиологический раствор.

2. Развернутая реакция агглютинации

Для постановки реакции готовят ряд последовательных разведений диагностической агглютинирующей сыворотки физиологическим раствором – известные антитела (1:50, 1:100, 1:200 и т.д.) к которым добавляют взвесь чистой культуры бактерий в физиологическом растворе – неизвестный антиген. Учет производится после 24-часового пребывания пробирок в термостате. Реакцию учитывают невооруженным глазом до встряхивания пробирок, а затем при их легком встряхивании пальцем правой руки. В сомнительных случаях используют агглютиноскоп или лупу. Опытные пробирки сравниваются с контролями:

K_{Ag} – равномерное помутнение, исключается спонтанная агглютинация антигена.
 $K_{сыв.}$ – содержимое прозрачное, отсутствие спонтанной агглютинации антител. При таких контролях результаты реакции агглютинации, положительные или отрицательные, будут достоверными.

При положительном результате осадок из хлопьев покрывает все дно пробирки в виде раскрытого зонтика, обращенного куполом вниз. Жидкость над осадком прозрачная. При встряхивании осадок распадается на зерна или хлопья, жидкость остается прозрачной. При отрицательной реакции на дне пробирки образуется небольшой осадок, надосадочная жидкость остается мутной. При встряхивании осадок поднимается вверх в виде «змейки» и равномерно распределяется в жидкость, которая приобретает первоначальную мутность.

Любая реакция иммунитета, поставленная для обнаружения антигена, считается положительной, если она идет до половины и более титра диагностической сыворотки.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результаты ориентировочной реакции агглютинации

Результат	Ингредиенты реакции		
	Комплексная сальмонеллезная сыворотка + чистая культура бактерий	Агглютинирующая сальмонеллезная О-12 сыворотка + чистая культура бактерий	Физиологический раствор + чистая культура бактерий
	Рисунок	Рисунок	Рисунок

Результаты развернутой реакции агглютинации Грубера

Название иммунных сывороток	Разведение сыворотки						
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	$K_{сыв.}$	K_{Ag}
Брюшнотифозная							
Паратифозная А							

Диагностический титр 1:1600, «+» – агглютинация, «-» – отсутствие агглютинации

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. К какой серогруппе относится культура сальмонелл? 2. К какому виду относится выделенная культура сальмонелл? Почему? 3. Как объяснить положительную реакцию агглютинации с обеими сыворотками? 4. С какой целью поставлены контроли? 5. Зачем нужно определять серогруппу и серовар возбудителя? 6. Какой принцип диагностики и метод исследования применен?)

Работа №2

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

Задание. Рассмотреть чашку с поставленной реакцией, выявить токсигенные штаммы. Результаты оформить в виде рисунка с обозначениями. Зарисовать механизм реакции. Сделать вывод.

Методические указания

В чашку Петри с прозрачной питательной средой помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой. Исследуемые культуры засевают в виде бляшек по обе стороны от полоски фильтровальной бумаги. В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру *C. diphtheriae*.

Чашки инкубируют при 37°C в течение 24-48 ч. При диффузии в агаре в зоне эквивалентных концентраций антигена и антител образуются иммунные комплексы, хорошо видимые в проходящем свете в виде мутных полос – «усов» или дуг преципитации. Достоверность результатов подтверждается наличием дуг преципитации с заведомо токсигенной культурой.

Положительная реакция преципитации свидетельствует о токсигенности исследуемой культуры, отрицательная – об ее нетоксигенности.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями

Механизм реакции:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Является ли исследуемая культура дифтерийной палочки токсигенной? Почему? 2. Каков тип дифтерийного токсина (экзотоксин, эндотоксин)? Почему?)

Работа №3

Цель: Ознакомиться с механизмом реакции иммунофлуоресценции (РИФ) для выявления антигена и овладеть методикой учета результатов.

Задача. В бактериологическую лабораторию поступил исследуемый материал (отделяемое карбункула) от больного Р., клинический диагноз: «Сибирская язва. Кожная форма?». Учесть результаты прямой РИФ с отделяемым карбункула и люминесцирующей сибирезвенной сывороткой. Зарисовать механизм реакции. Оформить протокол. Сделать вывод.

