

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный Федеральный Университет им. М.К. Аммосова»  
Медицинский институт  
Кафедра гистологии и микробиологии

# **РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ**

## **По общей микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Студент** \_\_\_\_\_

**Группа №** \_\_\_\_\_ **Факультет** \_\_\_\_\_

**Преподаватель** \_\_\_\_\_

**УДК**  
**ББК**

Утверждено учебно-методическим советом университета

**Авторы-составители**

Я.А.Ахременко, к.м.н., доцент кафедры гистологии и микробиологии МИ СВФУ

Л.А.Тарасова, к.м.н., доцент кафедры гистологии и микробиологии МИ СВФУ

Т.П. Сивцева, к.м.н., доцент кафедры гистологии и микробиологии МИ СВФУ

К.В. Комзин, старший преподаватель кафедры гистологии и микробиологии МИ СВФУ

А.Е. Моисеева, ассистент кафедры гистологии и микробиологии МИ СВФУ

**Рецензенты**

А.Е. Гончаров, д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова

В.И. Иларова, заведующая Учебно-научной микробиологической лабораторией Клиники МИ СВФУ

Рабочая тетрадь по общей микробиологии и вирусологии: учебное пособие для студентов специальности «Медико-профилактическое дело» -Якутск., 2019

*Рабочая тетрадь является новым видом учебно-методического пособия. Пособие содержит необходимые материалы по изучению морфологии, физиологии, экологии и генетики микроорганизмов, а также по санитарной микробиологии и иммунологии инфекционного процесса. Рабочая тетрадь составлена в соответствии с программой по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии для медицинских вузов. Часть заданий дана в виде немых таблиц и схем, позволяющих обеспечить программированный контроль за усвоением материала. Кроме того, рабочую тетрадь студенты могут использовать в качестве терминологического словаря. В пособие включены вопросы самоконтроля. Рабочая тетрадь предназначена для студентов, обучающихся по специальности «Медико-профилактическое дело».*

## **План практических занятий по разделу общая микробиология и вирусология**

- 1) Введение в микробиологию. Принципы классификации микроорганизмов. Структура и функции прокариотической клетки.
- 2) Морфология бактерий. Строение бактериальной клетки. Методы окраски бактерий.
- 3) Морфология отдельных групп прокариот. Методы микроскопии, применяемые в микробиологии.
- 4) Морфология микроскопических грибов, простейших.
- 5) Морфология и биология вирусов.
- 6) **Зачетное занятие по разделу «Морфология микробов. Микроскопический метод диагностики»**
- 7) Физиология микробов. Питательные среды. Культивирование бактерий аэробов. Методы выделения чистых культур бактерий.
- 8) Выделение чистых культур бактерий (продолжение). Культивирование анаэробных микроорганизмов. Энергетический метаболизм микроорганизмов.
- 9) Антибиотики.
- 10) Асептика и антисептика.
- 11) Генетика микроорганизмов
- 12) **Зачетное занятие по разделу «Физиология и генетика микроорганизмов»**
- 13) Экология микроорганизмов. Нормальная микрофлора организма человека. Дисбактериоз.
- 14) Патогенность. Вирулентность.
- 15) Инфекционный и эпидемический процесс.
- 16) **Зачетное занятие по разделу «Экология микроорганизмов»**

## **Правила для студентов, работающих на курсе микробиологии, вирусологии, иммунологии.**

Работа на курсе микробиологии, вирусологии и иммунологии и в бактериологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, так как исследования проводятся с использованием культур патогенных микроорганизмов и заразного материала от больных и экспериментальных животных. Соблюдение этих правил необходимо для обеспечения, как личной безопасности, так и безопасности окружающих.

1. Студенты должны приходить на кафедру в халатах, шапочках, иметь сменную обувь. Категорически запрещается работать в учебных лабораториях без халатов и шапочек, выпускать из-под спецодежды волосы, воротнички, курить, принимать напитки и пищу, пользоваться мобильной связью.
2. Каждый студент имеет постоянное рабочее место в лаборатории. Из личных вещей студента на рабочем месте допускается наличие только рабочей тетради, в которой делаются записи и зарисовки. Ничего лишнего (в том числе учебников и других книг) на рабочем столе не должно быть.
3. С собой нужно иметь: тетрадь для ведения дневника работы, тетрадь для тестовых заданий, цветные карандаши.
4. До начала работы необходимо проверить рабочее место, состояние микроскопа, о недостатках сообщить дежурным студентам и преподавателю.
5. Работать аккуратно, экономно расходовать материалы и реактивы, по окончании работы гасить спиртовку. Необходимо проявлять максимальное внимание ко всем этапам работы с культурами и зараженными микробами животными. Во время проведения посевов и приготовления мазков не разговаривать и не ходить по лаборатории. Все пробирки и чашки с посевами должны быть промаркированы. В случае загрязнения заразным материалом поверхности стола и других предметов, кожи рук и лица - обработать дезинфицирующим раствором и немедленно сообщить о случившемся преподавателю. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны необходимо помещать в сосуды с дезинфицирующим раствором (пипетки – при полном погружении). Пинцеты, бактериальные петли, иглы после работы с исследуемым материалом необходимо прожигать в пламени горелки.
6. В конце занятия привести в порядок рабочее место. Все предметы на рабочем столе разместить в том порядке, в каком они были до работы. Отработанный материал (культуры, микробный материал и др.) поместить в бикс для обеззараживания путем автоклавирования. Микроскоп привести в порядок и поместить в шкаф. Вылить в специальную емкость воду из лотков, обработать при необходимости руки дезинфицирующим раствором и вымыть их с мылом.

С правилами техники безопасности  
ознакомлен и обязуюсь выполнять

\_\_\_\_\_

Инструктаж провел

\_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г.

**Тема: Введение в микробиологию. Принципы классификации микроорганизмов. Структура и функции прокариотической клетки.**

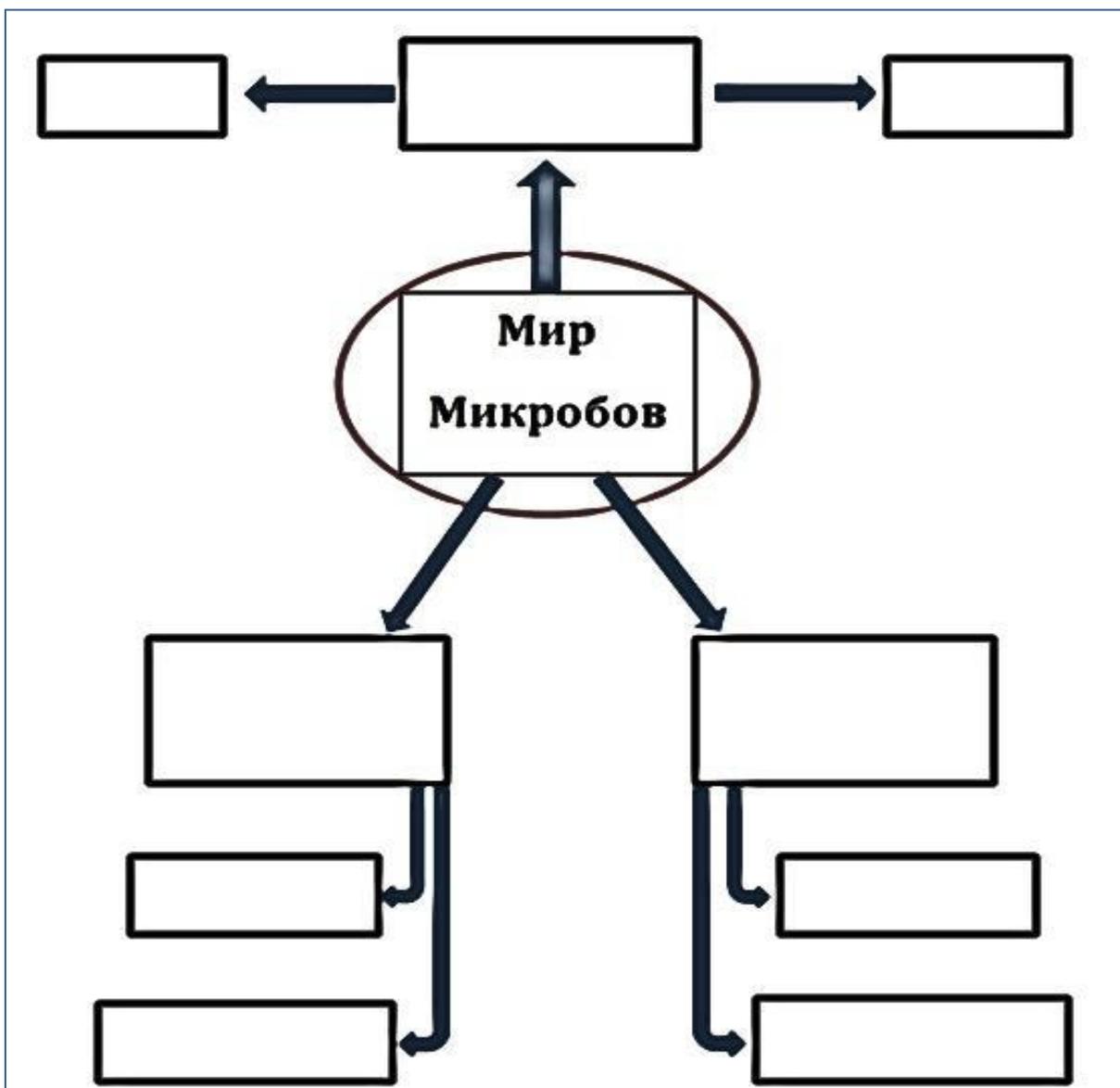
**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Ознакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории.
2. Знать устройство светового биологического микроскопа.
3. Научиться работать с иммерсионной системой микроскопа.
4. Ознакомиться с правилами обращения с культурами микробов.
5. Научиться готовить мазки, окрашивать их простым методом, микроскопировать.

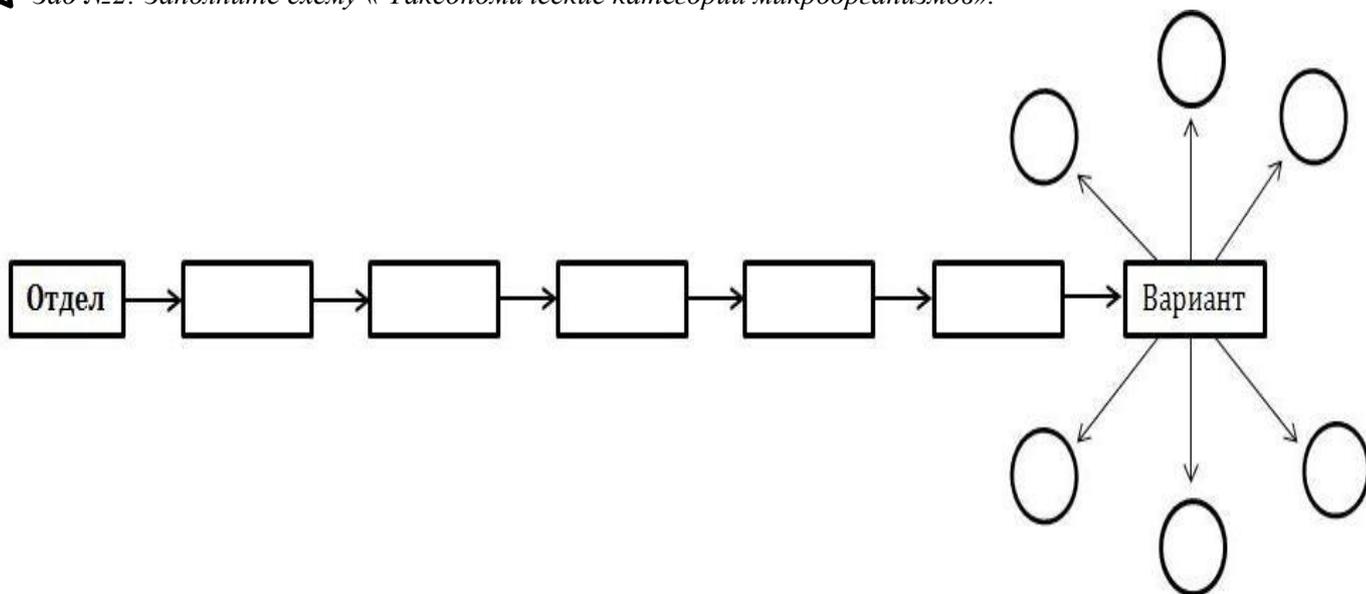
**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Международная классификация и таксономия микроорганизмов.
2. Основные морфологические формы бактерий.

☆ Зад. №1: Заполните схему «Основные группы патогенных микроорганизмов».

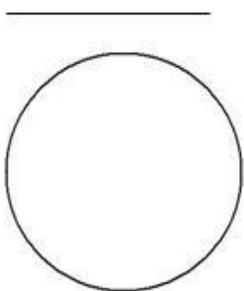


☆ Зад №2: Заполните схему « Таксономические категории микроорганизмов».

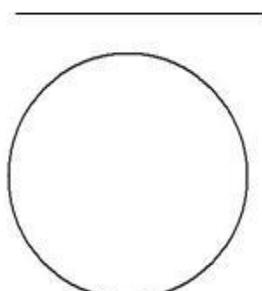


☆ Зад.3: Зарисуйте основные морфологические формы бактерий

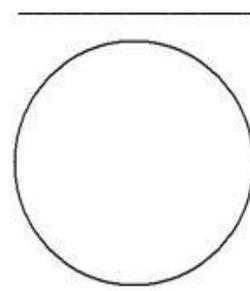
### Изучение морфологии микроорганизмов



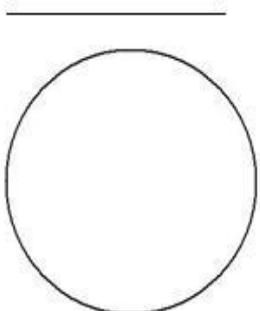
Окраска \_\_\_\_\_



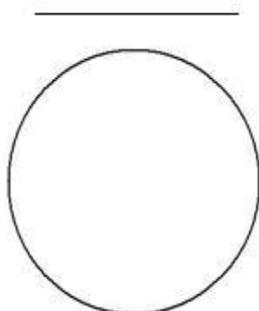
Окраска \_\_\_\_\_



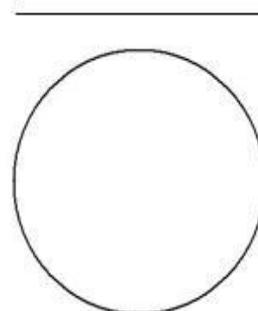
Окраска \_\_\_\_\_



Окраска \_\_\_\_\_

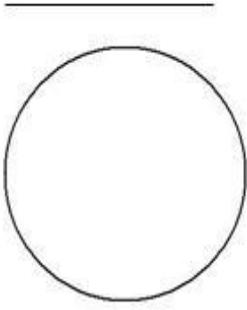


Окраска \_\_\_\_\_

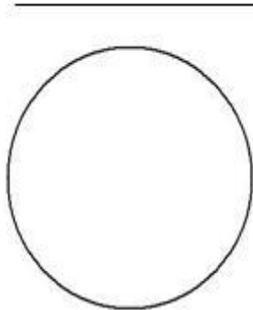


Окраска \_\_\_\_\_

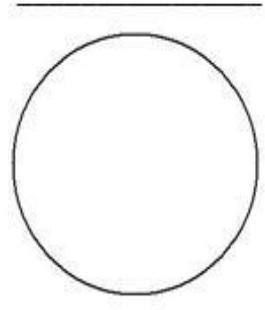
## Изучение морфологии микроорганизмов



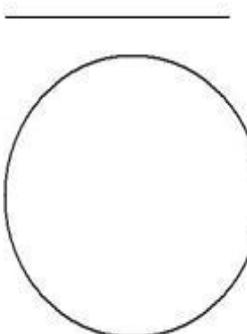
Окраска \_\_\_\_\_



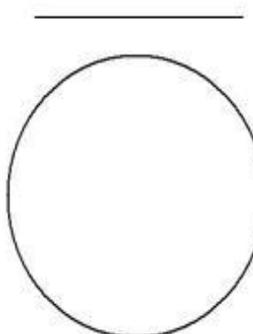
Окраска \_\_\_\_\_



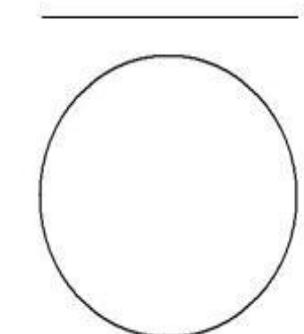
Окраска \_\_\_\_\_



Окраска \_\_\_\_\_



Окраска \_\_\_\_\_

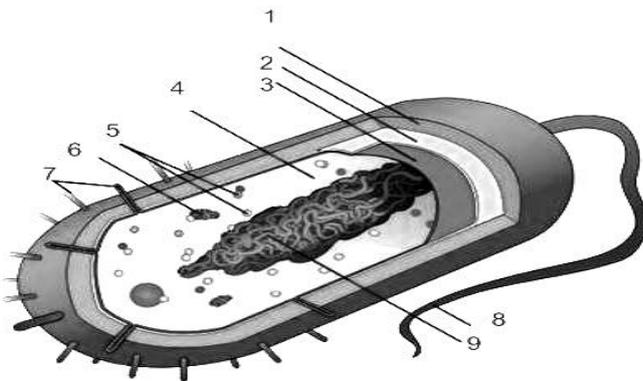


Окраска \_\_\_\_\_



**CPC**

1. Назовите структуры бактериальной клетки.



2. Заполните таблицу «Ультраструктура бактериальной клетки».

Наименование анатомических структур	Подразделение (если имеется)	Химический состав	Строение	Функции, значение	Методы выявления
<b>Обязательные структуры</b>					
<i>Цитоплазматическая мембрана</i>					
<i>Мезосомы</i>					
<i>Нуклеоид</i>					

<i><b>Рибосомы</b></i>					
<i><b>Клеточная стенка</b></i>					
<i><b>Цитоплазма</b></i>					

**Необязательные структуры**

<i>Эндоспоры</i>					
<i>Капсула</i>					
<i>Ворсинки (фимбрии, пили)</i>					
<i>Жгутики</i>					
<b>Включения</b>					

## Словарь

Дайте определение терминам:

Микробиология-

Микроорганизм-

Таксономия-

Род-

Вид-

Штамм-

Морфология-

Занятие № 2

Дата \_\_\_\_\_

## **Тема: Морфология бактерий. Строение бактериальной клетки. Методы окраски бактерий.**

### **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Освоить теоретический материал по теме занятия. Знать сущность и назначение сложных методов окраски: по Граму, по Бурри-Гинсу, Нейссеру, Ожешко, Циль-Нильсену. Иметь представление о различных видах микроскопии.

### **ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Структура бактериальной клетки (обязательные и необязательные структурные компоненты).
2. Методы для изучения величины и структуры бактериальной клетки.
3. Цитоплазматическая мембрана, строение, функция.
4. Клеточная стенка бактерий. Различия в строении клеточной стенки Грам+ и Грам- бактерий. Функции клеточной стенки.
5. Капсула бактерий, ее роль, методы выявления.
6. Споры, их значение, стадии образования, условия для спорообразования, способы выявления.
7. Жгутики. Методы изучения подвижности.
8. Нуклеоид, функция, методы выявления нуклеоида.
9. Этапы приготовления мазков из агаровых и бульонных культур.
10. Простые методы окрашивания микроорганизмов.
11. Принципы световой микроскопии. Иммерсионный объектив, его преимущества.
12. Правила пользования микроскопом.
13. Сложные методы окраски (по Граму, Нейссеру, Бурри-Гинсу, Ожешко, Циль-Нильсену).
14. Принципы фазово-контрастной, темнопольной, люминесцентной микроскопии.



### 1. Приготовление мазка из агаровой культуры:

1. На середину обезжиренного предметного стекла нанести петлей каплю физиологического раствора.
2. Внести стерильной петлей в каплю физиологического раствора агаровую культуру.
3. Равномерно распределить культуру на предметном стекле в виде круга в диаметре 1-1,5 см.
4. Простерилизовать петлю в пламени.
5. Высушить мазок при комнатной температуре или для ускорения над пламенем спиртовки.
6. Зафиксировать мазок в пламени.
7. Окрасить мазок.
8. Промыть водой.
9. Высушить мазок.
10. Нанести на мазок каплю иммерсионного масла.
11. Микроскопия мазка.

### 2. Приготовление мазка из бульонной культуры:

1. На середину обезжиренного предметного стекла нанести стерильной петлей или стерильной пастеровской пипеткой каплю бульонной культуры и равномерно распределить в виде мазка диаметром 1-1.5 см. Далее смотри выше пункты 4-11.

### Правила работы с иммерсионной системой микроскопа

1. Поднять конденсор до уровня предметного столика и открыть ирис-диафрагму.
2. Глядя сбоку в верхнюю линзу конденсора и вращая зеркало, найти изображение источника света.
3. Установить иммерсионный объектив.
4. На предметный столик поместить препарат с каплей иммерсионного масла и закрепить препарат клеммами.
5. Под контролем глаза макровинтом опустить тубус до соприкосновения линзы объектива с каплей масла на препарате. Очень осторожно погрузить под контролем глаза линзу в масло, не доводя до соприкосновения со стеклом.
6. Глядя в окуляр, макровинтом медленно поднимать тубус до появления изображения в поле зрения.
7. Вращая макровинт не более, чем на  $\frac{1}{2}$  оборота, добиться четкого изображения.
8. После просмотра препарата макровинтом поднять тубус, снять препарат, протереть фильтровальной бумагой фронтальную линзу иммерсионного объектива, салфетку положить на предметный столик.
9. Перевести на малое увеличение и опустить тубус до упора.



### Методы окраски бактерий.

Различают простые и сложные методы окраски.

**Простой метод окраски.** Является одноэтапным и заключается в окраске одним красителем. В препаратах, окрашенных простым методом можно получить представление о форме и размерах микробных клеток, их расположение в мазке, но не о детальном строении клеток.

**Сложные методы.** Сложные методы являются многоэтапными, приготовленный мазок последовательно обрабатывают различными красителями, протравами, дифференцирующими веществами. Сложные методы подразделяются на:

-*дифференциальные*, позволяющие отличить один вид или группу бактерий от других( метод Грама, метод Циля-Нильсена);

-*предназначенные для выявления различных морфологических структур бактериальной клетки.* Например: споры окрашивают методом Ожешки, включения волютина – методом Нейссера, капсулу методом Бурри-Гинса и пр.

**Протравы** - физические и химические факторы, обладающие свойствами повышать окрашиваемость микробов.

**Дифференцирующие вещества** избирательно обесцвечивают одни виды или структуры бактериальных клеток и не обесцвечивают другие.

Способы фиксации: обычно применяют фиксацию в пламени горелки (фиксация жаром): предметное стекло в положении мазком вверх 3 раза проводят через пламя горелки. Применяют также различные жидкие фиксаторы, оказывающие более щадящее действие, например этиловый и метиловый спирт, ацетон, формалин и др. Существуют также жидкие фиксаторы, представляющие собой смесь нескольких веществ, например: жидкость Карнуа. Выбор способа фиксации зависит от окрашиваемого объекта и метода окраски.

☆ **Задание №1:** Заполните таблицу «Метод Грама».

Цель применения	
Применяемые реактивы	<i>Красители:</i> 1. 2.  <i>Протрава:</i> 1. <i>Дифф. вещество:</i> 1.
Способ фиксации	
Этапы окраски	1.  2.  3.  4.  5.  6.
Сущность метода	



*Задание №2: Зарисуйте строение клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий.*



☆ Зад.№3: Заполните таблицу «Особенности строения клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот».

Особенности клеточной стенки	Грамположительные прокариоты	Грамотрицательные прокариоты
толщина		
количество слоев		
содержание пептидогликана		
тейхоевые кислоты		
ЛПС		



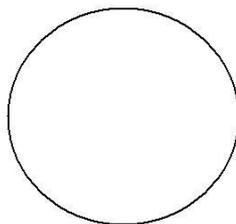
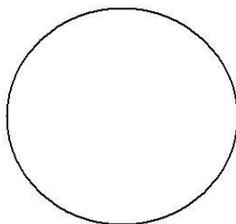
**Лабораторная работа №1**  
**Окраска по методу Грама чистых культур бактерий (*E.coli*, *S.aureus*)**

Цель опыта: \_\_\_\_\_

Материал: \_\_\_\_\_

Ход опыта: \_\_\_\_\_

Результат:



Окраска \_\_\_\_\_

Окраска \_\_\_\_\_

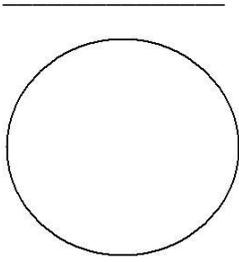
Вывод: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

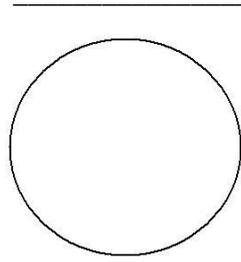


Самостоятельная работа студента на практическом занятии

Изучение спор бактерий

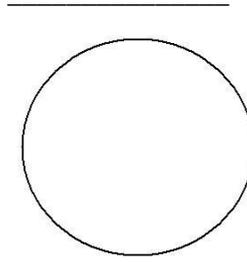


Окраска \_\_\_\_\_



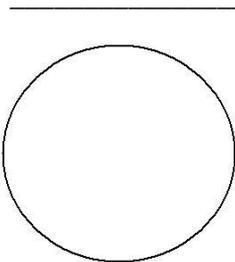
Окраска \_\_\_\_\_

Изучение капсулы бактерий



Окраска \_\_\_\_\_

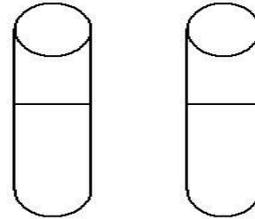
Изучение включений



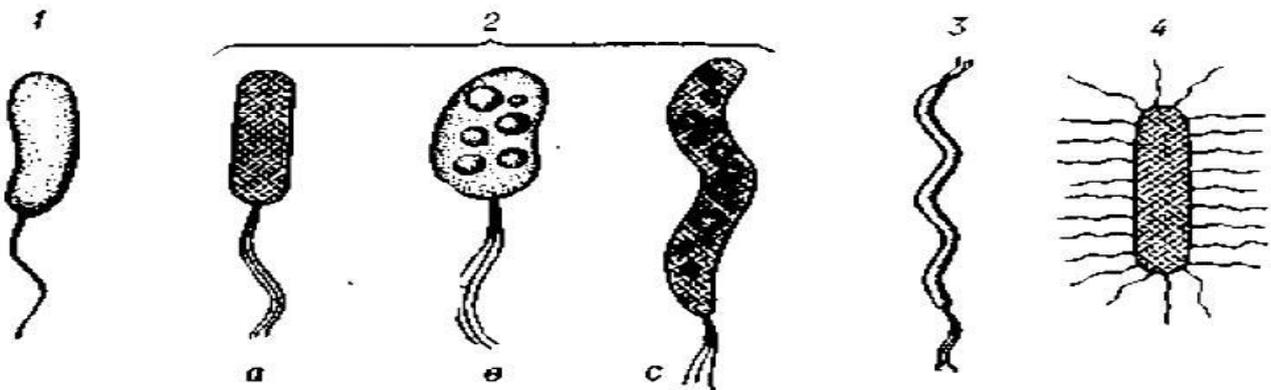
Окраска \_\_\_\_\_

Изучение жгутиков бактерий

Изучение подвижности бактерий:  
обозначить подвижный и неподвижный  
микроорганизм.



Зад. №4: Сделать подписи к рисунку « Основные типы жгутиков».



## Словарь

Дайте определение терминам:

Капсула-

Спора-

Споруляция-

Жгутик-

Нуклеоид-

Цитоплазма -

Рибосома-



**СРС**

1. Заполните таблицу «Сложные методы окраски».

Название метода	Метод Бурри-Гинса	Метод Циля-нильсена	Метод Ожешко	Метод Романоского-Гимзе	Метод Нейссера
Цель применения					
Реактивы 1. Краски 2. Протравы 3. Дифф. вещество.					
Способ фиксации					
Этапы окраски					

Сущность метода					
Результат: описание и рисунок микроскопической картины					

Занятие № 3

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Морфология и методы исследования отдельных групп прокариот: Актиномицетов, спирохет, микоплазм, хламидий, риккетсий. Методы микроскопии, применяемые в микробиологии.**

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Ознакомиться с особенностями строения отдельных групп прокариот.
2. Знать методы исследования отдельных групп прокариот
3. Знать методы микроскопии, применяемые в микробиологии

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Морфологи спирохет.
2. Морфология актиномицет.
3. Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм.
4. Темнопольная, электронная, фазово-контрастная, люминесцентная микроскопия. Сущность и назначение методов.



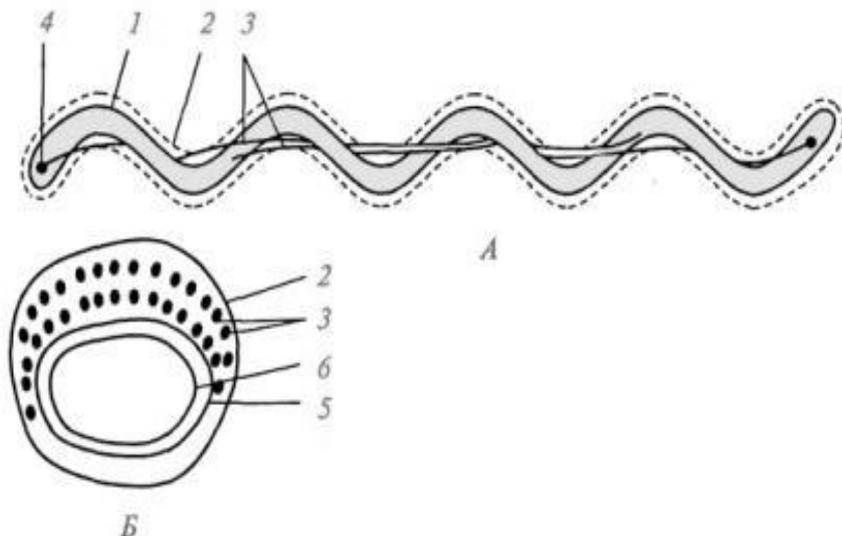
**Спирохеты**

Спирохеты (speira - изгиб, chaite - волосы) представляют группу бактерий, обладающих уникальной морфологией и способом движения. У клеток спирохет имеются три основные структуры: протоплазматичный цилиндр (собственно тело клетки), аксиальная (опорная) нить и трехслойная наружная оболочка. Клетки извиты, как у спирали, но обладают необычной гибкостью. Аксиальная нить находится в периплазматическом пространстве между наружной оболочкой и протоплазматическим цилиндром и состоит из отдельных фибрилл (эндофлагелл). Каждая из фибрилл закрепляется в области прикрепительных дисков (блефаропластах) на концах протоплазматического цилиндра и тянется к

противоположному его концу, обвивая его и заканчиваясь свободно. Химический состав фибрилл аналогичен составу жгутиков.



Зад. №1: Сделайте подписи к рисунку «Строение спирохет».



**Методы исследования.** Спирохеты плохо воспринимают анилиновые красители. Для окраски применяют метод Романовского-Гимзе, серебрение по Морозову. Нативный мазок исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

### Актиномицеты

Актиномицеты (actinomycetes - от греч. - луч, mykes - гриб) представляют своеобразную группу бактерий, имеющих вид небольших или длинных несептированных ветвящихся нитей, названных гифами. Скопление гифов называют мицелием. Сходство с грибами чисто внешнее, так как актиномицеты имеют прокариотический тип клетки с наличием клеточной стенки не содержащей хитина и целлюлозы. В состав пептидогликана могут входить галактоза, арабиноза, ксилоза и другие сахара не характерные для остальных бактерий и позволяющие дифференцировать актиномицеты. Актиномицеты грамположительны, многие формы кислотоустойчивы, некоторые актиномицеты вокруг нитей имеют капсулу.

На питательных средах актиномицеты формируют субстратный мицелий, в пораженных тканях (тканевая форма) актиномицеты могут образовывать друзы-гранулы.

Актиномицеты размножаются бесполом путем, образуя конидии или спораносцы со спорангиями на концах воздушного мицелия. Споры служат для размножения актиномицетов, они не термостойки, но выдерживают высушивание. Кроме того, возможно почкование и фрагментация мицелия на палочковидные или кокковидные формы.

**Методы исследования** Для микроскопического изучения актиномицет применяют окраски по Граму и Цилю-Нильсену.

### Риккетсии

Риккетсии - мелкие грамотрицательные, полиморфные бактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами. Риккетсии способны к биосинтезу белка, но не могут самостоятельно получать макроэргические соединения, поэтому их можно назвать «энергетическими паразитами» клеток-эукариотов. Жизненный цикл риккетсий зависит от жизнедеятельности клетки-хозяина и складывается из двух стадий: вегетативной и покоящейся (элементарные тельца). Риккетсии, находящиеся в вегетативной стадии активно размножаются путем бинарного деления и обладают активной подвижностью. Риккетсии покоящейся стадии (элементарные тельца) имеют сферическую форму и они не активны.

**Методы исследования.** Риккетсии хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе в сиреневый цвет, по Морозову (методом серебрения) в черный цвет. Для дифференциации риккетсий применяется метод

окраски, предложенный П.Ф. Здродовским. Риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и легко обнаруживаются на фоне голубой цитоплазмы и синего ядра клеток.

### Хламидии

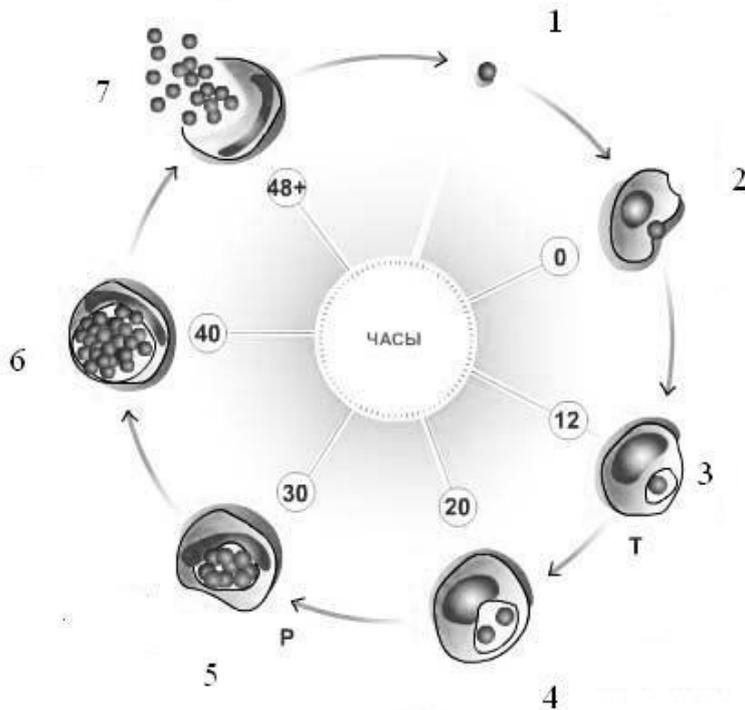
Хламидии являются типичными облигатными внутриклеточными энергетическими паразитами. Они не обладают цитохромами, не способны генерировать АТФ (используют энергодающие соединения АТФ, НАД в клетках хозяина). Размножаются только внутри связанных с мембраной вакуолей в цитоплазме клеток человека, млекопитающих, птиц. Размножение происходит в ходе уникального цикла развития. Основными стадиями жизненного цикла хламидий являются:

- Элементарные тельца - мелкие (0,2-0,5 мкм) шаровидные клетки, лишенные метаболической активности. Они являются инфекционным началом хламидий и обеспечивают их выживание во внеклеточной среде и заражение новых клеток. Ретикулярные тельца - более крупные (0,8-1,5 мкм), сферические образования, имеющие сетчатую структуру с тонкой клеточной стенкой и фибриллярным нуклеоидом. Они вырастают из элементарных телец внутри клеток, лишены инфекционности и, подвергаясь делению, обеспечивают репродукцию хламидий.

**Методы исследования.** Для микроскопического обнаружения телец включений (микроколоний) хламидий в инфицированных клетках (тканях) применяют различные методы окрашивания: Романовского-Гимзы, Маккиавелло и другие. При окрашивании по Романовскому-Гимзе они приобретают голубой или фиолетовый цвет. Кроме того, хламидии хорошо видны и в неокрашенном состоянии при микроскопии влажных препаратов под стеклом с помощью фазовоконтрастной оптической системы. В последнее время наиболее часто используется прямая реакция иммунофлюоресценции, окраска акридин –оранжевым.



*Зад №2: Сделайте подписи к рисунку «Жизненный цикл хламидий». Укажите стадии и формы.*

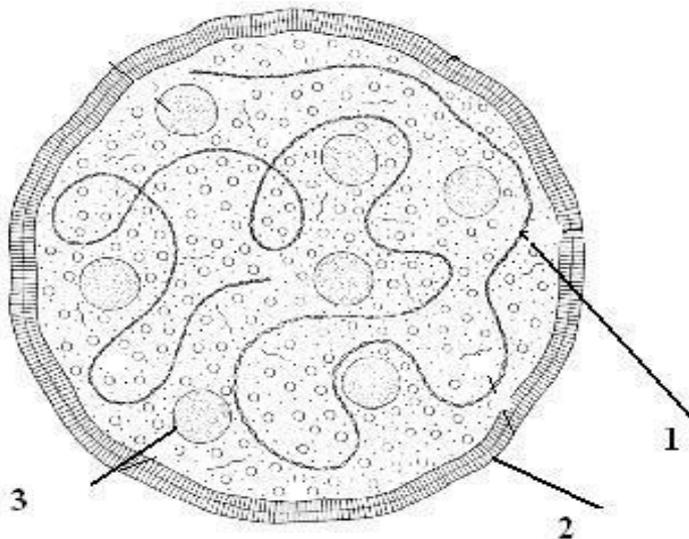


### Микоплазмы

Микоплазмы - самые мелкие прокариоты (125-150 нм) с минимальным геномом, способные самостоятельно размножаться. Главная особенность микоплазм - отсутствие клеточной стенки. Микоплазмы являются мембранными паразитами. Они окружены капсулоподобным слоем, под которым находится лишь тонкая трехслойная мембрана, содержащая в значительном количестве холестерин. Вследствие этого, микоплазмы выделяют в особый отдел Tenericutes, класс Mollicutes («нежная кожа»), порядок Mycoplasmatales. Микоплазмы полиморфна, не образуют спор, жгутиков, некоторые виды обладают скользящей подвижностью.

**Методы исследования.** В световом микроскопе обнаруживаются лишь самые крупные формы микоплазм. В живом состоянии их изучают в темнопольном и фазово-контрастном микроскопе, ультраструктурные компоненты выявляют при помощи электронной микроскопии.

*Зад. №3: Сделайте подписи к рисунку «Строение микоплазм».*



Зад.№4: Заполните таблицу «Методы микроскопии».

	Виды микроскопии		
	Темнопольная	Фазово-контрастная	Люминесцентная
Принцип метода			
Рисунок			



**СРС**

1) Написать конспект «Понятие о конфокальной, электронной, атомно-силовой микроскопии.»

**Словарь**

Дайте определение терминам:

**Внутриклеточный паразитизм-**

**Мембранный паразитизм-**

**Энергетический паразитизм-**

**Блефаропласт-**

**Друза-**

**Мицелий-**

**Гифа-**

**Микроскопия-**

Занятие № 4

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Морфология микроскопических грибов, простейших.**

**ПЛАН ЗАНЯТИЯ:**

1. Отличия в строении прокариотической и эукариотической клеток.
2. Классификация и общая характеристика грибов.
3. Классификация и морфология простейших.

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Освоить теоретический материал по теме занятия.
2. Продолжить знакомство с морфологией, структурой и классификацией микроорганизмов (грибы, простейшие).

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Грибы: особенности строения, классификация.
2. Особенности морфологии плесневых и дрожжевых грибов.
3. Общая характеристика простейших, классификация, особенности строения.



*Задание №1 Заполните таблицу « отличия эукариот от прокариот».*

Признак	Эукариоты	Прокариоты
Организация генома		
Наличие органелл, окруженных мембраной		
Рибосомы - локализация в клетке		

-константа седиментации		
Энергетический метаболизм		
Клеточная стенка – пептидогликан (есть, нет)		
Стеролы в составе мембран		
Тип поступления питательных веществ в клетку		



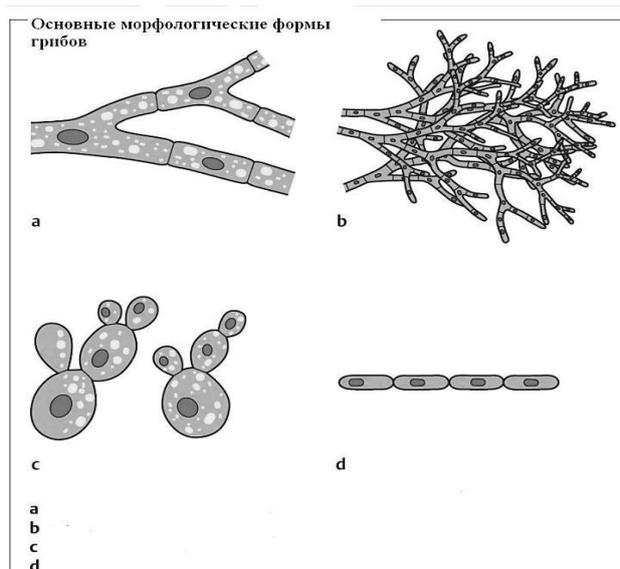
**Грибы** (тип *Mycota*, *Mycetes*, *Fungi*) представлены одноклеточными или многоклеточными эукариотами, которые по наличию хитина в оболочке, стеролов в цитоплазматической мембране и гликогена в цитоплазме напоминают клетки животного происхождения, а по наличию клеточной стенки, состоящей из полисахаридов, близких к целлюлозе; способности к неограниченному росту, размножению спорами, неподвижностью в вегетативном состоянии – растения.

У грибов существует 2 типа роста: *гифальный рост* (гифомицеты) и *дрожжевой рост* (бластомицеты). Обычно вегетативное тело гифомицетов состоит из нитей, сильно разветвленных и называемых гифами. Гифы либо не имеют поперечных перегородок (у *низших грибов*), либо разделены перегородками (септами) на клетки (у *высших грибов*).

Размножение грибов происходит половым и бесполом путем. Половое размножение грибов происходит с образованием гамет, половых спор и других половых форм. Бесполое (вегетативное) размножение грибов происходит почкованием, фрагментацией гиф и бесполовыми спорами. Эндогенные споры (спорангиоспоры) созревают внутри округлой структуры – спорангия. Экзогенные споры (конидии) формируются на кончиках плодоносящих гиф, так называемых кондиеносцах.

Заболевания (микозы) у человека вызывают около 500 видов грибов. Их принято называть паразитическими или патогенными грибами. Различают следующие классы, содержащие патогенные формы грибов: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*.

★ **Задание №2** Сделать подписи к рисунку.



★ **Задание №3:** Дать письменную характеристику и зарисовать представителей основных классов патогенных грибов.