Методические указания

Готовят фиксированный препарат-мазок из исследуемого материала, на который наносят люминесцирующую сибирезвенную сыворотку, содержащую антитела к бациллам сибирской язвы (*Bacillus anthracis*), меченые флуоресцентным красителем (ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат). Препарат помещают во влажную камеру, инкубируют 30 мин при 37°C, после чего промывают водой и высушивают. Учет результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа, позволяющего освещать препарат ультрафиолетом, что заставляет флюорохром светиться.

При положительной РИФ – в результате соединения специфических антител, меченых флюорохромом, с антигенами микробных клеток в препарате выявляют светящиеся микроорганизмы, сходные по морфологии, размерам и взаимному расположению с предполагаемым возбудителем.

Бациллы сибирской язвы – это крупные палочки длиной до 7-8 мкм, с отрубленными концами, располагающиеся в патологическом материале короткими цепочками, парами или одиночно.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Результат опыта оформить в виде рисунка с обозначениями

Механизм реакции:

Вывод: *(Ответить на вопросы: 1. Подтвердился ли клинический диагноз? Почему? 2. Можно ли на основании РИФ поставить окончательный диагноз? 3. Какой принцип диагностики и метод исследования применен?)*

Работа №4

Цель: Изучить препараты для специфической диагностики инфекционных болезней.

Задание. Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации, результаты представить в виде схемы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Название (Н):

Классификационное положение (КП):

Действующее начало (ДН):

Состав (С):

Применение (Пр):

Способ применения (СПр):

Вывод:



ЗАНЯТИЕ №16:

РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА

Использование реакций иммунитета с целью определения антител (II принцип диагностики)

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ:

- 1. Изучить механизм взаимодействия антигенов с организмом человека и в системе антиген-антитело.*
- 2. Изучить принципы и овладеть методами постановки и оценки реакции иммунитета с целью определения неизвестных антител.*
- 3. Ознакомиться с принципами изготовления и применения диагностических препаратов.*

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Антитела. Классы иммуноглобулинов, строение и функции.
2. Динамика синтеза антител, механизм переключения синтеза антител одного класса на другой. Первичный и вторичный иммунный ответ.
3. Реакция непрямой и обратной гемагглютинации (РНГА и РОНГА), ингредиенты, механизм, применение.
4. Определение периода болезни с помощью серодиагностики (раздельное определение IgM, IgG).
5. Реакция Кумбса, ингредиенты, механизм, применение.
6. Лизины, бактериолизины. Реакция связывания комплемента, ингредиенты, механизм, применение.
7. Иммуноферментный анализ, ингредиенты, механизм, применение.
8. Эритроцитарные диагностикумы (антительный и антигенный), комплемент, гемолитическая система, иммунные сыворотки меченые ферментами. Получение, применение.
9. Моноклональные антитела: определение, достоинства и получение.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Работа №1

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

Задание. Учесть результаты реакции агглютинации, поставленную с целью определения титра антител в сыворотке больного с клиническим диагнозом «Бруцеллез?». Результаты внести в таблицу. Зарисовать механизм реакции. Сделать вывод.

Методические указания

Для постановки реакции готовят ряд последовательных разведений сыворотки физиологическим раствором (от 1 : 10 до 1 : 160) к которым добавляют бруцеллезный диагностикум.

Реакцию учитывают невооруженным глазом до встряхивания пробирок, а затем при их легком встряхивании пальцем правой руки (*см. предыдущее занятие*).

Титром реакции агглютинации считают максимальное разведение сыворотки с положительным результатом.