**Простейшие** - одноклеточные эукариоты, близкие по строению к клеткам сложно организованных животных. Это целостный организм, выполняющий все функции, свойственные живым существам.

Клетки простейших, как у всех эукариот содержат ядро, цитоплазму, мембрану, которая обычно уплотняется и в результате чего образуется пелликула. Кроме органелл общего значения (рибосомы, митохондрии, лизосомы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи) имеются специфические органеллы.

Большинство простейших подвижно и передвижение осуществляется с помощью псевдоподий (амебы, малярийный плазмодий), жгутиков (лямблии, лейшмании), ресничек (балантидий).

Простейшим свойственны определенные жизненные циклы, во время которых при неблагоприятных условиях вегетативные формы превращаются в цисты.

Простейших относят к царству Protozoa (protos - первый, zoa - животные). Медицинское значение имеют: Тип Sarcostigophora, подтип Sarcodina (саркодовые) и подтип Mastigophora (жгутиконосцы), Тип Ciliophora (реснитчатые, инфузории), тип Apicomplexa, класс Sporozoa (споровики).



*Задание №4: Дать письменную характеристику и зарисовать представителей типа саркодовых, жгутиконосцев, инфузорий и споровиков.*



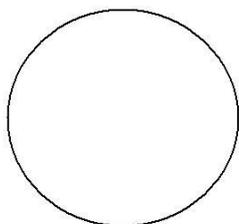
**Лабораторная работа №1**  
**Окраска простым методом чистых культур**  
**дрожжевых и дрожжеподобных грибов.**

Цель опыта: \_\_\_\_\_

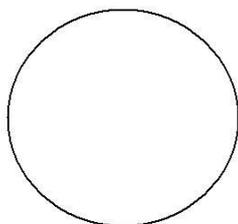
Материал: \_\_\_\_\_

Ход опыта: \_\_\_\_\_

Результат: \_\_\_\_\_



Окраска \_\_\_\_\_



Окраска \_\_\_\_\_

Вывод: \_\_\_\_\_

## Морфология и биология вирусов и бактериофагов.

### ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:

1. Освоить теоретический материал по теме занятия.
2. Продолжить знакомство с морфологией, структурой и классификацией микроорганизмов (вирусы, бактериофаги).
3. Ознакомиться с особенностями жизненного цикла вирусов.

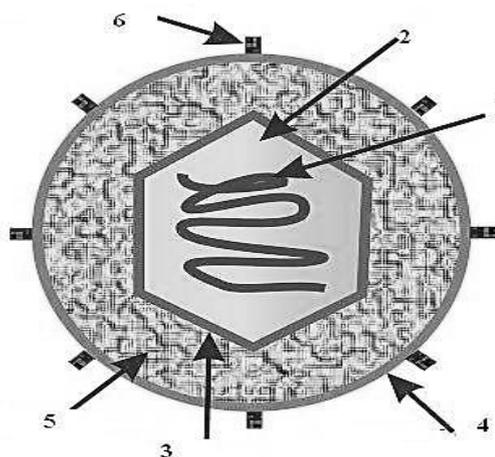
### ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:

1. Таксономическая классификация царства вирусов.
2. Этапы взаимодействия вируса с клеткой.
3. Строение бактериофага.
4. Этапы взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой.
5. Применение бактериофагов в медицине.

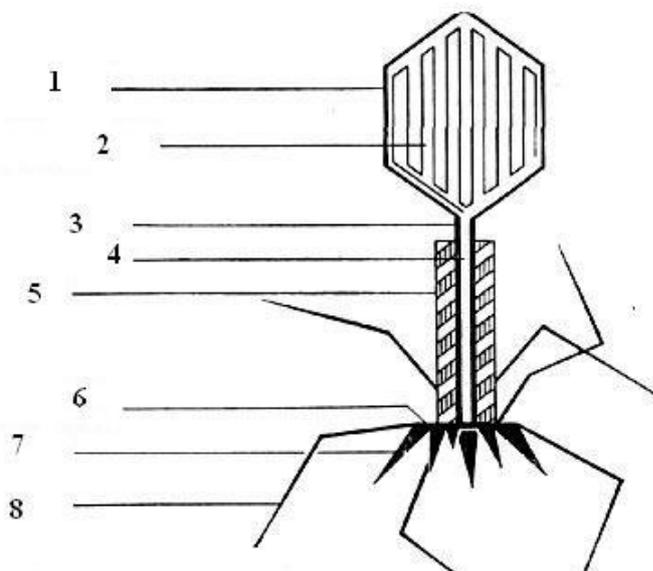


**Вирус** – неклеточная форма жизни, обладающая геномом (РНК или ДНК), но лишенная собственного синтезирующего аппарата и, поэтому, способная к воспроизведению лишь в клетках более высокоорганизованных существ.

★ *Задание №1: Сделать подписи к рисунку «Строение вируса»*



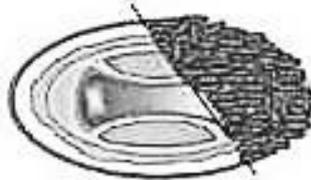
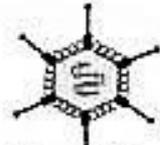
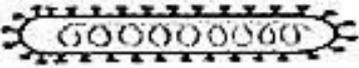
*Задание №2: Сделать подписи к рисунку «Строение бактериофага»*



*Задание №3. Зарисуйте этапы репродукции вирулентного и умеренного бактериофагов. Дайте письменную характеристику каждого процесса.*



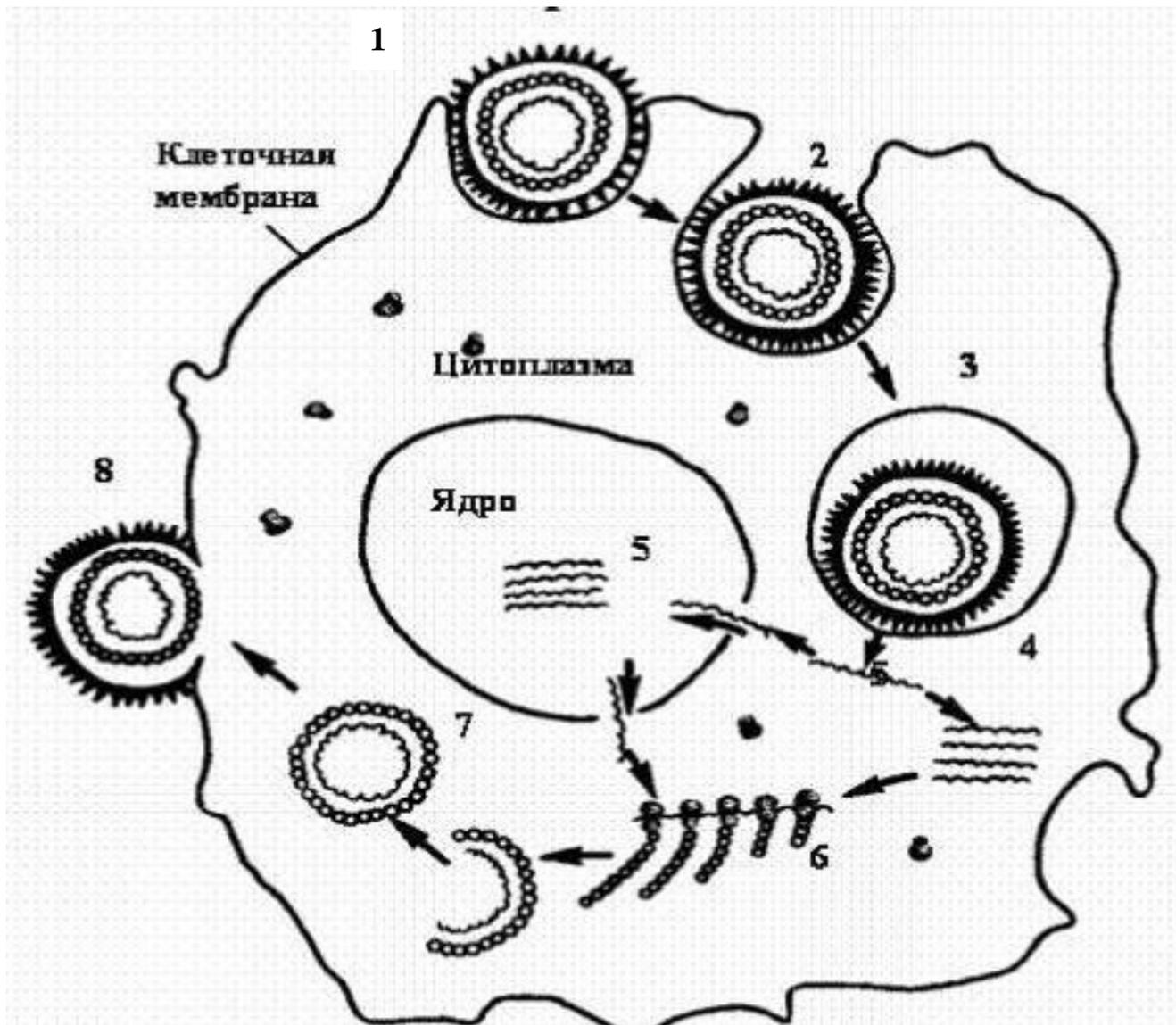
# КЛАССИФИКАЦИЯ И MORFOLOGИЯ ВИРУСОВ

ВИРУСЫ С ОБОЛОЧКОЙ				ВИРУСЫ БЕЗ ОБОЛОЧКИ	
<b>ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>				<b>ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>	
					
Herpesviridae	Hepadnaviridae	Poxviridae		Adenoviridae	Polyomaviridae Papillomaviridae
<b>РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>				<b>ДНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>	
					
Coronaviridae	Paramyxoviridae	Bunyaviridae	Arenaviridae	Parvoviridae	Circinoviridae
<b>РНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>				<b>РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ</b>	
					
Orthomyxoviridae	Retroviridae	Rhabdoviridae		Reoviridae	
					
Togaviridae	Flaviviridae	Filoviridae		Picornaviridae	
					
				Caliciviridae	

Задание №4: описать типы взаимодействия вируса с клеткой

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Задание № 5: Сделайте подписи к рисунку «Этапы репродукции вируса». Дайте письменную характеристику каждого этапа.



1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

5

6

7

8

Занятие № 6

Дата \_\_\_\_\_

**Итог по разделу «Морфология микробов. Микроскопический метод диагностики»**

***Контрольные вопросы к занятию***

- 1. История микробиологии. Основные периоды развития.***
- 2. Вклад Л. Пастера, Р. Коха в развитие общей и медицинской микробиологии***
- 3. Основные принципы систематики прокариот. Биогенетическая и нумерическая классификация.***
- 4. Определитель прокариот по Берги, принцип его составления и практическое применение.***
- 5. Техника приготовления мазка препарата, способы фиксации.***
- 6. Методы окраски, характеристика, подразделение.***
- 7. Протравы, дифференцирующие вещества, назначение, примеры.***
- 8. Метод Грама, его сущность, техника окраски, цель применения.***
- 9. Метод Циля-Нильсена, его сущность, методика окраски. От чего зависит кислотоустойчивость туберкулезных бактерий. Применение. Микроскопическая картина мазка, окрашенного по Цилю-Нильсену.***
- 10. Основные анатомические структуры прокариот.***
- 11. Клеточная стенка бактерий, ее строение у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Функции клеточной стенки.***
- 12. Мембранные образования бактерий. Строение цитоплазматической мембраны, ее функции. Мезосомы бактерий, их строение, функции.***
- 13. Нуклеоид бактерий, его отличия от ядер эукариот. Химический состав, функции. Метод выявления. Метод Романовского-Гимзы, сущность, микроскопическая картина окрашенного мазка.***
- 14. Рибосомы бактерий, химический состав, строение, функция.***
- 15. Цитоплазматические включения бактерий, химическая природа, значение.***
- 16. Метод Нейссера, сущность, методика окраски. Микроскопическая картина мазка, окрашенного по Нейссеру.***
- 17. Капсула бактерий, химический состав, подразделение, значение. Примеры бактерий, образующих капсулу.***
- 18. Метод Бурри-Гинса, реактивы сущность, микроскопическая картина мазка капсульных бактерий, окрашенных методом Бурри-Гинса.***

19. Жгутики бактерий, строение, химический состав. Подразделение жгутиковых бактерий. Методы выявления жгутиков.
20. Ворсинки бактерий (фимбрии, пили), химический состав, функции.
21. Формы существования бактериальной клетки (вегетативная клетка, спора). Эндоспора бактерий, условия и процесс спорообразования. Ультраструктура спор, причины их высокой резистентности к воздействию факторов внешней среды. Примеры спорообразующих бактерий.
22. Окраска спорообразующих бактерий по методу Ожешко. Сущность метода.
23. Способы приготовления нативных (живых) препаратов « раздавленная капля», «висячая капля».
24. Методы микроскопии. Световая микроскопия. Сущность метода. Устройство светового микроскопа.
25. Темнопольная микроскопия. Сущность. Назначение.
26. Фазово-контрастная микроскопия. Сущность. Назначение.
27. Опишите морфологию и ультраструктуру спирохет, строение двигательного аппарата. Укажите к каким родам относятся патогенные спирохеты. Сравнительная характеристика боррелий, трепонем и лептоспир.
28. Морфологические особенности актиномицет. Формы существования актиномицет во внешней среде и в организме. Способы размножения. Роль актиномицет в инфекционной патологии человека. Примеры патогенных актиномицет.
29. Морфологические особенности риккетсий. Формы существования. Способы размножения. Примеры патогенных для человека риккетсий, назовите заболевания, которые они вызывают.
30. Морфологические особенности хламидий. Формы существования. Цикл внутриклеточного развития хламидий. Примеры патогенных для человека хламидий, назовите заболевания, которые они вызывают.
31. Морфологические особенности микоплазм. Способы размножения. Примеры патогенных для человека микоплазм, назовите заболевания, которые они вызывают.
32. Основные отличия организации эукариот и прокариот.
33. Грибы. Строение, морфологические группы грибов. Назовите представителей плесневых грибов. Укажите отличия низших и высших грибов.
34. Простейшие. Строение. Дайте характеристику типам *Sarcocystis*, *Ciliophora*, *Apicomplexa*.
35. Таксономическая классификация царства вирусов. Морфология вирусов. Типы взаимодействия вируса с клеткой. Этапы взаимодействия вируса с клеткой.
36. Строение бактериофага. Этапы взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой. Применение бактериофагов в медицине.

Занятие № 7

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Физиология микробов. Питательные среды.  
Культивирование бактерий аэробов. Методы выделения чистых культур  
бактерий.**

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Знать теоретический материал по теме занятия.
3. Знать состав и классификацию питательных сред.
4. Научиться производить посев на чашку Петри с МПА для выделения чистой культуры.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Питание бактерий. Классификация бактерий по типам питания. Голофитный способ питания.
2. Механизмы транспорта питательных веществ у бактерий. Секретция молекул у бактерий, типы секреции.

3. Основные методы культивирования бактерий. Требования, предъявляемые к питательным средам.
4. Классификация питательных сред.
5. Рост и размножение бактерий. Пигменты. Классификация пигментов. Значение пигментообразования
6. Классификация бактериальных ферментов.
7. Бактериологический метод диагностики. Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов. Правила взятия и транспортировки материала для бактериологического исследования.



*Зад.№1: Заполните таблицу «Классы ферментов»*

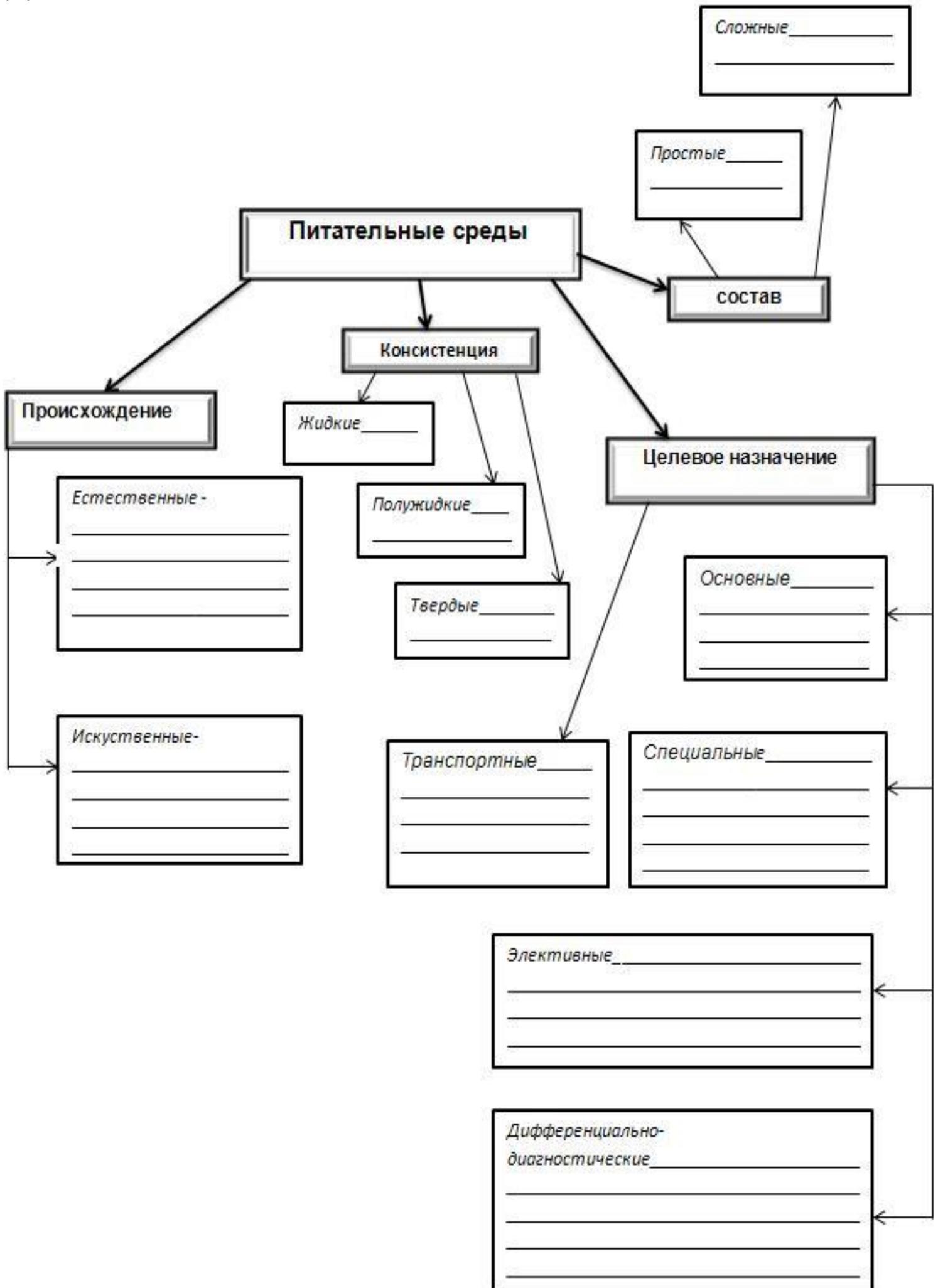
Класс	Тип катализируемых реакций	Примеры
1.Оксидоредуктазы		
2.Трансферазы		
3.Гидролазы		
4.Лиазы		
5.Изомеразы		
6.Лигазы		



*Задание№2: Зарисуйте схемы и таблицу «Этапы и методы выделения чистых культур азобов». Впишите цель посева на каждом этапе.*

## Схема выделения чистой культуры аэробных микроорганизмов

- ☆ *Задание №3: Записать в тетради для конспектов правила взятия и транспортировки материала для бактериологического исследования.*
- ☆ *Задание №4: Записать в тетради для конспектов основные требования, предъявляемые к питательным средам*





## Методы выделения чистых культур

**Метод Пастера** – последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде, применяется как один из этапов подсчета количества бактерий в исходном материале (КОЕ 0 колониеобразующих единиц), а также историческое значение.

**Метод Коха** (метод пластинчатых разводов Коха) – последовательное разведение исследуемого материала в пробирках с расплавленным МПА, далее содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, где МПА застывает; после инкубации на поверхности МПА и внутри питательной среды вырастают изолированные колонии. Метод применяется для подсчета количества бактерий в исходном материале, имеет также историческое значение.

**Метод Дригальского** – рассев исследуемого материала на поверхности питательного агара в чашке Петри с помощью шпателя, бактериальные петли или тампона с целью получения на поверхности среды изолированных колоний.

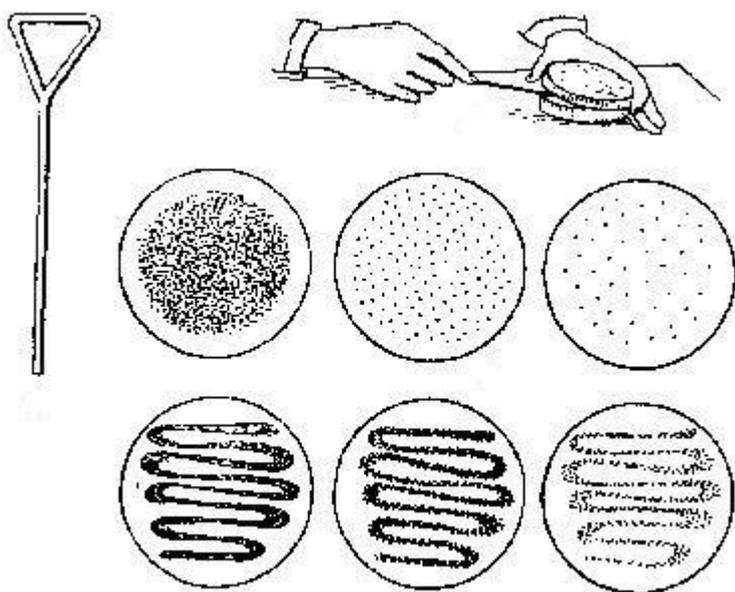


Рис.1 Метод Дригальского

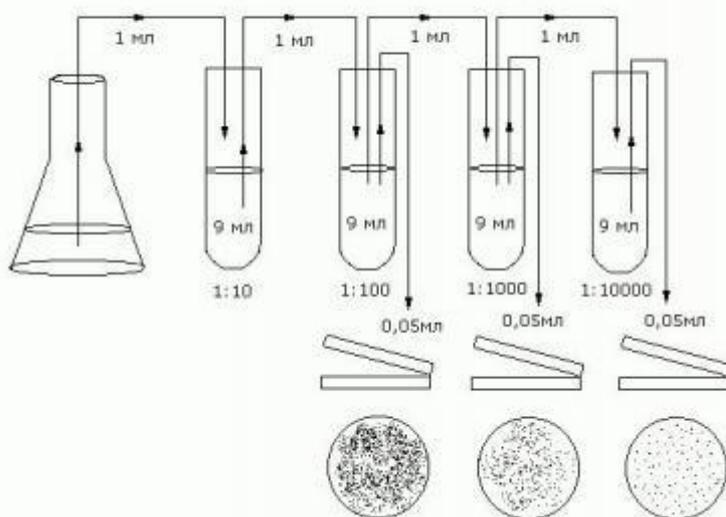


Рис. 2 Метод Коха



## Словарь

Дайте определение терминам:

Фермент-

Экзофермент-

Эндофермент-

Конститутивные ферменты-

Индукцибельные ферменты-

Чистая культура-

Прототрофы-

Ауксотрофы-

Хемоорганотрофы-

Гетеротрофы-



СРС Написать конспект «Культивирование отдельных групп прокариот (микроаэрофильные микроорганизмы, спирохеты, хламидии)».

Занятие № 8

Дата \_\_\_\_\_

### **Тема: Выделение чистых культур бактерий (продолжение). Культивирование анаэробных микроорганизмов. Энергетический метаболизм микроорганизмов.**

#### **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Знать теоретический материал по теме занятия.
2. Иметь представление о биохимической активности бактерий как о дифференциально-диагностическом признаке при определении вида микроба.
3. Знать состав сред Гиса, Эндо.
4. Научиться оценивать культуральные и морфологические свойства выделенной культуры.
5. Научиться делать пересев отдельной колонии на скошенный агар.
6. Уметь сделать заключение о виде выделенной культуры.
7. Знать особенности культивирования анаэробов.

#### **ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Биологическое окисление у бактерий (виды энергетического метаболизма). Брожение, типы брожения. Дыхание бактерий.

2. Классификация бактерий по типам дыхания.
  3. Методы культивирования анаэробов.
  4. Определение сахаролитических свойств, состав сред Гиса, Эндо.
  5. Определение протеолитических свойств. Определение каталазной и оксидазной активности.
- Современные автоматизированные методы определения биохимических свойств бактерий.

## Принципы организации дыхания бактерий

### Модульное строение дыхательных цепей

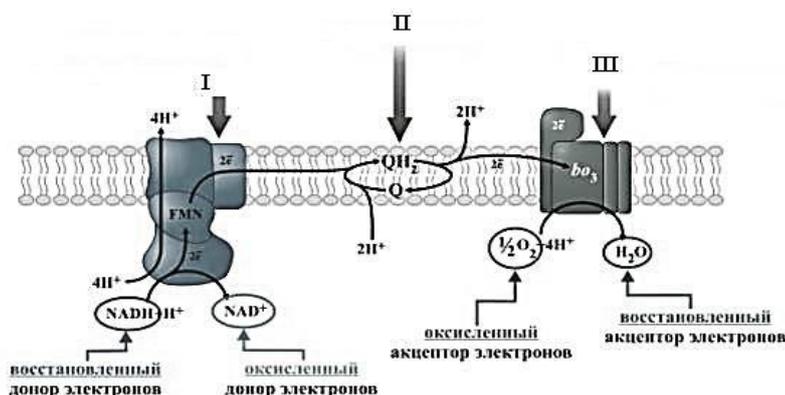


Рис.1 Дыхательная (электронно-транспортная) цепь.

I- Флавопротеины

II- Квиноны

III- цитохромы

### Дыхание бактерий.

У прокариот дыхательная цепь локализована в ЦПМ и, возможно, в ее производных (мезосомах). Мембрана содержит фермент АТФ-синтетазу, образующую АТФ из АДФ и фосфора. Важнейшими ферментами являются:

*Флавопротеины*-окислительно-восстановительные ферменты, которые передают атомы водорода от восстановленных пиридиновых нуклеотидов (НАДН, НАДФН) последующим переносчикам.

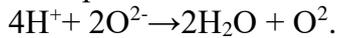
*Квиноны* – окислительно-восстановительные ко-ферменты, способные переносить как водород, так и электроны, которые они дальше передают цитохромам. У грамотрицательных чаще встречается убихинон, у грамположительных-нафтохинон.

*Цитохромы*-окислительно-восстановительные ферменты, которые переносят только электроны. Дыхательная цепь содержит несколько цитохромов, различающихся по окислительно-восстановительным потенциалом и другими свойствами.

Пиримидиновые нуклеотиды НАД и НАДФ переносят атом водорода от окисляемого субстрата на флавопротеины. Флавопротеины окисляясь, передают его на квиноны, которые способны переносить не только водород, но и электроны. Атомы водорода распадаются на протоны  $H^+$  и электроны. Протоны переносятся на наружную мембрану, создавая положительный потенциал, а электроны поступают на цитохромы, переходя от одного цитохрома к другому. Терминальный цитохром называется цитохрооксидазой, он присоединяет электрон к кислороду, превращая его в отрицательно заряженный активный анион:  $O^{2+}e^- \rightarrow O^{2-}$ .

При переносе электронов на ЦПМ возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода. Протоны и электроны накапливаются по разные стороны мембраны, и при этом ее наружная поверхность заряжается положительно, а внутренняя отрицательно, что создает разность потенциалов. Когда эта разность становится значительной, образуется протонный канал при участии фермента АТФ-синтетазы, через

который протоны переходят с наружной стороны мембраны клетки на внутреннюю сторону, Этот процесс сопровождается выделением большого количества энергии, значительная часть которой идет на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, а поступающие внутрь клетки протоны соединяются с анионом кислорода, образуя воду и молекулярный кислород:

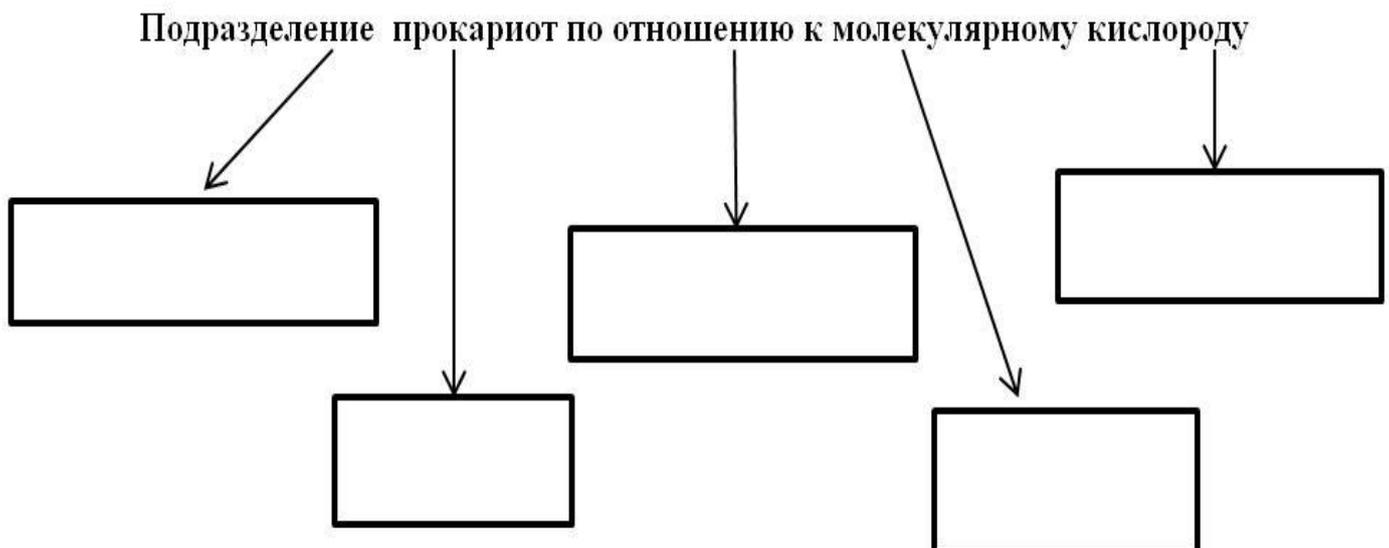


*Анаэробное дыхание* – это процесс, в котором, в отличие от аэробного дыхания, в качестве конечного акцептора электронов используется не кислород, а неорганические (нитраты, сульфаты, карбонаты) и в редких случаях органические (фумарат) соединения. При анаэробном дыхании функционируют электрон-транспортная цепь, с теми же типами переносчиков электронов и протонов, но цитохрооксидаза заменяется на соответствующие редуктазы (нитратредуктаза, сульфатредуктаза, карбонатредуктаза, фумаратредуктаза).

**Брожение**- метаболический процесс, приводящий образованию АТФ в результате анаэробного окислительно-восстановительного превращения органических соединений в реакциях субстратного фосфорилирования. Процессу брожения подвергается не свободная молекула углевода, а соединенная с фосфорной кислотой (т.е. фосфолирированная). Реакции включения остатка неорганической фосфорной кислоты в молекулы различных химических соединений, сопровождающиеся образованием АТФ, называются субстратным фосфолирированием. Брожение протекает в анаэробных условиях, при этом из сбраживаемого субстрата извлекается только незначительная часть запасенной в нем энергии.

В зависимости от конечных продуктов различают разные типы брожения: молочнокислое, спиртовое, уксуснокислое, муравьинокислое, пропионовокислое и другие.

☆ *Задание №1: Заполните схему. Подпишите примеры представителей каждого подразделения.*



☆ *Задание №2: Заполните таблицу «методы создания анаэробноза»*

№ п/п	Способ культивирования	Сущность способа	Используемые		
			приборы	методы	среды
1	Физический				
2	Химический				
3	Биологический				



*Задание №3*

**Опишите характер S и R роста микроорганизмов и характер роста на жидких питательных средах:**



Задание №3: Зарисуйте схему и таблицу «Этапы выделения чистой культуры анаэробов»



**Лабораторная работа №1**  
**Выделение чистой культуры бактерий-аэробов**  
**(2-й день исследования)**

2 этап \_\_\_\_\_

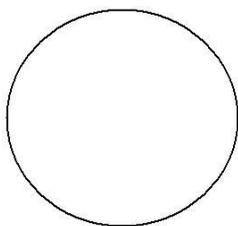
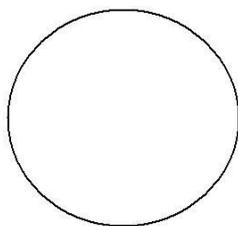
**Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства выросших колоний**

Изучаемые свойства	Тип колонии	
	1	2
<u>Культуральные свойства.</u> Размер колонии		

Форма колонии		
Цвет		
Характер края		
Характер поверхности		
Консистенция		
<u>Морфология</u> микроорганизмов при микроскопии		

Мазок из колонии 1 типа

Мазок из колонии 2 типа



Окраска \_\_\_\_\_ Окраска \_\_\_\_\_



**Лабораторная работа №2**  
**Идентификация выделенной чистой культуры (3-й день исследования)**

3 этап \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Изучаемые свойства	Полученный результат						
	Морфологические и тинкториальные свойства						
Культуральные свойства	величина	форма	цвет	консистенция	поверхность	край	структура
Биохимические	Сахаролитические свойства			Протеолитические свойства			

свойства	глюкозы	лактозы	сахарозы	мальтозы	индол	серово- дород	оксидаза	подвиж- ность
<b>Заключение</b>								

## Словарь

Дайте определение терминам:

Метаболизм-

Катаболизм-

Анаболизм-

Дыхание-

Анаэробноз-

Фаготипирование-

Симбиоз-

Антагонизм-

Сателлизм-

Комменсализм-

Паразитизм-

**Тема: Антибиотики.**

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Знать теоретический материал по теме занятия.
2. Овладеть методикой определения чувствительности микробов к антибиотикам методом бумажных дисков.
3. Научиться оценивать чувствительность микробов к антибиотикам методом серийных разведений в бульоне и агаре по демонстрационному материалу.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Антимикробные средства, виды. Химиотерапия. Химиопрофилактика. Химиотерапевтический индекс.
2. Антибиотики. Определение, требования к антибиотикам.
3. Классификация антибиотиков. Основные группы антибиотиков.
4. Классификация побочных реакций антимикробных препаратов. Ограничения антибиотикотерапии.
5. Антимикробная резистентность. Виды и механизмы. Определение чувствительности к антибиотикам. Пути преодоления резистентности микроорганизмов к лекарственным препаратам.



*Зад.№1: заполнить таблицу «Классификация антибиотиков по происхождению»:*

Способ получения	Продуцент	Примеры

--	--	--

☆ *Зад № 2: Классификация антибиотиков по спектру действия:*

1)

2)

☆ *Зад № 3: Классификация по типу действия:*

1) Бактерицидные\_

2) Бактериостатические-

Таб.№1: «Классификация антибиотиков по химическому строению».

<b>Основной элемент структуры</b>	<b>Основные группы антибиотиков</b>	<b>Примеры</b>
Содержащие $\beta$ -лактамное кольцо	Пенициллины	Бензилпенициллин, Амоксициллин, оксациллин, азлоциллин, ампициллин и др.
	Карбопенемы	Меропинем, имипинем
	Цефалоспорины	Цефазолин, цефамандол, цефотаксим, цефтриаксон, цефоперазон и др.
	Монобактамы	азтреонам
Содержащие аминсахара	Аминогликозиды	Амикацин, генамицин, канамицин, сизамицин, тобрамицин и др.
Содержащие 4 конденсированных шестичленных цикла	Тетрациклины	Доксициклин, тетрациклин, метациклин и др.
Производные диоксиаминофенилпропана	Амфениколы	Левомецетин

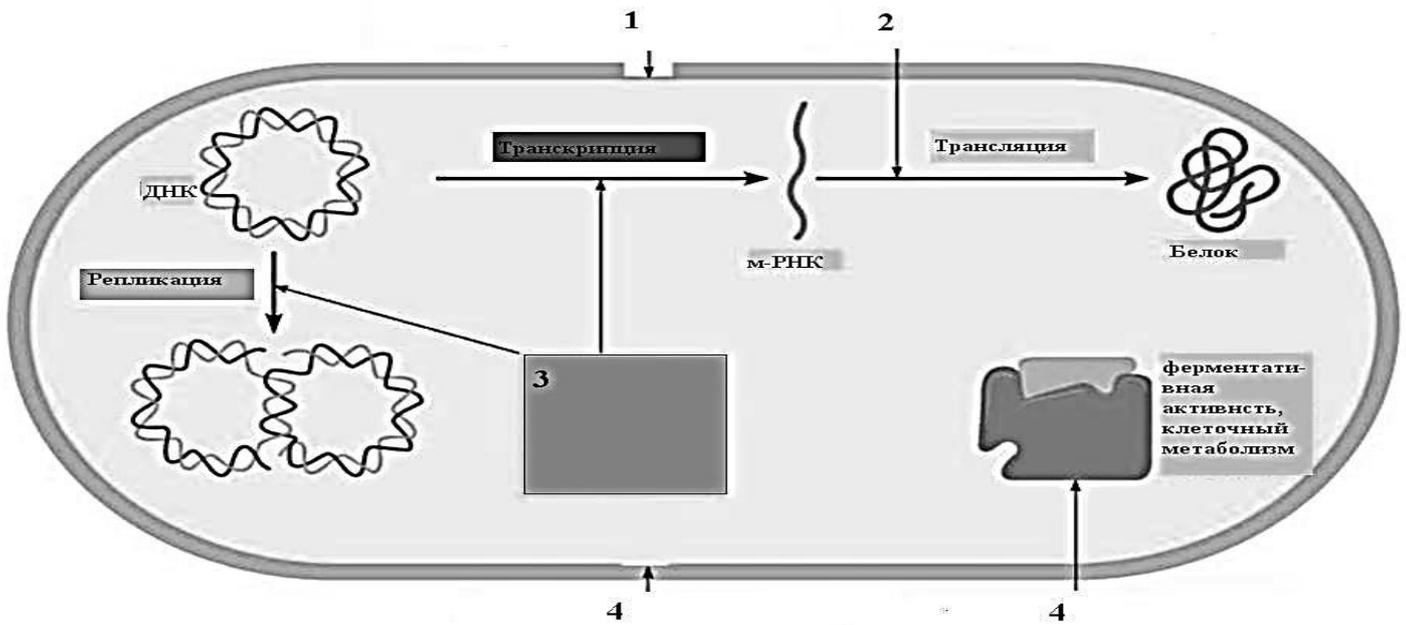
Содержащие макроциклическое лактонное кольцо	Макролиды, азолиды	Эритромицин, азитромицин, джозамицин, кларитромицин
Ансамицины	Рифампицин, рифамицин	
Гликопептиды	Ванкомицин, капреомицин	
Линкозамиды	Клиндамицин, линкамицин	
Оксазолидиноны	Линезолид	
Фторхинолоны	Левофлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин	
Разные антибиотики	Бацитрацин, полимиксин, циклосерин, фузафунжин и др.	



*Зад.№4: Заполнить таблицу «Классификация антибиотиков по механизму действия»*

Механизм действия	Препараты


☆ Зад. № 5: Подпишите антибиотики и их точки воздействия



Механизмы формирования лекарственной устойчивости

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)



## Методы определения чувствительности к антибиотикам

### 1) Диско-диффузный метод

На поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности (обычно эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland) и затем помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35°-37°С в течение ночи учитывают результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах.



Рисунок 1. Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.

### 2) Эллисометрический метод (Е-тест)

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. В месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

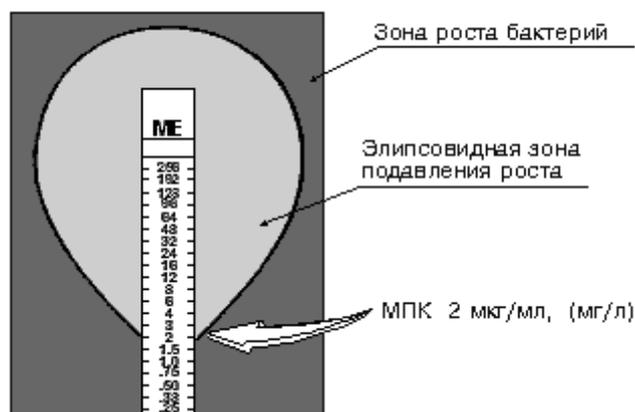


Рисунок 2. Определение чувствительности микроорганизмов с помощью Е-тестов

Несомненным достоинством диффузионных методов является простота тестирования и доступность выполнения в любой бактериологической лаборатории. Однако с учетом высокой стоимости Е-тестов для рутинной работы обычно используют диско-диффузионный метод

### 3) Методы серийных разведений

Основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например от 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон) или в агар. Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещают в бульон с антибиотиком или на поверхность агара в чашке. После инкубации в течение ночи при температуре 35°-37°С проводят учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) или на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать **минимальной подавляющей концентрацией (МПК)**. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) - наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий



**Рисунок 3.** Определение значения МПК методом разведения в жидкой питательной среде.

**Таблица 2.** Критерии интерпретации чувствительности бактерий

Категория чувствительности микроорганизма	Микробиологическая характеристика	Клиническая характеристика
<b>Чувствительный</b>	Не имеет механизмов резистентности	Терапия успешна при использовании обычных доз
<b>С промежуточной резистентностью</b>	Субпопуляция, находящаяся между чувствительной и резистентной	Терапия успешна при использовании максимальных доз или при локализации инфекции в местах, где антибиотик накапливается в высоких концентрациях
<b>Резистентный</b>	Имеет механизмы резистентности	Нет эффекта от терапии при использовании максимальных доз



**Лабораторная работа №1**  
**Определение чувствительности эшерихий и стафилококка к антибиотикам диско-диффузионным методом**

**Необходимые материалы:** Чашки Петри с агаром Мюллер-Хилтон, стерильный физраствор, стерильные тампоны, стерильные пробирки, петли, стандарт мутности по McFarland (0,5 ЕД мутности) или денситометр, диски с антибиотиками, пинцет, чистые культуры бактерий.