Оценка результатов: для подтверждения или опровержения диагноза заболевания, полученный титр реакции агглютинации сопоставляют с диагностическим титром. Например: диагностический титр РА при брюшном тифе равен 1:100 у непривитых детей, 1:200 у непривитых взрослых.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Ингредиенты	Разведения сыворотки					K _{Ag}	K _{сыв.}
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		
Физиологический раствор, мл	1	1	1	1	1	1	-
Сыворотка обследуемого 1:5, мл	1	→	→	→	→	-	1 (1:5)
Бруцеллезный диагностикум, капли	2	2	2	2	2	2	-
Результат (+/-)						1	

Диагностический титр 1:80, «+» – агглютинация, «→» – отсутствие агглютинации

в дез. раствор

Механизм реакции:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой титр антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотке больного? 2. Как объяснить полученные результаты? 3. Что такое титр антител? 4. Что такое диагностический титр? 5. Зачем поставлены контроли сыворотки и антигена? 6. Какой принцип диагностики и метод исследования применен?)

Работа №2

Цель: Познакомиться с механизмом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для определения антител в динамике и методикой учета результатов.

Задание. Учесть результаты РНГА, поставленной с целью определения титра антител в парных сыворотках обследуемых Р. и К. с клиническим диагнозом «Грипп?». Сделать вывод. Зарисовать механизм реакции.

Методические указания

Сыворотки больного разводят физиологическим раствором с 1:40 до 1:640. К каждому разведению сыворотки добавляют эритроцитарный гриппозный диагностикум. Учет результатов проводят после инкубации. При положительном результате осадок из красных хлопьев покрывает все дно лунки планшета или пробирки – «зонтик». При отрицательной реакции на дне лунки планшета или пробирки образуется компактный осадок красного цвета – «пуговка».

ПРОТОКОЛ

Цель:

Разведения сыворотки		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	K _{сыв.}	K _{Ag}
Сыворотка больного, мл		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	–
Физиологический раствор, мл		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Гриппозный диагностикум, капли		2	2	2	2	2	–	2
5%-ная взвесь эритроцитов, капли		–	–	–	–	–	2	–
24 ч инкубации при 37°C								
Обследуемый Р.	3-й день (+/-, рисунок)							
	10-й день (+/-, рисунок)							
Обследуемый К.	3-й день (+/-, рисунок)							

	10-й день (+/-, рисунок)						
--	--------------------------	--	--	--	--	--	--

«+» – гемагглютинация («зонтик»), «-» – отсутствие гемагглютинации («пуговка»)

Механизм реакции:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Что такое титр антител в РНГА? 2. Каковы титры антител у обследуемых на 3-й и 10-й день болезни? Подтвердился ли клинический диагноз? Почему? 3. Зачем исследуют парные сыворотки больного? 4. Как объяснить положительную РНГА с сывороткой обследуемого К.? 4. В чем преимущества РНГА перед РА? 5. Какой принцип диагностики и метод исследования использован?)

Работа №3

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

Задание. Учесть результаты РСК, поставленной с парными сыворотками больного с клиническим диагнозом «Клещевой энцефалит?». Зарисовать механизм реакции. Оформить протокол (таблицы и рисунки).

Методические указания

РСК является сложной двухэтапной серологической реакцией, в которой участвуют две системы антиген + антитело и комплемент. Первая система – основная, содержит антиген, антитело и комплемент. В случае образования комплекса антиген + антитело происходит активация и связывание комплемента, но визуально этого не видно. В качестве индикаторной системы используется вторая система, содержащая в качестве антигена эритроциты барана, а антитела – гемолитическую сыворотку, содержащую антитела к эритроцитам барана, т. е. готовый иммунный комплекс. Если антиген и антитело в первой системе соответствуют друг к другу, то образующийся комплекс активирует и связывает комплемент, поэтому при добавлении индикаторной системы гемолиза не происходит («+» – задержка гемолиза, РСК положительная). Если в первой системе антиген не соответствует антителу, то комплекс не образуется и комплемент остается свободным, активируясь и связываясь второй системой, вызывая при этом гемолиз эритроцитов («-» – гемолиз «лаковая кровь», РСК отрицательная).