### Ход работы:

1. Для исследования необходимо использовать 18-24 ч культуры микроорганизмов
2. Приготовить гомогенную суспензию бактериальных клеток в физрастворе плотностью 0,5 ЕД по стандарту мутности McFarland
3. Бактериальную взвесь нанести стерильным тампоном на поверхность агара Мюллера-Хинтон в трех различных направлениях плотно прилегающими друг к другу штрихами
4. Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на подсохшую поверхность агара нанести диски с антибиотиками не более 6 дисков на стандартную чашку.
5. Инкубировать чашки 16-18 ч при  $35 \pm 1^\circ \text{C}$
6. Измерить диаметры зон подавления роста прозрачной линейкой на темном фоне со стороны дна. Результат в мм записать в таблицу.
7. Оценить категорию чувствительности в соответствии с утвержденными стандартами

### Определение чувствительности *E. coli* и других энтеробактерий

Антибиотик	Диск, мкг	Результат D зоны, мм	Стандарт Ч $\geq$	Стандарт Р <	Интерпретация результата (Ч/УР/Р)
Амикацин	AK 30		18	15	
Ампициллин	AMP 10		14	14	
Амоксиклав	AMC30		19	19	
Имипенем	IPM 10		22	16	
Меропенем	MEM10		22	16	
Нитрофурантоин	F 100		11	11	
Ципрофлоксацин	CIP 5		26	24	
Цефепим	CEP 30		27	21	
Цефтазидим	CAZ 10		22	19	
Цефотаксим	CTX 5		20	17	
Цефтриаксон	CRO 30		25	22	
Эртапенем	ETP 10		25	22	

### Определение чувствительности *S. aureus* и других стафилококков

Антибиотик	Диск, мкг	Результат D зоны, мм	Стандарт Ч $\geq$	Стандарт Р <	Интерпретация результата (Ч/УР/Р)
Цефокситин-скрининг*	FOX 30		22	22	
Клиндамицин	DA 2		22	19	
Эритромицин	E 15		21	18	
Гентамицин	CN 10		18	18	
Тетрациклин	TET 30		22	19	
Линезолид	LZD10		22	22	
Левифлоксацин	LEV 5		24	24	
Триметоприм-сульфаметоксазол	TS 25		17	14	
Ципрофлоксацин	CIP 5		21	21	

\*Возбудители, чувствительные к цефокситину, оцениваются как чувствительные к оксациллину и ко всем  $\beta$ -лактамам без дополнительного определения чувствительности

Заключение:

**Тема: Асептика. Антисептика.****ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Ознакомиться с основными методами асептики, антисептики, дезинфекции, стерилизации.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.
2. Асептика, виды асептических мероприятий. Дезинфекция. Определение, виды и способы дезинфекции. Стерилизация: определение, методы стерилизации.
3. Антисептика, определение. Классификация антисептиков, требования к антисептикам, механизмы действия.



*Зад №1: заполните таблицу «Методы стерилизации».*

Метод	Аппарат	Режим стерилизации	Стерилизуемый материал
Прокаливание			
Стерилизация сухим жаром			
Стерилизация паром под давлением			
Стерилизация ультразвуком			
Стерилизация гамма-лучами и УФО			



Зад №2: заполните таблицу «Методы частичного обеспложивания».

Метод	Режим	От каких микроорганизмов не освобождается обрабатываемый материал
Пастеризация		
Фильтрация		
Кипячение		



Зад № 3: заполните таблицу «Характеристика антисептических средств»

Средство	Механизм действия	Применение
Галогены и их соединения (йод, йодоформ, хлорамин Б и др.)		
Кислоты и их соли (оксолиновая, бензойная, салициловая, борная, тетраборат натрия и др.)		
Окислители (перекись водорода, перманганат калия и др.)		
Щелочи (аммиак и его соли, бура)		
Спирты (70-80% этанол, 60-70% пропанол)		

Альдегиды (формальдегид, уротропин, кальцекс)		
Фенол и его производные (тимол, резорцин, бензонафтол)		
Производные 8-оксихинолона (хинозол, интестопан, нитроксолин)		
Производные нитрофурана (фурациллин, фурагин, фуразолидон)		
ПАВ (роккал, этоний, хлоргексидин, сульфанола)		
Красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, риванол)		



### **СРС:**

1. Написать конспект «Противовирусные, антипротозойные и противогрибковые препараты. Классификация по механизму действия».
2. Написать конспект «Применение бактериофагов в медицине. Определение чувствительности бактерий к бактериофагам».

### **Словарь**

Дайте определения терминам

**Химиотерапия-**

**Антибиотики-**

**Антимикробная резистентность-**

**Стерилизация -**

**Дезинфекция -**

**Асептика-**

**Антисептика-**

**Тема: Генетика микроорганизмов. Молекулярно-генетический метод диагностики. Культивирование облигатных паразитов.**

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Знать теоритический материал по теме занятия.
2. Научиться ставить и учитывать опыты трансформации, трансдукции и конъюгации..

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Строение генетического аппарата микроорганизмов
2. Плазмиды, транспозоны, Is-последовательности. Их роль.
3. Генотип, фенотип бактерий, виды изменчивости.
4. Фенотипическая изменчивость.
5. Генетическая изменчивость, ее виды. Репарации у бактерий.
6. Мутации, диссоциации.
7. Трансформация.
8. Трансдукция.
9. Конъюгация.
10. Генная инженерия в медицине и биотехнологии.
11. Методы молекулярной генетической диагностики. Гибридизация нуклеиновых кислот, блотинг нуклеиновых кислот. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
12. Методы культивирования облигатных паразитов



*Задание №1: Опишите и зарисуйте результаты опыта.*

Для опыта:

1. Умеренный коли-фаг, полученный при облучении ультрафиолетовыми лучами культуры донора лактозо-позитивной E.coli lac+;
2. Культура реципиента E.coli lac-;
3. Среда Эндо как селективная среда с лактозой для выявления лактозопозитивных рекомбинантов E.coli.

Ход работы: К 1 мл бульонной культуры реципиента (E.coli lac-) добавьте 1 мл фага.

Пробирку поставьте в термостат на 30 мин. Затем сделайте высев петлей на половину чашки Петри со средой Эндо. Для контроля сделайте высев из пробирки с культурой реципиента.

Учет результатов: В контрольном посеве видны розовые колонии E.coli lac-, а после опыта трансдукции на чашке среди розовых колоний есть и колонии красного цвета с металлическим блеском – это рекомбинанты E.coli lac+.



*Задание №2: Опишите и зарисуйте результаты опыта.*

Для опыта:

1. Культура донора E.coli, Hfr, Pro+, Ura+, His+, Strs – эта культура имеет фактор фертильности, интегрированный в хромасому и является прототрофной (способной к синтезу пролина, урацила, гистидина), но чувствительная к стрептомицину;
2. Культура реципиента E.coli, F-, Pro-, Ura-, His-, Strs – эта культура ауксотрофна по отношению к пролину, урацилу, гистидину, но резистентна к стрептомицину;
3. Чашка Петри с селективной средой для выявления рекомбинантов: синтетическая минимальная среда (задерживающая рост донора).

Ход работы: К 2 мл культуры реципиента добавьте 1 мл культуры донора. Посевы поставьте в термостат на 30 мин. После инкубации сделайте высев из опытной пробирки на селективную среду и на эту же среду на секторы посейте для контроля культуры донора реципиента.

Учет результатов: при конъюгации контрольные посе́вы на селективных средах стерильны. На средах с антибиотиками наблюдается рост колоний рекомбинантов.



*Задание №3: Опишите и зарисуйте результаты опыта.*

Для опыта:

1. Культура реципиента – золотистый стафилококк, чувствительный к стрептомицину.
2. Пробирка с ДНК прототрофного штамма (выделенная из культуры донора – стафилококка, устойчивого к стрептомицину).
3. Чашки Петри с селективной средой – МПА сл стрептомицином.

Ход работы: В стерильную пробирку налейте 1 мл бульонной культуры реципиента и 1 мл раствора ДНК донора. Смесь поместите в термостат на 30 мин. Затем сделайте высев петлей на селективную среду из опытной пробирки и для контроля из пробирки с культурой реципиента.

Учет результатов: при трансформации контрольные посе́вы на селективных средах стерильны. На средах с антибиотиками наблюдается рост колоний рекомбинантов.



**СРС:** Введение в биотехнологию и генную инженерию. Цели, задачи биотехнологии и генной инженерии. Получение рекомбинантных штаммов микроорганизмов.

Зарисовать этапы ПЦР. Записать области применения данного метода диагностики.

Составить конспект по методам культивирования облигатных паразитов. Отразить этапы культивирования в основных биологических моделях (клеточные культуры и куриные эмбрионы)

Занятие № 12

Дата \_\_\_\_\_

### Итог по разделу «Физиология и генетика микроорганизмов»

#### *Контрольные вопросы занятию*

1. *Химический состав микроорганизмов.*
2. *Питание бактерий. Классификация бактерий по типам питания. Голофитный способ питания.*
3. *Механизмы транспорта питательных веществ у бактерий. Секреция молекулы бактерий, типы секреции.*
4. *Основные методы культивирования бактерий. Требования, предъявляемые к питательным средам. Классификация питательных сред.*
5. *Рост и размножение бактерий.*
6. *Пигменты. Классификация пигментов. Значение пигментообразования.*
7. *Биологическое окисление у бактерий (виды энергетического метаболизма). Брожение, типы брожения. Дыхание бактерий*
8. *Классификация бактерий по типам дыхания. Методы культивирования анаэробов.*
9. *Методы создания анаэробнозона и выделение чистой культуры анаэробов.*
10. *Выделение чистых культур аэробных бактерий.*
11. *Изучение культуральных и биохимических свойств выделенных культур микроорганизмов.*
12. *Ферменты бактерий, их свойства, классификация. Роль и значение ферментов.*
13. *Особенности культивирования облигатных паразитов.*
14. *Химический состав вирусов.*
15. *Репродукция вирусов (ДНК, РНК+ и РНК-).*
16. *Типы и этапы взаимодействия вируса с клеткой.*
17. *Практическое применение бактериофагов.*
18. *Строение генетического аппарата микроорганизмов. Генотип, фенотип бактерий, виды изменчивости.*
19. *Фенотипическая изменчивость.*
20. *Генетическая изменчивость, ее виды. Репарации у бактерий.*

21. Мутации, диссоциации.
22. Трансформация.
23. Трансдукция.
24. Конъюгация.
25. Плазмиды, транспозоны, Is-последовательности. Их роль.
26. Генная инженерия в медицине и биотехнологии.
27. Методы молекулярной генетической диагностики. Гибридизация нуклеиновых кислот, блоттинг нуклеиновых кислот. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
28. Понятие об экологии микроорганизмов. Микробные экосистемы и их компоненты (биоценоз, биотоп). Роль микробов в круговороте веществ в природе. Виды симбиоза. Антагонизм, формы антагонизма.
29. Действие физических факторов на микроорганизмы. Стерилизация: определение, методы стерилизации.
30. Влияние химических факторов на микроорганизмы. Антисептика, определение. Классификация антисептиков, требования к антисептикам, механизмы действия.
31. Асептика, виды асептических мероприятий. Дезинфекция. Определение, виды и способы дезинфекции.
32. Антибиотики. Определение, требования к антибиотикам. Классификация антибиотиков: по происхождению, по спектру действия.
33. Классификация антибиотиков по химической структуре и механизму действия. Основные группы антибиотиков.
34. Классификация побочных реакций антимикробных препаратов. Ограничения антибиотикотерапии.
35. Диффузионные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Критерии устойчивости.
36. Методы серийных разведений определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Критерии устойчивости: МИК, МБК. Автоматизированные методы определения.
37. Механизмы развития лекарственной устойчивости. Пути преодоления резистентности микроорганизмов к лекарственным препаратам.

Занятие № 13

Дата \_\_\_\_\_

### Тема: Нормальная микрофлора организма человека.

#### ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:

1. Знать теоретический материал по теме занятия.
2. Освоить методы оценки состояния микрофлоры толстого кишечника, полости рта и кожи рук.

#### ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:

1. Микрофлора тела человека, значение. Микрофлора отдельных биотопов тела человека.
2. Этапы становления нормальной микрофлоры
3. Дисбактериоз: причины. Препараты для лечения дисбактериоза (пробиотики). Профилактика дисбактериоза.



Зад. № 1: перечислите функции нормальной микрофлоры:

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)

- 5)
- 6)
- 7)
- 8)
- 9)
- 10)



*Зад №2: Заполните таблицу «Характеристика биотопов тела человека»*

Название биотопа и краткая характеристика		Индигенная микрофлора		Транзиторная микрофлора	
		представители	количество (КОЕ)	представители	количество (КОЕ)
Кожа					
Верхние дыхательные пути	Полость носа				

	<b>Носоглотка</b>				
<b>Урогенитальный тракт</b>	<b>Влагалище и цервикальный канал</b>				
	<b>Уретра</b>				
<b>Желудочно-кишечный тракт</b>	<b>Ротовая полость</b>				
	<b>Желудок</b>				

	<b>Тонкий кишечник</b>				
	<b>Толстый кишечник</b>				

☆ Зад. №3: заполните таблицу «Характеристика основных представителей индигенной микрофлоры тела человека»

	<b>Род, вид</b>	<b>Морфология</b>	<b>Биологические и культуральные свойства</b>	<b>Локализация</b>	<b>Микропрепарат</b>
--	-----------------	-------------------	---	--------------------	----------------------

Коринобактерии					
Е.coli Эшерихии					
Лактобактерии					
Бифидобактерии					

Энтерококки					
Эпидермальный и сапрофитный стафилококк					

★ Зад. №4 Перечислите причины развития дисбактериоза

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

★ Зад. №5: Заполните таблицу «Препараты для коррекции и профилактики дисбиотических нарушений»

Группа препаратов	Название	Состав
Пробиотики		

<b>Пребиотики</b>		
<b>Симбиотики</b>		
<b>Пробиотические продукты функционального питания</b>		



### Лабораторная работа № 1.

#### Изучение микрофлоры кожи

**Цель:** оценить результаты посевов с кожи рук методом смывов на МПА и среде Эндо.

#### а) Среда МПА

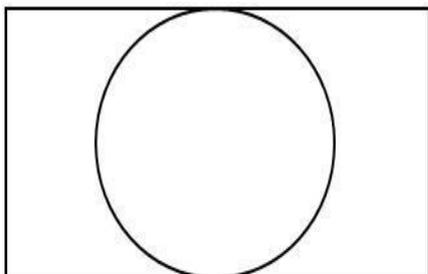
Описать культуральные свойства колоний, выросших на МПА. Результаты внести в таблицу

Тесты	Колонии	
	№ 1	№ 2
Размер		
Форма		
Характер края		
Поверхность		

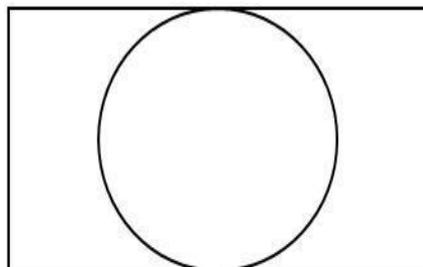
Цвет		
Структура		
Прозрачность		
Вязкость		

- из описанных колоний приготовить мазки, окрасить по Граму. Зарисовать.

№ 1 Результат:



№ 2 Результат:



#### б) Среда Эндо

Изучить посевы на среде Эндо с целью выявления кишечной палочки ( $lac^+$  колонии).

Отметить наличие или отсутствие фекального загрязнения.

Результат:

Вывод:



#### **Методика микробиологического исследования фекалий с целью определения нормальной микрофлоры и исключения дисбактериоза кишечника.**

Забор фекалий производится стерильной стеклянной палочкой в стерильную взвешенную посуду, забирают теплые нативные фекалии, доставляют в лабораторию не позднее чем через 4 часа.

Исследуемые фекалии помещают в тиогликолевый буфер (способствующий сохранению как аэробной, так и анаэробной микрофлоры), затем готовят десятикратное разведение надосадочной жидкости в физиологическом растворе и высеивают на селективные и дифференциально-диагностические среды, соответственно группам выделяемых микроорганизмов, как аэробов, так и анаэробов.

Посевы на факультативные анаэробы инкубируют в обычном термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ . Из выросших подозрительных колоний выделяют чистую культуру микроорганизма, проводят полное изучение всех свойств (культуральных, морфологических, биохимических, патогенных и др.), идентифицируют до вида, подвида, типа.

Идентификацию проводят как для выделенных патогенных и условно-патогенных возбудителей, так и представителей нормальной микрофлоры кишечника. Одновременно на чашках подсчитывают количество выросших колоний определённого рода, вида и производят определение количества микроорганизмов (КОЕ) в 1г. фекалий, при подсчёте учитывают посевную дозу и разведения в буфере, из которых сделан высеv. Полученные результаты

сравнивают со справочными данными и делают заключение о состоянии микрофлоры кишечника.

## **Характеристика культуральных и морфологических свойств основных представителей микрофлоры кишечника человека.**

### **1. Бифидобактерии.**

Грам+ неспорообразующие палочки, строгие анаэробы. Занимают доминирующее положение в облигатной микрофлоре кишечника здорового человека, обладают высокой антагонистической активностью. Своё название получили из-за характерного разветвления на конце палочек – бифуркаций.

*Культуральные свойства:* культивирование проводится на специальной питательной среде Блоурокка, в пробирках в анаэробных условиях. На среде Блоурокка, в толще среды, бифидобактерии дают характерный придонный рост – в виде “точек с хвостиками” или маленьких комочков.

*Морфологические свойства:* в мазке регистрируются характерные Грам+ палочки с разветвлёнными или утолщёнными концами, расположенные в виде римских пятёрок или скоплений, напоминающих китайские иероглифы.

### **2. Лактобактерии**

Грам + неспорообразующие палочки, микроаэрофилы. Обладают антагонистической активностью, связанной с выработкой молочной кислоты, спирта, антибиотикоподобных веществ и др. Лактобациллы участвуют в создании колонизационной резистентности, обладают иммуномодулирующим эффектом, способствуют выработке секреторных иммуноглобулинов.

*Культуральные свойства:* культивирование проводится на специальной питательной среде MRS-агар. На среде MRS-агар лактобактерии образуют крупные колонии, гладкие или шероховатые, белого цвета.

*Морфологические свойства:* в мазке обнаруживаются крупные Грам+ палочки, иногда ветвящиеся.

### **3. Эшерихии.**

Грам– палочки, факультативные анаэробы. Эшерихии появляются в организме человека с рождения и присутствуют в нем на протяжении всей жизни. Выполняют следующую роль в организме: участвуют в образовании витаминов группы В и витамина К, участвуют в переработке сахаров, вырабатывают антибиотикоподобные вещества (колицины) которые борются с патогенными организмами, усиливают иммунитет.

*Культуральные свойства:* Эшерихии культивируют на специальной питательной среде Эндо. По характеру роста на среде Эндо энтеробактерии разделяют на лактозопозитивные и лактозонегативные. Лактозопозитивные утилизируя лактозу, приводят к преобразованию фуксина из связанного состояния в свободное. При этом колонии лактозопозитивных микроорганизмов окрашиваются в ярко красный цвет, а колонии лактозонегативных остаются неокрашенными или бледно розовыми. В ЖКТ человека могут присутствовать как лактозонегативные, так и лактозопозитивные эшерихии. Еще одним отличительным культуральным свойством Эшерихий является наличие характерного металлического блеска колоний.

*Морфологические свойства:* в мазке обнаруживаются Грам- палочки средней величины с закругленными концами расположенные группами.

### **4. Энтерококки.**

Это Грам + кокки, аэробы. Являются представителями стрептококков, участвуют в формировании колонизационной резистентности.

*Культуральные свойства:* Культивирование энтерококков проводится на Энтерококковом агаре. На этой среде можно различить 2 вида энтерококков по культуральным свойствам – первый вид даёт мелкие или средних размеров колонии яркие, красно-вишнёвые (*E. faecalis*), второй вид – розовые, розовато-серые колонии (*E. Faecium*).

*Морфологические свойства:* в мазке видны короткие цепочки Грам+ кокков, иногда вытянутой формы или единичные кокки.

### 5. Стафилококки.

Грам+ кокки. Стафилококки колонизируют кишечник ребенка с первых дней жизни. Источником колонизации является микрофлора кожи людей, окружающих ребенка. Большинство видов стафилококков являются условно патогенными для человека. Род *Staphylococcus* включает в себя патогенный (*S. aureus*) и условно-патогенные (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) виды

*Культуральные свойства:* для культивирования стафилококков используют среды содержащие желток и большое количество соли (ЖСА и МЖСА). Патогенный стафилококк (*S. aureus*) обладает ферментом лейцитиназой, которая разлагает лейцитин (содержащийся в желтке), при этом вокруг колоний образуется радужная зона лейцитиназной активности. *S. aureus* может продуцировать желтый пигмент. На плотных питательных средах стафилококки образуют непрозрачные круглые ровные колонии, характерными признаками *S. aureus* является наличие лейцитиназной активности и желтый пигмент.

*Морфология:* в мазке обнаруживаются крупные Грам+ кокки, расположены группами в виде гроздьев.

### 8. Клостридии

Грам + спорообразующие палочки, строгие анаэробы. Участвуют в расщеплении желчных кислот, поддерживают колонизационную резистентность.

*Культуральные свойства:* Культивируют клостридии на специальных средах для анаэробов: среда Китта-Тароцци, кровяно-сахарный агар Цейсслера, среда Вильсон-Блера. На среде Китта-Тароцци дает диффузное помутнение и большое количество газа. На среде Вильсон-Блера – почернение ( за счет образование  $H_2S$ ) и разрывы среды.

*Морфология:* в мазке обнаруживаются Грам + толстые палочки со спорами.

### 7. Дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Кандиды относятся к транзитной микрофлоре.

*Культуральные свойства:* Элективной питательной средой для кандид является Сабуро-агар, на котором они образуют черные крупные колонии с характерным кислым запахом.

*Морфология:* грибы рода *Candida* состоят из овальных почкующихся дрожжевых клеток (4-8 мкм) псевдогиф и септированных гиф. В мазке, окрашенном по Леффлеру, видны крупные овальные клетки и прикрепленные к ним нити.

### ☆ Зад №6:

1) Оцените состояние микрофлоры толстого кишечника у обследуемого пациента, исходя из критериев нормальной микрофлоры взрослых.