Результаты РСК предварительно учитывают после извлечения пробирок из термостата и окончательно – спустя 15-18 ч после пребывания их при комнатной температуре или в холодильнике.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Схема постановки РСК

Ингредиенты, мл	Опыт	К _{сыв.}	К _{Ag}
1. Исследуемая сыворотка (в соответствующем разведении)	0,5	0,5	–
2. Диагностикум (антиген в рабочей дозе)	0,5	–	0,5
3. Комплемент в рабочей дозе	0,25	0,25	0,25
4. Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0
5. Физиологический раствор	–	0,5	0,5

Результаты РСК

Компоненты/ разведение сыворотки больного	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	К _{сыв.}	К _{Ag}
---	-----	------	------	------	------	-------------------	-----------------

Диагностикум клещевого энцефалита							
Результат на 5-й день (+/-, рисунок)							
Результат на 15-й день (+/-, рисунок)							

«+» – задержка гемолиза, «-» – гемолиз («лаковая кровь»)

Механизм реакции:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой принцип диагностики и метод исследования применен? 2. Что такое титр антител в РСК? 3. Подтвердился ли клинический диагноз? Почему? 4. Что означает комплемент в рабочей дозе? 5. Как получают ингредиенты РСК (гемолитическую систему, комплемент, диагностикум)?

Работа №4

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

Задача. В анонимный кабинет обратились граждане Я., 30 лет и М., 25 лет с просьбой проверить их на инфицирование ВИЧ. Проведено исследование с применением ИФА. Учесть результаты. Зарисовать механизм реакции. Оформить протокол. Сделать вывод.

Методические указания

Для определения специфических антител используют специальные панели из полистирола, в лунках которых фиксирован инактивированный вирус или его антигены. В лунки вносят сыворотки обследуемых и инкубируют. При этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к нему. Не прикрепившиеся антитела удаляют промыванием буферным раствором. Затем в лунки вносят антитела против иммуноглобулинов (антител) человека, меченые пероксидазой хрена. Если в исследуемой сыворотке присутствовали искомые антитела, то на данном этапе они, выступая в качестве антигена, прореагируют с мечеными античеловеческими антителами. Добавление после отмывки субстрата (пероксида водорода) и индикатора (хромоген) позволяет учесть результаты реакции. Образование продукта, окрашенного в желто-коричневый цвет, оценивается как положительная реакция.

Критерием достоверности являются контроли: с сывороткой, заведомо содержащей антиВИЧ – ИФА «+» и сывороткой, заведомо не содержащей анти-ВИЧ – ИФА «-».

ПРОТОКОЛ

Цель:

Обследуемые	Результаты ИФА
Я.	Рис. с обозначениями
М.	

Механизм реакции:

Вывод: (Ответить на вопросы: 1. Какой принцип диагностики и метод исследования применен? 2. Перечислите основные ингредиенты ИФА для выявления антител. 3. Как выглядит лунка с отрицательной контрольной сывороткой? Почему? 4. Можно ли на основании ИФА поставить окончательный диагноз?)

Работа №5

Цель: Изучить препараты для специфической диагностики инфекционных болезней.

Задание. Рассмотреть ампулы с препаратами, изучить аннотации, результаты представить в виде схемы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Название (Н):

Классификационное положение (КП):

Действующее начало (ДН):

Состав (С):

Применение (Пр):

Способ применения (СПр):

Вывод:



**ЗАНЯТИЕ №17: ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ
ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Вакцины. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *1. Изучить особенности противобактериального, анти-токсического, противовирусного и противогрибкового иммунитета.*
2. Изучить основные группы препаратов, используемых для специфической профилактики и терапии инфекционных болезней.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Вакцины. Виды. Получение, показания для применения.
2. Сыворотки и иммуноглобулины лечебные, профилактические. Получение, показания для применения.
3. Календарный план прививок.
4. Особенности противобактериального иммунитета. Антитоксический иммунитет.
5. Особенности противовирусного иммунитета.
6. Особенности противогрибкового иммунитета.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

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

Задание. Рассмотреть ампулы с препаратами и изучить аннотации, результаты представить в виде схемы.