Микроорганизмы	Содержание, КОЕ/г фекалий		Примечание
	Нормальная микрофлора, взрослые	Микрофлора обследуемого	
Бифидобактерии	$10^9 - 10^{10}$	$10^6$	
Лактобактерии	$10^7 - 10^8$	$10^5$	
Бактероиды	$10^9 - 10^{10}$	$10^9$	

Энтерококки	$10^5 - 10^8$	$10^7$	
Е.coli-типичные	$10^7 - 10^8$	$10^{10}$	
-гемолитические	0	$10^3$	
Стафилококки-золотистые	0	$10^5$	
Дрожжевые грибы рода Candida	$\leq 10^4$	-	

2) Заключение:

3) Назначьте коррекцию:



**СРС:** Становление нормальной микрофлоры человека. Дисбактериоз и принципы его коррекции.

### Словарь

Дайте определение терминам

Микробиоценоз-

Биотоп -

Аллохтонная микрофлора-

Аутохтонная микрофлора-

Колонизационная резистентность-

Дисбактериоз-

Пробиотики-

Пребиотики-

Симбиотики-

**Тема: Патогенность. Вирулентность**

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Освоить теоретический материал по теме занятия.
2. Знать сущность биологического метода исследования.
3. Научиться определять наличие факторов вирулентности у бактерий.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Патогенность и вирулентность. Генетические основы патогенности. Единицы измерения вирулентности.
2. Факторы адгезии микроорганизмов. Факторы инвазии микроорганизмов, ферменты инвазии. Активная секреция факторов патогенности микроорганизмами.
3. Эндотоксины, общая характеристика, строение, механизм действия.
4. Экзотоксины, классификация. Механизмы действия различных групп экзотоксинов.



*Зад. №1: Заполните таблицу «Факторы вирулентности микроорганизмов»*

Группа факторов вирулентности	Факторы вирулентности и механизм их действия	
	Фактор	Механизм
Факторы адгезии и колонизации		
Факторы инвазии		
Антифагоцитарные факторы		
Факторы токсичности		



*Зад. №2: Заполните таблицу «Отличие экзо- и эндо-токсинов»*

Свойство	Экзотоксин	Эндотоксин
----------	------------	------------

Химическая природа		
Происхождение		
Отношение к температуре		
Степень ядовитости		
Скорость воздействия		
Специфичность действия		
Антигенность		



### Классификация токсинов по механизму действия

По механизму действия на клетки макроорганизма бактериальные токсины делятся на несколько типов, хотя это деление достаточно условно и некоторые токсины могут быть отнесены сразу к нескольким типам:

- 1-й тип - *мембранотоксины* - гемолизины, лейкоцидины;
  - 2-й тип - *функциональные блокаторы*, или нейротоксины (тетаноспазмин, ботулинический токсин). Они блокируют передачу нервных импульсов в синапсах (в клетках спинного и головного мозга);
  - 3-й тип - термостабильные и термолабильные *энтеротоксины* - они активизируют клеточную аденилатциклазу, что приводит к нарушению энтеросорбции и развитию диарейного синдрома. Такие токсины продуцируют холерный вибрион (холероген), энтеротоксигенные кишечные палочки;
  - 4-й тип - *цитотоксины* - это токсины, блокирующие синтез белка субклеточном уровне. К ним относятся: энтеротоксин золотистых стафилококков, дерматонекротоксины стафилококков, палочек сибирской язвы, сине-зеленого гноя и возбудителя коклюша, а также антиэлонгаторы. Последние препятствуют элонгации (наращиванию) или транслокации, т. е. передвижению и-РНК вдоль рибосомы, и тем самым блокируют синтез белка. К антиэлонгаторам относят дифтерийный гистотоксин, токсин синегнойной палочки;
  - 5-й тип - *эксфолиатины*, образуемые некоторыми штаммами золотистого стафилококка, и эритрогенины, продуцируемые пиогенным стрептококком группы А. Они влияют на процесс взаимодействия клеток между собой и с межклеточными веществами, и полностью определяют клиническую картину инфекции. В первом случае возникает пузырчатка новорожденных, во втором - скарлатина.
- Многие бактерии образуют не один, а несколько белковых токсинов, которые обладают разным действием - нейротоксическим, цитотоксическим, гемолитическим, как, например, стафилококк, стрептококк. В то же время некоторые бактерии могут одновременно, образовывать как белковые экзотоксины, так и эндотоксины, например, кишечная палочка, холерный вибрион.

**Тема: Инфекционный и эпидемический процесс****ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Освоить теоретический материал по теме занятия.
2. Знать сущность биологического метода исследования.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Определение понятия «инфекционный процесс». Виды инфекционного процесса.
2. Условия для возникновения инфекционного процесса.
3. Динамика инфекционного процесса. Периоды и формы инфекционных заболеваний. Классификация инфекционных заболеваний.
4. Эпидемический процесс. Способы распространения инфекционных болезней (эпидемия, пандемия, спорадия, вспышка, эндемия).

**Эпидемический процесс (ЭП)** – это процесс возникновения и распространения инфекционных заболеваний среди людей.

**Механизм развития ЭП:**

1. Источники инфекций
2. Механизм передачи возбудителя
3. Восприимчивость организма

**Источник инфекции.****Классификация инфекционных заболеваний в зависимости от источника.**

*Антропоозы.* Главная среда обитания паразита – человек. Источником инфекции являются больные манифестными и бессимптомными формами заболевания (носители).

Манифестные формы – острые, стёртые и хронические.

Бессимптомные – транзиторное, реконвалесцентное и хроническое носительство возбудителей.

Схема течения ЭП – цепь связанных инфекционных заболеваний людей (грипп, скарлатина, дифтерия, сифилис и др.)

*Зоонозы.* Главная среда обитания возбудителя – животные, больные манифестными и бессимптомными формами заболевания.

Схема течения ЭП – веер заболеваний, передающихся от животных человеку (чума, бруцеллёз, туляремия, сибирская язва). Человек при большинстве этих инфекций – биологический тупик.

*Сапронозы.* Главная среда обитания возбудителей – внешняя среда (вода, почва и т.д.) Объекты окружающей среды выступают в заражении как источники и факторы передачи инфекции (иерсиниозы, легионеллёз, столбняк, газовая гангрена, лептоспироз).

**Механизм передачи возбудителей.**

Под *механизмом передачи возбудителя* подразумевают эволюционно выработанные способы перемещения возбудителя из одного организма в другой, обеспечивающие поддержание его в природе как биологического вида.

*Пути передачи* – это совокупность процессов выделения возбудителя из источника, пребывания во внешней среде и внедрения в другой организм в конкретных условиях заражения, т.е. сочетание факторов передачи.

*Факторы передачи* – элементы внешней среды, с помощью которых возбудитель перемещается из одного организма в другой.

Четырём эпидемиологическим локализациям возбудителя в организме человека (дыхательные пути, кишечник, кровь, наружные покровы) соответствуют 4 механизма передачи:

МЕХАНИЗМ ПЕРЕДАЧИ	ПУТИ ПЕРЕДАЧИ	ФАКТОРЫ ПЕРЕДАЧИ
1. Аэрогенный	Воздушно-капельный	Капельки слизи при кашле, чихании, разговоре

	Воздушно-пылевой	Пыль во время уборки помещений, пыль сена, соломы, подстилки животных и птиц.
2. Фекально-оральный	Пищевой (алиментарный) Водный	Продукты питания  Вода рек, озёр, колодцев, водопроводная
3. Трансмиссивный	Собственно трансмиссивный  Искусственно трансмиссивный (парентеральный)  Вертикальный (трансплацентарный, внутриутробный)	Укусы насекомых (комаров, вшей, клещей, блох)  Переливание крови, медицинский инструментарий и т.п.  От матери плоду
4. Контактный	Собственно контактный (непосредственный контакт)  Контактно-бытовой	Без участия факторов передачи  Предметы обихода (полотенца, игрушки, одежда, обувь и т.д.)

Классификация инфекционных заболеваний в связи с локализацией и механизмом передачи возбудителей

КЛАССЫ	ГРУППЫ			
	Дыхательных путей	Кишечные	Кровяные	Контактные
АНТРОПОНОЗЫ	Грипп и др. ОРВИ, корь, краснуха, паротит, ветряная и натуральная оспа;  Ангина и др. стрептококковые инфекции, стафилококковые инфекции, менингококковая инфекция, дифтерия, туберкулёз и т.д.	Дизентерия, брюшной тиф и паратифы, полиомиелит, вирусный гепатит А и др.	Сыпной тиф, малярия, парентеральные гепатиты (В, С, Д), ВИЧ-инфекция, малярия.	Половые инфекции (сифилис, гонорея, трихомониаз и др.), эпидермофития, чесотка и др.
ЗООНОЗЫ	Трансмиссивные		Не трансмиссивные	
	Чума, туляремия, клещевые риккетсиозы, арбовирусные инфекции (клещевой энцефалит, геморрагические лихорадки), лейшманиоз и др.		Сальмонеллёзы, лептоспирозы, сибирская язва, орнитозы, бруцеллёз, бешенство и др.	

**Восприимчивость и иммунитет.**

Попавшие в организм человека (животного) микроорганизмы могут вызвать состояние инфекции лишь в случае восприимчивости этого организма к данному возбудителю.

*Восприимчивость* – способность человека или животного реагировать на внедрение в организм возбудителей инфекции развитием болезни или носительства.

Тот факт, что люди не реагируют на инфекционные агенты, вызывающие заболевания у животных, например, рожу свиней, инфекционную анемию лошадей, свидетельствует о том, что люди обладают видовой невосприимчивостью к целому ряду инфекционных агентов, а животные в свою очередь невосприимчивы ко многим заболеваниям людей.

Одной из задач эпидемиологии является предупреждение распространения инфекции в обществе, поэтому изучение факторов, обеспечивающих резистентность организма, имеет большое практическое значение.

*Резистентность* – способность сохранять генетическое постоянство внутренней среды при воздействии на организм болезнетворных агентов.

Неспецифическая резистентность на чужеродные агенты стереотипна, не зависит от природы стрессора, отличается быстротой и фазным характером реакций, регулируется гипофизарно-адреналовой системой. К механизмам неспецифической резистентности относят биологические барьеры, гуморальные и клеточные факторы, физиологические функции нервной, эндокринной и прочих систем.

Отличительной особенностью инфекционного процесса является выработка *специфического иммунного ответа* на внедрение возбудителя, который характеризуется образованием специфических иммунных белков (иммуноглобулинов, антител) и активацией Т-лимфоцитов.

### **Проявления эпидемического процесса**

*Эпидемический очаг* – место нахождения источника инфекции с окружающей его территорией в тех пределах, в которых он способен в данной конкретной обстановке при данной болезни передавать заразное начало. Эпидемический очаг является структурной ячейкой ЭП и местом, где должен осуществляться комплекс противоэпидемических мероприятий, направленных на ограничение распространения ЭП. Интенсивность распространения инфекции может быть различной, что и характеризуется соответствующими терминами.

*Спорадической заболеваемостью* принято называть обычный для данной территории уровень заболеваемости соответствующей болезнью, причём чёткой связи между отдельными заболеваниями установить, как правило, не удаётся.

*Эпидемическая вспышка* – это одновременно появившиеся групповые заболевания, охватывающие какой-либо коллектив или небольшой населённый пункт (часть населённого пункта). Заболевания объединены общим источником инфекции, общим путём передачи (например, вспышка ветряной оспы в детском коллективе; водная вспышка гепатита А и т.д.).

*Эпидемией* называется такой уровень заболеваемости, который значительно (в несколько раз) превышает уровень спорадической заболеваемости, причём это явление распространяется на значительную территорию (город, область, государство). Эпидемия имеет эпицентр – место, где она началась и откуда распространилась на другие территории.

*Пандемия* – особо значительная эпидемия как по интенсивности заболеваемости, так и по территории, на которой она распространилась. Иногда пандемии охватывали все континенты, например, грипп, холера, чума.

В эпидемиологии известно и иное распространение инфекционных болезней, когда они более или менее постоянно регистрируются среди населения определённой территории, но не имеют тенденции к распространению за её пределы. Такой тип заболеваемости называют *эндемичным*. Причиной эндемии могут быть природные и социальные факторы. Например, москитные лихорадки регистрируются в местах обитания этих насекомых.

## **Словарь**

Дайте определение терминам:

**Инфекция-**

**Реинфекция -**

**Рецидив -**

Эндогенная инфекция-

Экзогенная инфекция-

Суперинфекция-

Микстинфекция-

Эпидемия-

Пандемия-

Зооноз-

Антропоноз-

Зооантропоноз-

Сапроноз-

Инфекционный процесс-

Патогенность-

Вирулентность-

Адгезия-

Инвазия-

Колонизация -

Экзотоксин-

Эндотоксин-

Входные ворота-

Инфицирующая доза-

Летальная доза 50% (DL<sub>50</sub>)-

Минимальная летальная доза (DLM)-

Абсолютная летальная доза (DCL)-



**СРС:**

1. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов, эндогенных инфекций.
2. Понятие о внутриутробных, внутрибольничных и особо опасных инфекциях.

Занятие № 16

Дата \_\_\_\_\_

**Итог по разделу «Экология микроорганизмов»**

**Контрольные вопросы**

1. **Общая характеристика и классификация микрофлоры человека. Понятие о биотопах и индигенных микроорганизмах.**
2. **Нормальная микрофлора организма человека и ее физиологические функции. Понятие об эубиозе и колонизационной резистентности.**
3. **Дисбиозы. Дисбактериозы. Препараты для восстановления нормальной микрофлоры: пробиотики, эубиотики.**
4. **Понятие об инфекции. Условия возникновения инфекционного процесса.**
5. **Формы инфекции. Стадии развития и характерные признаки инфекционной болезни**
6. **Патогенность и вирулентность бактерий. Факторы патогенности.**
7. **Токсины бактерий, их природа, свойства. Экзо- и эндотоксины. Механизмы действия.**
8. **Условно-патогенные микроорганизмы (УПМ). Инфекционный процесс, вызванный УПМ, условия для возникновения.**
9. **Эпидемический процесс. Понятие об источниках, механизмах и путях передачи инфекционных заболеваний. Понятие об антропонозных, зоонозных и арбовирусных инфекциях. Эпидемиологические характеристики.**
10. **Понятие об особо опасных инфекциях (ООИ). Возбудители, Особенности эпидемического процесса и микробиологической диагностики ООИ.**

**План практических занятий по разделу «Санитарная микробиология»**

- 1) Предмет и задачи санитарной микробиологии. Объекты исследования, санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО). Методы санитарно-микробиологического исследования (воды, почвы, воздуха).
- 2) Санитарные исследования в медицинских учреждениях (оценка состояния окружающей среды, воздуха, исследование на стерильность инструментов, перевязочного и хирургического материала). Понятие о внутрибольничных инфекциях (ВБИ).
- 3) Методы санитарно микробиологического исследования пищи. СПМО, оценка качества продуктов. Понятие о ПТИ.
- 4) Итоговое занятие по разделу «Санитарная микробиология»

**Тема: Санитарно-микробиологическая характеристика объектов окружающей среды****ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЗАНЯТИЯ:**

1. Знать теоретический материал по теме занятия.
2. Освоить методы оценки санитарного состояния воздуха, воды.
3. Научиться брать смыв с рук и проводить санитарно-бактериологическое исследование для оценки санитарного состояния рук.

**ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ:**

1. Общая характеристика микробиоты окружающей среды и задачи санитарной микробиологии.
2. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах; требования предъявляемые к ним.
3. Принципы и методы санитарно-микробиологических исследований.
4. Санитарная микробиология воды и методы исследования микробиологических показателей воды.
5. Санитарная микробиология воздуха и методы исследования микробиологических показателей воздуха.
6. Санитарная микробиология почвы и методы исследования микробиологических показателей



*Задание №1 : Заполните таблицу «Санитарно-показательные бактерии окружающей среды и пищевых продуктов».*

<b>Объекты</b>	<b>Характер загрязнения</b>	<b>Санитарно-показательные микроорганизмы</b>
Вода		
Почва		
Пищевые продукты		
Предметы обихода		
Воздух		

**Принципы проведения санитарно-микробиологических исследований**

1. Правильный забор проб - а) с соблюдением стерильности; б) правил транспортировки, позволяющих избежать искажения результатов; в) быстрое проведение исследований или сохранение материала до анализа в холодильнике (не дольше 6-8 часов).
2. Серийность проведения анализов. Для получения адекватных результатов проводят забор серии проб из разных участков объекта. В лаборатории образцы смешивают, затем точно отмеряют необходимое количество материала (среднее по отношению к материалу в целом).

3. Повторность отбора проб, позволяющую получить более достоверную информацию по загрязнению объекта.
4. Применение только стандартных унифицированных методов исследования для получения сравнимых результатов.
5. Использование комплекса тестов.
6. Проведение оценки объектов по совокупности полученных результатов с учетом других показателей - органолептических, химических, физических.

Методы проведения санитарно-микробиологических исследований предусматривают определение общей микробной обсемененности (ОМЧ), определение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов, выявление в исследуемых объектах патогенных микробов и их метаболитов.

ОМЧ расценивается как показатель интенсивности загрязнения окружающей среды органическими веществами.

**Санитарно-показательными называют микроорганизмы (СПМО),** по которым можно косвенно судить о возможном присутствии патогенов в окружающей среде.

Содержание СПМО определяют: 1) прямым подсчетом с помощью специальных камер или электронным счетчиком, предварительно гомогенизируя пробу и внося краситель (эритрозин). Методика позволяет отличить живые от погибших бактерий; 2) посевом на питательные среды.

СПМО должны удовлетворять следующим характеристикам: а) постоянно обитать в естественных полостях человека и животных и выделяться в окружающую среду; б) не должны размножаться вне организма, исключая пищевые продукты; в) длительность их выживания в окружающей среде должна быть не меньше, и даже несколько больше, чем у патогенов; г) устойчивость СПМО в окружающей среде должна быть аналогичной или превышать таковую у патогенных микроорганизмов; д) у СПМО не должно быть в окружающей среде «двойников»; е) микроб не должен изменяться в окружающей среде; ж) методы индикации и идентификации СПМО должны быть простыми.



### Микрофлора воздуха

**Санитарно-микробиологическое состояние воздуха** закрытых помещений оценивают по микробному числу - количеству особей, обнаруживаемых в 1 м<sup>3</sup> воздуха, наличие санитарно-показательных бактерий - представителей микрофлоры дыхательных путей - гемолитические стрептококки, золотистый стафилококк.

#### Критерии оценки воздуха жилых помещений

Оценка воздуха	Общее количество бактерий в 1 м <sup>3</sup>	Количество стрептококков
<b>Лето</b>		
чистый	до 1500	до 16
загрязненный	до 2500	до 36
<b>Зима</b>		
чистый	до 4500	до 36
загрязненный	до 7000	до 124

#### Нормативные показатели микробной обсемененности воздуха в помещениях больницы

Операционные	ОМЧ	Золотистый стафилококк (в 250 л)
До начала работы	Не более 500	Не допускается
Во время работы	Не более 1000	Не допускается

Родильные комнаты	Не более 1000	Не допускается
Палаты для недоношенных детей	Не более 750	Не допускается

**Седиментационный метод (по Коху)** - оседание микробов под действием силы тяжести - является простым способом изучения микрофлоры воздуха. Он заключается в том, что чашки Петри со средой оставляют открытыми на определенное время (5-10 минут на общую обсемененность и не менее 40 минут на кокковую микрофлору), затем их закрывают, надписывают и выдерживают в термостате 24 часа и 24 часа при комнатной температуре. Количество выросших колоний соответствует степени загрязненности воздуха: по приблизительному подсчету на площадь 100 см<sup>2</sup> в течение 5 минут оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Расчет числа микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха при заборе материала седимтационным методом:

1. Определяют среднеарифметическое число колоний, выросших на двух чашках (общее число выросших колоний на двух чашках суммируют и делят на 2)
2. Определяют ОМЧ в 1 м<sup>3</sup> воздуха по формуле Омелянского, где:
  - а – среднеарифметическое число колоний на чашке
  - S – площадь чашки Петри, см<sup>2</sup>
  - T – время экспозиции в мин.
  - б – экспозиция чашек по Омелянскому (за 5 мин на чашку Петри площадью 100 см<sup>2</sup> оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха)
  - 100 – пересчет площади чашки на 100 см<sup>2</sup>.
  - X – ОМЧ в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

$$X = ((a * 100 * 5) / S * T) * 100$$

**Таблица расчета числа бактерий в 1 м<sup>3</sup> воздуха В.Л. Омелянского**

№ п.п.	Диаметр чашки	Площадь чашки, в см <sup>2</sup>	Множитель
1	8	50	100
2	9	63	80
3	10	78	60
4	11	95	50
5	12	130	45

**Аспирационный метод (метод Кротова)** - более точный количественный метод определения микробного числа воздуха. Посев воздуха осуществляется с помощью прибора.

Аппарат Кротова устроен таким образом, что воздух с заданной скоростью просасывается через узкую щель плексигласовой пластины, закрывающей чашку Петри с питательным агаром. При этом частицы аэрозоля с содержащимися на них микроорганизмами равномерно фиксируются на всей поверхности среды благодаря постоянному вращению чашки под входной щелью.

После инкубации посева в термостате проводят расчет микробного числа по формуле:

$$x = \frac{a \times 1000}{V}$$

$x$  – количество микробов в м<sup>3</sup> воздуха;

$a$  – количество выросших на чашке колоний;

$V$  – объем пропущенного через прибор воздуха, дм<sup>3</sup>;

1000 – искомый объем воздуха, дм<sup>3</sup>.

## Микрофлора

### воды

**Санитарно-микробиологическое состояние воды** оценивается по: 1) микробному числу - количеству мезофильных хемоорганотрофных бактерий в 1 мл воды; 2) коли-титру - наименьшему объему воды (мл), в котором обнаруживается БГКП и 3) коли-индексу - количеству БГКП в 1 л воды. Кроме того, в воде определяют наличие энтерококков, сальмонелл, энтеровирусов. Согласно ГОСТу на питьевую водопроводную воду, ее коли-титр должен быть не менее 300 мл, коли-индекс - не более 3, общее микробное число - не более 100.

**Нормативы:** ОМЧ не более 100, коли-титр - 333 мл, коли-индекс не более 3.

*Посев воды глубинным методом Коха для определения общего микробного числа воды.* Стерильной пипеткой набрать 1 мл исследуемой воды и вылить содержимое пипетки в стерильную чашку Петри. Сверху налить 12 – 15 мл расплавленного и остуженного до 45С МПА. После застывания агара поместить чашку в термостат. Инкубируют в течении суток при 37С. После инкубации подсчитывают количество выросших колоний. ОМЧ воды равно числу выросших колоний, так как был произведен посев 1 мл воды, а ОМЧ воды – это количество микробов в 1 мл воды. Если ОМЧ водопроводной воды менее 50 – вода отвечает требованиям микробиологической чистоты по микробному числу. Если ОМЧ исследуемой дистиллированной воды менее 10-15 оценивают дистиллированную воду как отвечающей требованиям микробиологической чистоты по микробному числу.

*Метод мембранных фильтров.* Мембранный фильтр помещают в воронку Зейтца, вмонтированную в колбу Бунзена, которая присоединяется к вакуумному насосу. Воду фильтруют в объеме 500 мл. Затем фильтры Зейтца помещают на поверхность среды Эндо в чашки Петри и после инкубации при 37°С в течение суток подсчитывают количество выросших колоний, типичных для БГКП. Рассчитывают число КОЕ колиморфных бактерий в 100 мл воды по формуле:

$$X = a \cdot 100 / V,$$

где  $X$  – КОЕ колиморфных бактерий в 100 мл;

$V$  – общий объем воды, профильтрованный через 3 фильтра;

$a$  – общее число колоний колиморфных бактерий, подсчитанных на 3 фильтрах.

Из 2-3 колоний красного цвета готовят мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, позволяющий дифференцировать бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter* от грамтрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. Для этого фильтр с выросшими на нем колониями бактерий переносят пинцетом, не переворачивая, на кружок фильтровальной бумаги, смоченной диметил-пфенилендиамином. При наличии оксидазы индикатор окрашивает колонию в синий цвет. 2-3 колонии, не изменившие первоначальную окраску, засевают в полужидкую среду с 0,5% раствором глюкозы. Посевы инкубируют в течение суток при 37°С. При наличии газообразования подсчитывают число красных колоний на фильтре и определяют коли-индекс.

## Нормативы бактериальной чистоты воды

Наименование объекта контроля	Определяемые показатели микробиологической чистоты	Требование
Вода питьевая	Микробное число (КОЕ/мл)	Не более 50
	Общие и термотолерантные колиформные бактерии (вз пробах по 100мл воды)	Отсутствуют
	Колифаги (в 100мл воды)	Отсутствуют
	Споры сульфитредуцирующих клостридий (в 20мл воды)	Отсутствуют
Вода очищенная	Микробное число (КОЕ/мл)	Не более 100
	Представители Enterobacteriaceae, Ps. aeruginosa, St.aureus	Отсутствуют
Вода для инъекционных растворов	Микробное число (КОЕ/мл)	Не более 15 (обеспечивает апиrogenность)

### Микрофлора почвы

**Санитарно-микробиологическое состояние почвы** оценивается на основании сопоставления количества термофильных бактерий и бактерий - показателей фекального загрязнения. Почвы, с преобладанием санитарно-показательных бактерий, расцениваются как санитарно-неблагополучные, загрязненными фекалиями человека или животных. Присутствие в почве E. coli и Streptococcus faecalis указывает на свежее, бактерий родов Citrobacter и Enterobacter - на несвежее, а Clostridium perfringens - на давнее фекальное загрязнение. Более точная оценка проводится с помощью определения коли-индекса - количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП), обнаруженных в 1г почвы, перфрингенс-титра - масса почвы (в граммах), в которой обнаружена 1 особь Clostridium perfringens, общей численности сапрофитных, термофильных и нитрифицирующих бактерий в 1г почвы.

**Нормативы:** чистая почва: коли-титр - 1 и выше; перфрингенс-титр - 0,01 и выше; ОМЧ- 100-1000. Загрязненная почва: коли-титр - 0,9 - 0,01; перфрингенс-титр - 0,009-0,0001; ОМЧ-1000-100000. Сильно загрязненная почва: коли-титр - 0,009 и ниже; перфрингенс-титр - 0,00009 и ниже; ОМЧ - 10000-4000000. **Ход исследования.** ОМЧ. Почву берут на глубине 10-15 см стерильным ножом (из разных мест не менее 10 проб) в стерильную банку. Из проб готовят навеску 30 г, которую вносят в колбу с водой (270 мл) и тщательно встряхивают. Готовят разведения  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Из 2-х последних разведений 0,1 мл смешивают с 40 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45°C МПА, после чего выливают двойным слоем в чашки с 2% агаром. Инкубируют в термостате. Подсчитывают количество выросших колоний.

*Определение коли-титра, перфрингенс-титра.*

Различные разведения почвенной суспензии засевают по 1 мл в пробирки со **средой Кесслера** (1л дистиллированной воды, 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи, 10 г лактозы; pH 7,4-7,6; 4 мл 1% водного раствора генцианового фиолетового). Разливают в пробирки с поплавками. Инкубируют при 43°C 48 часов. При получении в средах газообразования и помутнения производят высев петлей на среду Эндо. Отбирают типичные для кишечной палочки колонии, делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При выявлении в мазках Гр- палочек ставят пробу на оксидазу. Если проба отрицательная (изменение окраски на синий цвет) проверяют ферментативные свойства выделенной культуры посевом на полужидкую среду с глюкозой. Появление в среде кислоты и газа подтверждает наличие E. coli. Определяют коли-титр по наименьшему объему, в котором обнаруживают БГКП.

Для определения перфрингенс-титра различные разведения почвенной суспензии засевают в пробирки со стерильной железосульфитной средой Вильсон-Блера. Инкубация при 43°С 48 часов. Учитывают результаты по образованию черных колоний *Cl. perfringens* в агаровом столбике среды. Мазки окрашивают по Граму, микроскопируют (Гр+ крупные палочки со спорами овальной формы, центрального или субтерминального расположения), вычисляют перфрингенс-титр (наибольшее разведение посевного материала, посев которого приводит к почернению и разрыву среды впервые 12 часов роста при 43°С).



## Лабораторная работа №1 Санитарно-бактериологическое исследование воздуха седиментационным и аспирационным методами

**Цель:**

**Ход работы:**

**Результат:**

**Выводы:**

Занятие № 18

Дата

### **Санитарно-микробиологический контроль в лечебных учреждениях.**

#### **Микрофлора рук и предметов окружающей среды**

Санитарный надзор за состоянием объектов общественного питания и пищеблоков в лечебных и детских учреждениях осуществляется взятием смывов с рук обслуживающего персонала, с посуды, поверхности столов, досок и т. д. При взятии смыва с рук пользуются стерильными ватными тампонами, которые перед употреблением смачивают в среде Кесслера, содержащейся в пробирке, в которой находится тампон. Смывы делают с обеих рук, тщательно протирая ладони, межпальцевые промежутки и подногтевые пространства сначала левой руки, а затем правой. Смывы с поверхности предметов делают с помощью трафаретов из проволоки, имеющих площадь 25 см<sup>2</sup>. Посевы выдерживают в термостате при температуре 43°С в течение суток. При наличии брожения в среде Кесслера делают высев на среду Эндо. Колонии, подозрительные на кишечную палочку, подвергают дальнейшей идентификации.

#### **Санитарно-микробиологический контроль в лечебных и детских учреждениях.**

Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода и окружающей обстановки проводится для осуществления контроля за общим гигиеническим состоянием и определения фекальной загрязненности и контаминации патогенными микроорганизмами объектов окружающей среды как возможных факторов при передаче возбудителей инфекционных болезней. При плановых исследованиях в детских учреждениях, родильных домах, клиниках хирургического профиля определяют общую обсемененность воздуха, исследуют загрязненность предметов обихода, оборудования и рук персонала.

Главным источником микробного загрязнения является человек: его выделения верхних дыхательных путей, испражнения, слущивающийся эпидермис, волосы, содержащие различные микроорганизмы – сапрофиты, условно-патогенные и патогенные.

Попавшие на объекты окружающей среды микроорганизмы, в том числе и патогенные, как правило, не размножаются на них. Такие объекты служат пассивными посредниками при передаче возбудителей инфекционных болезней и условно-патогенной микрофлоры. В основном это возбудители кишечных и капельных инфекций. Возможность заражения человека при таких условиях зависит от концентрации микроорганизмов, вирулентности, сроков выживания их на предметах обихода и т.д. Большая часть микроорганизмов погибает в первые часы пребывания на объектах окружающей среды, за исключением тех, которые остаются в складках, трещинах, впадинах, где они меньше подвергаются высыханию и инсоляции. Длительно могут сохраняться и спорообразующие микробы.

Санитарно-микробиологические исследования проводят при: 1) текущем санитарном надзоре в детских учреждениях и на пищевых предприятиях; 2) микробиологическом контроле санитарно-гигиенического режима лечебных учреждений; 3) обследований в очагах при острых инфекционных болезнях по эпидемическим показаниям; 4) предупредительном санитарном надзоре; 5) выяснении причин разрушения и порчи некоторых объектов.

Объектами исследования в детских учреждениях являются инвентарь, одежда, постельное белье, одеяла, посуда, игрушки, соски и т.д. В кухонных блоках детских учреждений и на предприятиях общественного питания, пищевой промышленности объектами исследования являются оборудование (столы, разделочные доски, ножи, мясорубки и т.д.), посуда, санитарная одежда, особенно у работников на конечных этапах выдачи пищи (продавцы, буфетчики, раздатчики и др.), и руки персонала.

Для оценки санитарно-гигиенического режима клиник хирургического профиля и родовспомогательных учреждений 1 раз в месяц определяют общую микробную обсемененность воздуха операционных, комнат для рожениц и новорожденных, наличие санитарно-показательных и условно-патогенных микроорганизмов: БГКП, золотистый стафилококков, синегнойной палочки и протеев.

#### **Длительность сохранения жизнеспособности патогенных бактерий на объектах окружающей среды.**

Микроорганизмы	Сроки выживания (в днях)			
	На бумаге	На тканях и одежде	На игрушках	На стеке (посуде)
Сальмонеллы брюшного тифа	60	до 80	-	до 70
Шигеллы	14-60	17-36	-	до 25
Энтеропатогенные эшерихии	-	-	15-34	-
Вибрионы холеры	1	2-36	-	-
Коринебактерии дифтерии	8	5-28	до 150	до 18
Микобактерии туберкулеза	-	до 330	-	до 226

Один раз в неделю проводится санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода, оборудования, проверка на стерильность инструментария (шприцы, иглы, системы переливания крови), перевязочного и шовного материала, рук персонала, особенно хирургов. В родильных домах и отделениях также еженедельно проверяют на стерильность грудное молоко (применяемое для кормления детей), растворы для питья детей, вазелиновое масло, применяемое для туалета новорожденного, лекарственные вещества. При исследовании инвентаря родильных домов и больниц хирургического профиля определяют степень фекального загрязнения, а также обсемененность золотистыми стафилококками. Как в хирургических отделениях, так и в родильных домах проводится обязательное обследование всего медицинского персонала на присутствие золотистого стафилококка на слизистой оболочке носа и зева. Внеплановые обследования проводятся для контроля выполнения рекомендованных предложений по улучшению санитарного состояния и при вспышках внутрибольничных инфекций.

Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода по эпидемическим показаниям, т.е. в конкретном очаге, необходимо для выяснения возможных путей передачи инфекции. Исследование ведется в двух направлениях. Первое – определение степени биологической контаминации – фекальной и орально-капельной и второе – обнаружение патогенных микроорганизмов – возбудителей инфекционной болезни. Объектами исследования в этом случае являются предметы, окружающие больного: постельное белье, одежда, посуда, ручки дверей, игрушки, поверхность столов (обеденного и пеленального для маленьких детей), вода из графинов, руки людей, ухаживающих за больными и т.д. При этом исследованию подлежат предметы как бывшие в употреблении, так и чистые. По требованию эпидемиолога проводится также санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода в окружении больного, подвергнутых дезинфекции. Это необходимо для заключения об эффективности проведенного обеззараживания.

**Отбор проб** для санитарно-микробиологического исследования предметов обихода и оборудования проводится с помощью следующих методов: смывов (тампонами или салфетками), отпечатков (контактный метод) и агаровой заливки.

*Метод смывов.* При отборе проб с крупных плоских поверхностей (столы, подоконники, детские манежи, полы, стулья и т.д.) используются ватные или марлевые тампоны, которые перед употреблением смачивают изотоническим раствором хлорида натрия, водой или питательной средой (чаще мясопептонным бульоном или средой Кесслера). Тампоны вмонтированы в пробирки, на дно которых и наливается смачивающая жидкость в объеме 3-5мл. На исследуемую поверхность накладывают рамку-шаблон площадью 100 см<sup>2</sup> (10x10см), изготовляемый из проволоки. Перед взятием пробы шаблон стерилизуют в пламени горелки. Для взятия пробы тампон опускают до дна пробирки, затем влажным тампоном производят смыв и снова погружают в жидкость. При использовании салфеток их также перед взятием пробы смачивают стерильной жидкостью и после отбирания ими поверхностей переносят в колбу со смачивающей жидкостью для последующего исследования. Для получения смывов с мелких предметов (игрушки, соски, ложки, вилки, ножи и др.) протирают всю их поверхность. Смывы с мелких предметов можно получить, погрузив их непосредственно в колбу со стерильной жидкостью. В течение 10 минут их встряхивают, затем полученную смывную среду используют для посевов. Чайные чашки, стаканы, тарелки (наружные и внутренние их края до 2см) протирают салфеткой. Для проведения смывов с рук увлажненной стерильной марлевой салфеткой (размером 5x5см<sup>2</sup>) протирают руки обследуемого начиная с менее загрязненных участков кожи: тыльную часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подногтевые пространства. Салфетки помещают в колбы с увлажняющей жидкостью и транспортируют в лаборатории с соответствующим сопроводительным документом.

**Определение общей микробной обсемененности.** Ее определяют из смачивающей жидкости, применяемой при смывах. Посев производят по обычной методике определения общего микробного числа. В пробирках с тампонами или в колбах, содержащих салфетки (после проведения смывов), общий объем жидкости доводят до 10 мл, добавляя стерильный изотонический раствор хлорида натрия и получая исходное разведение 1:10. После интенсивного 2-3минутного встряхивания готовят десятикратные разведения. В зависимости от предполагаемой степени загрязненности посевают из нескольких разведений. Заключение по общей обсемененности дают на основании подсчетов по формуле:

$$M=n*10/S,$$

Где M – общая бактериальная обсемененность; n – количество колоний в 1 мл исходного разведения смыва; 10 – количество миллилитров смачиваемой жидкости; S – площадь, с которой произведен смыв, измеряемая в квадратных сантиметрах.

**Определение титра бактерий группы кишечных палочек в смывах.** Это исследование проводят бродильным методом.

При предполагаемой малой степени фекального загрязнения предварительно производят посев смыва на среду обогащения (среда Кесслера). При обнаружении БГКП контактным методом или методом агаровой заливки используют среду Эндо. Расчет числа БГКП ведут на

1 см<sup>2</sup> поверхности исследуемого предмета. Идентификация выделенных культур БГКП ведется, как при исследовании питьевой воды.

При оценке санитарно-гигиенического состояния предметов обихода и оборудования можно ориентироваться на критерии, разработанные и предложенные Л. В. Григорьевой и др.

**Критерии оценки по санитарно-микробиологическим тестам предметов обихода и оборудования.**

Оценка объекта	Общая микробная обсемененность	Титры	
		коли	энтерококка
Чистый	до 10 000	>1	>1
Умеренно загрязненный	10 000 – 100 000	1 – 0,1	>1 – 1
Сильно загрязненный	100 000	<0,1	<1

**Лабораторная работа №2.**

**Анализ микробной загрязненности объектов окружающей среды**

**Цель:**

**Ход работы:**

**Результат:**

**Выводы:**



**Лабораторная работа №3**

**Оценка собственной микрофлоры и микрофлоры загрязнения кожи рук**

**Ход:** сделать посев микрофлоры кожи рук методом смывов на МПА и на среду Эндо. Записать в тетрадь номер своего посева. Посевы изучить на следующем занятии.

**а) Среда МПА**

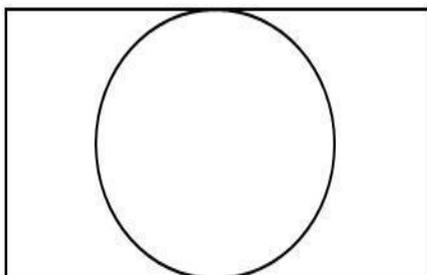
Описать культуральные свойства колоний, выросших на МПА. Результаты внести в таблицу

Тесты	Колонии	
	№ 1	№ 2
Размер		
Форма		
Характер края		

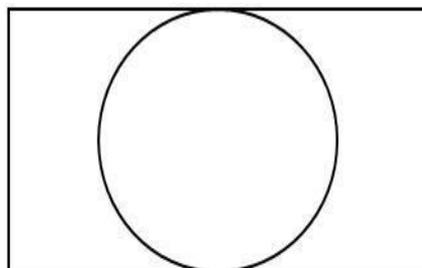
Поверхность		
Цвет		
Структура		
Прозрачность		
Вязкость		

- из описанных колоний приготовить мазки, окрасить по Граму. Зарисовать.

№ 1 Результат:



№ 2 Результат:



#### б) Среда Эндо

Изучить посевы на среде Эндо с целью выявления кишечной палочки ( $lac^+$  колонии).

Отметить наличие или отсутствие фекального загрязнения.

Результат:

Вывод:

Занятие №19

Дата:

### Санитарно-микробиологический контроль объектов продовольственного назначения

Пищевые продукты могут обсеменяться различными микроорганизмами, что приводит к их порче, развитию пищевых токсикоинфекций и интоксикаций, а так же таких инфекций, как сибирская язва, бруцеллез, туберкулез и др. заболевания животного, травмы, неблагоприятные условия его содержания способствуют нарушению защитных барьеров организма и транслокации (переносу) микроорганизмов в обычно стерильные ткани и органы (прижизненное обсеменение). В результате происходят обсеменение тканей забитого животного протейями, клостридиями и другими микробами, попадание при маститах в молоко стафилококков и стрептококков. Возможно и вторичное обсеменение микроорганизмами пищевых продуктов. В этом случае источником загрязнения являются объекты окружающей среды (почва, вода, транспорт и т.д.), а также больные люди и бактерионосители. При низкой температуре хранения мяса и мясных продуктов даже в замороженном мясе могут находиться микробы, способные к размножению в психрофильных условиях (псевдомонады, протей, аспергиллы, пенициллы и др.). микробы, обитающие в мясе, вызывают его ослизнение; в нем развиваются процессы брожения и гниения, вызванные клостридиями, протеем, псевдомонадами и грибами.

Злаковые культуры, орехи в условиях повышенной влажности могут загрязняться грибами (аспергиллами, пенициллами, фузариум и др.), что служит причиной развития пищевых микотоксикозов.

Мясные блюда (студни, салаты из мяса, блюда из мясного фарша) могут явиться причиной заболеваний, связанных с размножившимися в них сальмонеллами, шигеллами, диареогенными кишечными палочками, протеем, энтеротоксигенными штаммами стафилококков, энтерококками, *Clostridium perfringens* и *Bacillus cereus*.

Молоко и молочные продукты могут быть фактором передачи возбудителей бруцеллеза, туберкулеза и шигеллеза. Возможно также развитие пищевых отравлений в результате размножения в молочных продуктах сальмонелл, шигелл и стафилококков. Яйца, яичный порошок и меланж при эндогенном первичном инфицировании сальмонеллами яиц, особенно утиных, являются причиной сальмонеллеза. рыба и рыбные продукты чаще загрязняются бактериями *Clostridium botulinum* и *Vibrio parahaemolyticus* — возбудителями пищевых интоксикаций и токсикоинфекций. Эти заболевания наблюдаются и при употреблении рыбных продуктов, загрязненных большим количеством сальмонелл, протеев, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

Овощи и фрукты могут загрязняться и обсеменяться диареогенными кишечными палочками, шигеллами, протеем, энтеропатогенными штаммами стафилококков. Солёные огурцы могут быть причиной токсикоинфекций, вызванной *Vibrio parahaemolyticus*.

Все результаты микробиологического анализа пищевых продуктов могут быть получены не ранее 48 — 72ч, т.е. когда продукт уже может быть реализован. Поэтому контроль по этим показателям носит ретроспективный характер и служит целям санитарно-гигиенической оценки предприятия, производящего или реализующего пищевые продукты.

Обнаружение повышенной общей микробной обсемененности, колиформных бактерий позволяет предположить нарушение температурного режима при приготовлении и/или хранении готового продукта. Обнаружение патогенных микроорганизмов расценивают как показатель эпидемиологического неблагополучия столовой, предприятия торговли.

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу, т.е. нормируется масса продукта, в которой не допускаются бактерии группы кишечных палочек, большинство условно-патогенных микроорганизмов, а также патогенные микроорганизмы. В том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество КОЕ в 1г (см3) продукта.

В продуктах массового потребления, для которых в таблицах СанПиН 2.3.2.1078-01 гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов отсутствуют микробиологические нормативы, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не допускаются в 25г продукта.

Санитарно-бактериологическому контролю в обязательном порядке должны подвергаться объекты приготовления и реализации пищевой продукции.

Данные санитарно-микробиологического исследования дают возможность объективно оценить санитарно-гигиеническое состояние обследуемых объектов, выявить нарушения санитарного режима и оперативно проводить целенаправленные мероприятия по их устранению.