ПРОТОКОЛ

Цель:

Название (Н):

Классификационное положение (КП):

Действующее начало (ДН):

Состав (С):

Применение (Пр):

Способ применения (СПр):

Вывод:



**ЗАНЯТИЕ №18: КОЛЛОКВИУМ
ИНФЕКТОЛОГИЯ
ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ**

УЧЕБНАЯ ЦЕЛЬ: *Проверка знаний и умений студентов по разделу инфектологии и инфекционной иммунологии.*

ПРОГРАММА КОЛЛОКВИУМА

Учение об инфекции

Определение понятия «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь» (взаимодействие «паразит-хозяин»). Условия, необходимые для развития инфекционного процесса. Стадии (фазы) инфекционного процесса (адсорбция и адгезия, колонизация, инвазия, продукция токсических субстанций). Инфекционная болезнь и условия ее возникновения.

Формы взаимодействия микро- и макроорганизмов: мутуализм, комменсализм, паразитизм. Паразитизм: факультативный, облигатный, внеклеточный и внутриклеточный паразитизм. Особенности паразитизма бактерий, хламидий, риккетсий, микоплазм, вирусов и грибов.

Роль микроорганизмов в инфекционном процессе. Патогенность микроорганизмов, определение. Облигатно-патогенные, условно-патогенные, непатогенные микроорганизмы.

Основные факторы патогенности – факторы адгезии и колонизации, вирулентности (инвазии, антифагоцитарные и токсические продукты). Белковые токсины (экзотоксины), их отличия от эндотоксинов; классификации по степени их связи с микробной клеткой; по строению; по механизму их действия (мембранотоксины, цитотоксины, токсины - функциональные блокаторы, токсины – эксфолиатины); в зависимости от поражаемых мишеней (энтеротоксины, нейротоксины, дермонекротоксины, гемолизины, лейкоцидины, суперантигены); основные свойства и механизмы действия. Эндотоксины бактерий, химический состав и свойства. Вирулентность микроорганизмов, определение. Единицы определения вирулентности (Dcl, Dlm, Dl₅₀ и др.). Факторы защиты микроорганизмов – определение понятия и примеры. Секреторные факторы персистенции на примере (АЛА, АИА, АЛФА и др.), методы выявления. Биопленки, определение понятия, строение, стадии образования и биологические функции.

Механизмы транспорта веществ из бактериальной клетки. Системы секреции прокариот I-V типы, sec-зависимые и sec-независимые, строение и функции. Роль в патогенности.

Генетические основы патогенности бактерий. Плазмиды, острова патогенности, транспозоны. Регуляция экспрессии факторов вирулентности, механизм на конкретных примерах. Чувство кворума у бактерий, роль в размножении и вирулентности, примеры сигнальных молекул, механизм действия. Способы ослабления вирулентности бактерий. Практическое значение получения аттенуированных (ослабленных) штаммов бактерий.

Понятие о патогенезе инфекционных болезней. Формы инфекции. Источники инфекции. Понятие об антропонозных, зоонозных и сапронозных инфекциях. Входные ворота инфекций. Механизмы передачи инфекции: воздушно-капельный и воздушно-пылевой, контактно-бытовой, половой, фекально-оральный, трансмиссивный, ятрогенный. Пути распространения микробов в организме (местная, очаговая, генерализованная, антигенемия, бактериемия, вирусемия, токсинемия, септицемия, септикопиемия). Динамика развития инфекционной болезни, периоды (инкубационный, продромальный, разгар, реконвалесценция).

Формы инфекции: экзогенная и эндогенная; моноинфекция и смешанная (микстинфекция); острая и хроническая, персистирующая, медленная инфекции; типичная и атипичная; манифестная и бессимптомная; рецидив, реинфекция, суперинфекция, вторич-

ная инфекция; микробоносительство. Виды микробоносительства, механизмы формирования.

Инфекционная иммунология

Определение понятия «иммунитет». Классификация различных форм иммунитета по происхождению, направленности и механизму (приобретенный, активный и пассивный, искусственный, антибактериальный, антитоксический, антивирусный, стерильный и нестерильный, гуморальный и клеточный, местный и общий). Факторы естественной резистентности организма человека. Природа и механизмы их защитного действия.

Антигены бактериальной клетки: О-, Vi-, K-, H- антигены, их локализация и химический состав. Протективные антигены. Антигенные свойства токсинов, анатоксинов, бактериальных адгезинов. Суперантигены. Антигены вирусов. Антигенная мимикрия.

Антитела. Определение. Основные классы иммуноглобулинов, их структурные и функциональные особенности. Строение молекул иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Строение активного центра и валентность антител. Механизм взаимодействия антигена с антителом. Авидность и аффинность антител. Аутоантитела.

Особенности иммунитета при различных инфекциях (противовирусный, противобактериальный, противогрибковый, противопротозойный). Противоопухолевый иммунитет.

Общая характеристика реакций «антиген-антитело» (серологических реакций): специфичность, чувствительность, двухфазность, обратимость, оптимальные соотношения ингредиентов, качественный и количественный характер. Механизмы реакций. Практическое использование: идентификация антигена, диагностическое выявление антител.

Реакция агглютинации. Ингредиенты, механизм, методы постановки (на стекле и развернутой). Понятие о титре реакции. О- и H-агглютинация. Практическое применение.

Групповая агглютинация. Метод адсорбции агглютининов по Каstellани, практическое применение.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА). Ее сущность, ингредиенты. Понятие о титре. Практическое применение.

Реакции, основанные на феномене агглютинации: Реакция нейтрализации антител (РНАТ), обратная непрямая гемагглютинация (РОНГА), реакция торможения гемаллютинации (РТГА), латекс-агглютинация, коагглютинация. Сущность. Применяемые реактивы, практическое применение.

Реакция преципитации. Ингредиенты, механизм, методы постановки: кольцепреципитация, реакция флоккуляции, преципитация в геле (метод двойной диффузии по Оухтерлони, иммуноэлектрофорез). Практическое применение.

Сходство и различия между реакциями агглютинации и преципитации.

Реакции иммунного лизиса (бактериолиз, гемолиз). Ингредиенты, механизм, методы постановки, практическое применение.

Реакция связывания комплемента (РСК). Системы, участвующие в реакции, ингредиенты каждой системы. Механизм реакции. Методика постановки: подготовительная работа по титрованию комплемента и др. ингредиентов реакции; постановка основного опыта. Понятие о титре. Практическое применение.

Реакция нейтрализации токсина антитоксином. Ингредиенты, механизм. Методы постановки (реакция флоккуляции, реакция нейтрализации в геле, РНАТ, РОНГА, реакция нейтрализации *in vivo*). Их целевое назначение.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Ингредиенты, механизм прямой и непрямой РИФ. Значение для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Ингредиенты, механизм ИФА: прямой, непрямой, конкурентный. Методы постановки. Значение для ускоренной диагностики инфекционных заболеваний.

Иммуноблоттинг. Сущность. Практическое применение.

Диагностические биопрепараты для постановки серологических реакций. Диагностические сыворотки: агглютинирующие [неадсорбированные (видовые) и адсорбированные], преципитирующие, гемолитические, антитоксические, противовирусные, люминисцирующие, конъюгаты и др. Принципы получения, применение.

Моноклональные антитела (МКА). Гибридомы и их использование для получения МКА. Отличие моноклональных антител от адсорбированных диагностических сывороток. Применение.

Диагностикумы: микробные, эритроцитарные, латекс-диагностикумы. Состав, принципы получения. Применение.

Аллергены. Состав. Практическое применение для выявления инфекционной аллергии.

Вакцины. Разработка Л.Пастером метода получения живых вакцин. Характеристика современных вакцинных препаратов. Основные требования, предъявляемые к вакцинам. Живые вакцины: основные методы получения аттенуированных штаммов, характеристика живых вакцин. Инактивированные корпускулярные (цельноклеточные, цельновирионные) вакцины, принципы получения, характеристика. Субклеточные (субвирионные), молекулярные, рекомбинантные, синтетические вакцины, характеристика, принципы получения. Анатоксины, принципы получения. Комбинированные и ассоциированные вакцины. Адъюванты, их применение. Лечебные вакцины, аутовакцины, вакциноterapia Перспективы развития вакцинологии.

Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины. Характеристика антитоксических, противовирусных и антибактериальных иммунных сывороток и иммуноглобулинов. Гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины. Принципы получения, очистки, титрования, контроля сывороток и иммуноглобулинов. Сущность их защитного действия.

Осложнения, возникающие после введения вакцин, иммунных сывороток и иммуноглобулинов, способы их предупреждения.

КОНТРОЛЬНЫЕ МАКРОПРЕПАРАТЫ

1. Чашка с желточно-солевым агаром и ростом золотистого стафилококка.
2. Чашка с кровяным агаром и ростом гемолитических бактерий.
3. Чашка с определением АЛА микроорганизмов.
4. Реакция агглютинации для определения антител.
5. Реакция преципитации для определения токсигенности дифтерийных бактерий.
6. РСК для определения титра антител.
7. Планшет с результатами РПГА в серологическом методе.
8. Планшет с результатами ИФА в серологическом методе.
9. Набор препаратов для специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины).
10. Набор препаратов для специфической диагностики инфекционных заболеваний (диагностикумы, сыворотки, аллергены).

Схема описания макропрепарата:

1. Цель приготовления препарата.
2. Методика приготовления препарата.
3. Функциональная характеристика объекта (механизм).
4. Описание и интерпретация результатов.



БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Обязательная

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А.Воробьева. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006, – 691 с.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. / Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 636 с.
3. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 767 с.
4. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – 3-е изд., стереотип. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 768 с.
5. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 736 с.
6. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.
7. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учеб. пособие / Л.Б. Борисов, Б.Н. Козьмин-Соколов, И.С. Фрейдлин – М.: Медицина, 1993. – 240 с.

Дополнительная

1. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии» /Под редакцией академика РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002 – 340 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред.акад. РАМН В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
3. Букринская, А.Г. Вирусология / А.Г. Букринская. – М.: Медицина, 1986. – 336 с.

При составлении методического пособия была использована следующая литература:

1. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии» /Под редакцией академика РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002 – 340 с.
2. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учеб. пособие. / Л.Б. Борисов, Б.Н. Козьмин-Соколов, И.С. Фрейдлин. – М.: Медицина, 1993. – 240 с.
3. Методические рекомендации по молекулярно-генетическим основам микробиологии для студентов химико-технологического факультета. / сост. Н.П. Елинов, Н.А. Заикина, В.Г. Калошин и др. – Ленинград: Издательство Ленинградский химико-фармацевтический институт, 1982 – 436 с.
4. Методические указания по медицинской микробиологии для самостоятельной подготовки студентов лечебного, педиатрического, медико-профилактического факультетов. Ч. 1, Ч. 2 / сост. Л.А. Крафт, Л.Ю. Бутакова, В.А. Юрова и др. – Барнаул: Издательство Алтайский государственный медицинский университет, 2009. – 132 с.
5. Общая микробиология Часть 2. Микрофлора человека. Дисбактериоз. Инфекция. Факторы патогенности микроорганизмов. Врожденный иммунитет. / сост. Н.С. Горячкина, Е.Д. Радакова, Л.И. Кафарская и др. – Москва: Издательство Российский государственный медицинский университет, 2009. – 52 с.

МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ

Ч.1 Общая микробиология

Инфектология

Инфекционная иммунология

Практикум

Составители:

Вадим Вячеславович ЛЕОНОВ
Любовь Николаевна ДЕРЕВЯНКО
Татьяна Николаевна СОКОЛОВА

Редактор
Технический редактор
Корректор
Оператор верстки
Дизайн

Подписано в печать 07.06.13. Формат 60×84 1/16
Гарнитура Таймс. Бумага офсетная. Усл. печ. л.3,26. Тираж 100 экз. Заказ
628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, д. 40

Информационно-издательский центр ХМГМА
628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, д. 40