Различают несколько способов отбора проб с различного оборудования и инвентаря для микробиологического исследования: способы тампонных смывов, отпечатков, агарной заливки. Из них наиболее часто используют способ тампонных смывов. Санитарно-микробиологический контроль основан на обнаружении в смывах БГКП — показателей фекального загрязнения исследуемых предметов. Исследования на стафилококк, патогенные бактерии семейства кишечных, определение общей микробной обсемененности проводят по показаниям. Например, взятие смывов для обнаружения стафилококков необходимо при обследованиях кондитерских цехов, молочных кухонь и пищеблоков лечебных учреждений.

Объекты санитарно-микробиологического контроля:

- смывы с рук и спецодежды работников питания (водоснабжения);

- оборудование, инвентарь, посуда и другие объекты;
- готовые блюда, кулинарные и скоропортящиеся изделия;
- сырье и полуфабрикаты по ходу технологического процесса (по эпидемиологическим показаниям);
- питьевая вода централизованного и особенно децентрализованных источников водоснабжения.

Смывы с рук персонала, занятого обработкой сырых продуктов, забирают до начала работы. Смывы доставляют в бактериологическую лабораторию в течение 2ч. Допускается их хранение и транспортирование не более 6ч при 1 — 10С.

В лаборатории производят посевы смывов на среды Кесслер с лактозой или КОДА, при этом в пробирку со средой опускают тампон и переносят оставшуюся смывную жидкость. Посевы на средах Кесслер и КОДА инкубируют при 37С. Через 18 — 24ч из всех пробирок со средой Кесслер производят высеивание на секторы чашек со средой Эндо, со среды КОДА высеивание производят только в случае изменения окраски среды (из исходной фиолетовой до желтой или зеленой) или ее помутнения. Посевы на среде Эндо выращивают при 37С 18-24с.

Из колоний, характерных для БГКП, готовят мазки, окрашивают по Грамму, микроскопируют, при необходимости дополнительно идентифицируют по общепринятым тестам для БГКП. При оценке результатов санитарно-микробиологического обследования исходя из нормативов, что в смывах, взятых с объектов продовольственного назначения, БГКП должны отсутствовать. Обнаружение БГКП в смывах с поверхностей чистых, подготовленных к работе предметов, инвентаря, оборудования, рук и санитарного режима. В случае повторного обнаружения БГКП в значительном проценте смывов рекомендуется провести исследование смывов на наличие патогенных энтеробактерий. При этом производят посев тампона и смывной жидкости на среды обогащения — селенистый бульон или магниевую среду (возможно использование сред Мюллера и Кауфмана). Дальнейшее исследование проводят по общепринятой методике.

### **Исследование молока и молочных продуктов**

#### ***Микрофлора молочных продуктов***

Молоко является весьма благоприятной питательной средой для развития многих микроорганизмов. После употребления в пищу инфицированного молока и молочных продуктов могут возникать такие инфекции, как брюшной тиф, дизентерия, холера, эшерихиозы, бруцеллез, туберкулез, скарлатина, ангина, Ку-лихорадка, ящур, клещевой энцефалит, сальмонеллезные токсикоинфекции, отравление стафилококковым энтеротоксином и др.

Различают специфическую и неспецифическую микрофлору молока и молочных продуктов. К **специфической микрофлоре** молока и молочных продуктов относят микробов-возбудителей молочнокислого, спиртового и пропионовокислого брожения. Микробиологические процессы за счет жизнедеятельности этих микроорганизмов лежат в основе приготовления кисломолочных продуктов (творога, кефира, простокваши, ацидофилина и др.). Бактерии молочнокислого брожения считаются **нормальной микрофлорой** молока и молочных продуктов. Главную роль при скисании молока и молочных продуктов играют молочнокислые стрептококки *S. lactis*, *S. cremaris* и др. Менее активные расы молочнокислых стрептококков (*S. cetrovorus*, *S. lactis subsp. diacetylactis*) продуцируют летучие кислоты и ароматические вещества и поэтому широко используются при получении сыров. В группу молочнокислых бактерий также входят молочнокислые палочки: *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium casei*, *Lactobacterium acidophilus* и т.д.

Основными возбудителями спиртового брожения в молоке и молочных продуктах являются дрожжи (*Saccharomyces lactis* и др).

**Неспецифическую микрофлору** молока составляют гнилостные бактерии (*Proteus*), аэробные и анаэробные бациллы (*B. subtilis*, *B. mrgatherium*, *C. putrificum*) и многие другие. Эти микроорганизмы разлагают белок молока, участвуют в молочнокислом брожении и придает им вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов неприятный вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов плесенью (*Mucor*, *Oidium*, *Aspergillus* и др.) придает им вкус

прогорклого масла. Бактерии кишечной группы, попадая в молоко, вызывают изменение вкуса и запаха молока. Микробное обсеменение молока начинается уже в вымени. В процессе дойки происходит добавочное его обсеменение с поверхности кожи вымени, с рук, из сосуда, куда оно поступает, и из воздуха помещения. Интенсивность этого добавочного обсеменения в общем зависит от того, насколько соблюдаются элементарные санитарно-гигиенические условия при получении молока. Плохие условия хранения молока также могут способствовать дальнейшему нарастанию в нем микрофлоры.

1. **Бактерицидная фаза.** Свежевыдоенное молоко, хотя и содержит уже сотню микробов в  $1\text{см}^3$  (главным образом стафилококки и стрептококки), обладает бактерицидными свойствами за счет присутствия в нем нормальных антител, поэтому в течение некоторого периода развитие бактерий в молоке задерживается. Этот период называют бактерицидной фазой. Длительность бактерицидной фазы колеблется в пределах 2 — 36 ч в зависимости от физиологических особенностей животного (в раннем периоде лактации бактерицидность молока выше). Хранение молока при повышенной температуре (30 — 37С) резко сокращает продолжительность бактерицидной фазы. Такое же влияние оказывает и интенсивное добавочное обсеменение молока микробами. После того как бактерицидная фаза закончилась, наступает развитие микрофлоры. Видовой состав ее меняется во времени под влиянием изменений биохимических свойств среды и вследствие антагонистических и симбиотических взаимоотношений между микробными видами.
2. **Фаза смешанной микрофлоры** длится около 12 ч. В этот период еще не наступает преобладания каких-либо видовых групп пикробов, так как обилие питательного субстрата и пространственные возможности позволяют достаточно свободно развиваться многим видам микроорганизмов.
3. **Фаза молочнокислых стрептококков.** В этой фазе получают преобладание микроорганизмы названной группы (*S. lactis*, *S. termophilus*, *S. cremoris* и др.). Лактоза усиллено превращается ими в молочную кислоту, реакция изменяется в кислую сторону. Накопление молочной кислоты ведет в дальнейшем к отмиранию молочнокислых стрептококков и смене их более кислостойчивыми молочнокислыми бактериями. Это наступает через 48 ч, знаменуя начало 3-й фазы.
4. **Фаза молочнокислых палочек.** В ней господствующее положение приобретают палочковидные формы молочнокислых бактерий (*L. lactis*, *L. crusei*, *L. bulgaricum* и др.) Образующая кислая реакция среды приводит к угнетению роста и постепенному отмиранию других видов бактерий. К концу 3-й фазы дальнейшие возможности развития молочнокислой микрофлоры исчерпываются, а на смену приходят грибы, для которых молочная кислота служит питательным субстратом.
5. **Фаза грибковой микрофлоры.** В этот период развиваются плесени и дрожжи, жизнедеятельность которых приводит к утрате продуктом своей пищевой ценности. Дрожжи представлены главным образом видами из рода *Torula*, реже обнаруживаются некоторые виды сахаромицетов. Из плесеней встречаются молочная плесень (*Oidium lactis*), покрывающая в виде пушка поверхность простокваши и сметаны, а также аспергилловые, пеницилловые и мукоровые плесени. Действие грибковой флоры ведет к нейтрализации среды, а это делает ее вновь пригодной для бактерий. Наступает развитие гнилостных бактерий, вызывающих протеолиз казеина, и, наконец, группы анаэробных спорообразующих маслянокислых бактерий.

Деятельность сменяющейся микрофлоры прекращается только с наступлением полной минерализации всех органических веществ молока. При некоторых условиях процесс смены микробных биоценозов может отклоняться от вышеприведенной схемы. Так, молочнокислые бактерии могут быть с самого начала угнетены микробами группы кишечных палочек, если последние присутствуют в большом количестве. Дрожжи могут вырабатывать заметные концентрации спирта, что имеет место в таких продуктах, как кефир (0,2 — 0,6%) и особенно кумыс (0,9 — 2,5%). Наличие спирта создает условия для последующего развития уксуснокислых бактерий, сбраживающих спирт в уксусную кислоту. Наличие в молоке

антибиотиков и других ингибирующих и нейтрализующих микрофлору веществ также может замедлять молочнокислые процессы.

### **Санитарно-гигиенический контроль молочных продуктов**

Кисломолочные продукты получают в основном путем внесения в молоко особых заквасок, представляющих собой чистые или смешанные культуры определенных микроорганизмов (например, при приготовлении кефира так называемые зерна кефира, при приготовлении ацидофильного молока — культура *L. acidophilum*).

Ослизнение молока вызывается *B. viscosus lactis*, *B. cloacae*, *B. aerogenes*, *S. cremoris* и др. Вкус молока при этом не изменяется. В то же время для некоторых молочнокислых продуктов тягучая консистенция является нормальной. Она достигается искусственным внесением культуры слизиобразующих штаммов молочнокислых бактерий.

При продолжительном хранении молока в условиях относительно низкой температуры молочнокислые бактерии не могут развиваться, в некоторые виды дрожжей и гнилостных бактерий находят возможность развития. Они вызывают пептонизацию белков, в результате которой молоко приобретает горький вкус (*Torula amara*, *B. fluorescens liquifaciens*, а в гущенном молоке *Torula lactis condensis*).

Прогоркание того, что в молоке патогенные бактерии находят условия для обильного размножения, при употреблении зараженного молока доза попадающих внутрь микроорганизмов может оказаться огромной. Таким образом, санитарный контроль за молочной продукцией, включающий бактериологическое исследование, имеет важное профилактическое значение.

Для сохранения молока его подвергают стерилизации или пастеризации. При этом не только гибнет микрофлора молока, но и разрушаются витамины, нарушается агрегатное состояние белков и жиров и тем самым снижается питательная ценность продукта. Эффективность пастеризации зависит от заданного температурного режима и степени микробного загрязнения молока. При очень высокой обсемененности бактериями часть микробов переживает пастеризацию, в результате чего порча молока происходит быстрее. Наибольшую опасность представляет сохранение в пастеризованном молоке патогенных энтеробактерий и энтеротоксигенных стафилококков.

В последнее время нашел применение и другой метод обработки молока — бактофигурирование, позволяющее проводить освобождение молока от микроорганизмов путем обработки на специальных центрифугах.

В СанПиН 2.3.2.1078-01 нормированы следующие показатели, характеризующие санитарно-бактериологическое состояние молока и молочных продуктов: ОМЧ, БГКП (колиформы) патогенные (в том числе сальмонеллы). В мороженом и ряде заквасок для кисломолочных продуктов также нормируется масса продукта, в которой не допускается содержание *S. aureus*, а также дрожжей и плесеней.

Методы микробиологического анализа предусматривают определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КОЕ/г) и определение БГКП.

Определение количества ОМЧ производят по общим правилам путем посева указанных разведений в количестве 1 см<sup>3</sup> в чашки Петри с последующей заливкой плотным питательным агаром. Посевы выдерживают в термостате при 30±1С в течение 72ч.

Число выросших на чашках колоний подсчитывают. Общее количество в 1 см<sup>3</sup> (в 1 г) находят по формуле:

$$X = n \times 10^m,$$

где n — количество сосчитанных колоний; m — число десятикратных разведений.

БГКП — бесспорные грамотрицательные, аэробные факультативно-анаэробные палочки, в основном являющиеся факультативно-анаэробные палочки, в основном являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, сбрасывающие в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при 37±1С в течение 24 ч. Объем (масса) молокопродуктов, засеваемых в среду Кесслер, представлена табл. 1.

**Таблица 1.** Количество продукта при посеве на среду Кесслера для определения БГКП

Наименование продукта	Засеваемый объем, или масса продукта, см <sup>3</sup> , г
Молоко сливки сырые	0,1 — 0,00001
Молоко и сливки пастеризованные, кисломолочные продукты	1; 0,1; 0,01
Масло	1; 0,1; 0,01
Мороженное	0,1
Сыр	0,1 — 0,001
Творог и сметана	0,1 — 0,001
Молоко или сливки сгущенные с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром	0,1
Молоко сухое, сливки сухие	0,1

Из каждого разведения засевают по одной пробирке. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов счищают, что БГКП в нем обнаружены. Для ориентировочной характеристики микрофлоры кисломолочных продуктов дополнительным методом является микроскопия мазка, приготовленного из цельного или разведенного материала. Мазки фиксируют и окрашивают 10% метиленовым голубым. Кисломолочные продукты имеют свою специфическую микрофлору, которую используют для их приготовления (табл. 2).

**Таблица 2.** Характеристика микрофлоры кисломолочных продуктов.

Наименование продукта	Ориентировочный состав микрофлоры
Творог, сметана, сыр домашний, простокваша обыкновенная	Молочнокислые стрептококки
Ацидофилин	Молочнокислые стрептококки и палочки, возможно наличие дрожжей
Кефир	Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи

На сырое молоко нормативов нет, но как косвенный показатель бактериальной обсемененности используют редуктазную пробу (ГОСТ 9225-84). Принцип метода состоит в том, что в процессе жизнедеятельности бактерий выделяют в окружающую среду ферменты (редуктазы). Для исследования пробы на редуктазу в пробирки наливают по 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора метиленового голубого и по 20 см<sup>3</sup> молока, закрывают, трижды переворачивают пробирки, затем помещают в водяную баню (38С). Изменение окраски молока фиксируют через 40 мин, 2,5 и 3,5 ч. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока. В зависимости от продолжительности обесцвечивания молоко относят к одному из 4 классов (табл. 3).

**Таблица 3.** Оценка редуктазной пробы.

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания	Ориентировочное количество бактерий, КОЕ/см <sup>3</sup> молока
Высший	Более 3,5 ч	Менее 300 тыс.
I	3,5 ч	300 — 500 тыс.
II	2,5 ч	500 тыс. - 4 млн
III	40 мин	4 — 20 млн

Исследование для выявления *S. aureus* проводят в соответствии с ГОСТ 30347-97, а плесней и дрожжей — с ГОСТ 10444.12-88.



**СРС** Понятие о внутрибольничных инфекциях.

### **Словарь**

Дать определение терминам:

**ОМЧ-**

**Титр СПМО-**

**Индекс СПМО-**

**Санитарная микробиология-**

**КОЕ-**

Занятие №20

Дата

***Вопросы к итоговому занятию по разделу «Санитарная микробиология»***

- 1) Предмет и задачи санитарной микробиологии.***
- 2) Объекты исследования, санитарно-показательные микроорганизмы (СПМО).***
- 3) Санитарные исследования в медицинских учреждениях (оценка состояния окружающей среды, воздуха, исследование на стерильность инструментов, перевязочного и хирургического материала).***
- 4) Понятие о внутрибольничных инфекциях (ВБИ).***
- 5) Методы санитарно-микробиологического исследования воды. Оценка качества воды по бактериологическим показателям, СПМО.***
- 6) Микрофлора воздуха и методы ее исследования. СПМО, оценка чистоты воздуха по бактериологическим показателям.***
- 7) Микрофлора почвы. Факторы, влияющие на количественный и видовой составы микробов почвы. Санитарно-микробиологическое исследование почвы. СПМО, оценка загрязненности почвы.***
- 8) Методы санитарно-микробиологического исследования пищи. СПМО, оценка качества продуктов.***
- 9) Понятие о ПТИ.***

***Решение ситуационных задач***

## **План практических занятий по разделу общая и прикладная иммунология**

- 1) Учение об иммунитете. Иммунитет и его виды. Неспецифическая резистентность.
- 2) Иммунная система организма. Органы и клетки иммунной системы.
- 3) Антигены.
- 4) Фазы иммунной реакции. Клеточный иммунный ответ.
- 5) Гуморальный иммунный ответ. Антитела.
- 6) Первичный и вторичный иммунный ответ. Иммунологическая память. Иммунологическая толерантность.
- 7) Противοинфекционный иммунитет
- 8) Иммунодиагностика инфекционных заболеваний. Серологические реакции I порядка.
- 9) Иммунодиагностика инфекционных заболеваний. Серологические реакции II порядка. Современные иммунодиагностические реакции.
- 10) Иммунный статус.
- 11) Типы иммунопатологии.
- 12) Иммунотерапия. Иммунопрофилактика.
- 13) **Итоговое занятие по разделу «Общая и прикладная иммунология»**

## ЧАСТЬ 2 ОБЩАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Занятие №1

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Учение об иммунитете. Иммунитет и его виды. Неспецифическая резистентность.**

**Основные вопросы рассматриваемой темы:**

1. Естественный иммунитет. Определение. Характеристика.
2. Неиммунные механизмы естественного иммунитета: барьерные и противомикробные свойства кожи, слизистых оболочек, лимфатических узлов, ареактивность тканей, нормальная микрофлора.
3. Система комплемента.
4. Фагоцитарная реакция (фазы, механизмы и факторы внутриклеточной бактерицидности). Естественные киллеры. Механизм повреждения мишеней.

**Иммунитет** – способ защиты организма от продуктов генетически чужеродной природы (антигенов) эндогенного и экзогенного происхождения, обеспечивающий генетическую целостность особей вида в течение индивидуальной жизни (Галактионов В.Г., 1998).

**Основные отличия врожденного и приобретенного иммунитета.**

Врожденный иммунитет	Приобретенный иммунитет
Неспецифичен по отношению к патогену	Специфичен по отношению к патогену
Для активации не требуются АПК и процессинг антигена	Необходимы АПК и процессинг антигена
В осуществлении функций врожденного иммунитета участвуют эндотелиоциты, макрофаги, нейтрофилы, натуральные киллеры, система комплемента	Т-, В-лимфоциты
Отсутствие клеток памяти	Образование клеток памяти

**Задание №1.** Заполните схему «Классификация видов иммунитета по происхождению».



## Задание №2. Заполните схему «Факторы неспецифической резистентности»



**Система комплемента** — это сложный комплекс белков сыворотки крови, который является одним из компонентов неспецифического иммунитета и активируется по типу ферментативно-каскадной реакции, т.е. продукт предыдущей реакции играет роль катализатора следующей.

Компоненты системы комплемента обозначаются прописной буквой С с порядковыми номерами от 1 до 9. Фрагменты, образующиеся в процессе расщепления компонентов комплемента, обозначаются порядковыми номерами с малыми буквами (С2а, С3b и т. д.). Ферментолитически активную форму обозначают штрихом сверху над указанием компонента комплемента. Если активированный фрагмент дезактивируется, то для обозначения этого добавляется буква i.

Система комплемента циркулирует в крови в неактивном состоянии. Ее активация может осуществляться по классическому, или иммунному, пути и альтернативным способом (посредством белка пропердина).

Функции системы комплемента:

- усиление процессов фагоцитоза путем выделения веществ, покрывающих патогенны или иммунные комплексы;
- участие в воспалительных реакциях путем влияния на интенсивность выделения базофилами биологически активных веществ;
- цитотоксическая функция, которая проявляется в образовании мембраноатакующего комплекса из поздних компонентов комплемента.

Активация системы комплемента может осуществляться по классическому и альтернативному пути.

В случае классического пути образуются специфические иммуноглобулины (IgG или IgM) и иммунные комплексы. Процесс активации начинается с ранних компонентов комплемента: С1, далее в процесс вовлекаются компоненты С4, С2 и С3.

Образование иммунного комплекса осуществляется при агрегации молекул иммуноглобулина или при связывании иммуноглобулинов с антигеном.

На молекулярном уровне стадии активации системы комплемента выглядят следующим образом:

1. В присутствии ионов  $Ca$  из белка  $C1$  образуется тетрамер  $C1r_2-Ca_2-C1s_2$ , который связывается с одной молекулой  $C1q$ . Данный комплекс обладает протеазной активностью, а его субстратами являются  $C2$  и  $C4$ . В плазме присутствует ингибитор данного фермента ( $C1-Inh$ ).
2. В процесс вовлекается  $C4$ , распадающийся на два фрагмента —  $C4a$  и  $C4b$ , который приобретает свойства эстеразы, способной активировать  $C2$ .  $C4b$  в присутствии ионов магния расщепляет  $C2$  на  $C2a$  и  $C2b$ . При этом  $C2a$  присоединяется к  $C4b$ , и образуется одно из ключевых веществ процесса активации комплемента — конвертаза 3-го компонента комплемента.
3. Образовавшаяся  $C3$ -конвертаза ( $C4b_2a$ ) расщепляет  $C3$  на  $C3a$ . При этом  $C3b$  — это ключевой фрагмент как для классического, так и для альтернативного пути активации, в этом месте оба пути активации сходятся и далее процесс происходит одинаково в обоих случаях. Регулятором активации  $C3$  комплемента является фактор  $I$  ( $C3b$ -инактиватор). Он расщепляет  $C3b$  на неактивные фрагменты —  $C3c$  и  $C3d$  и препятствует чрезмерной активации  $C3$ .
4. Активная  $C3b$  — фрагмент связывается с комплексом  $C4b$  и  $2a$ , и образуется конвертаза 5-го компонента комплемента. С этого момента начинается образование финальной структуры — мембраноатакующего комплекса (МАК), обозначаемого  $C5b_6789$ . Он инициирует появление в липидном белке мембраны клетки пор, в результате образования которых возможен лизис клетки.

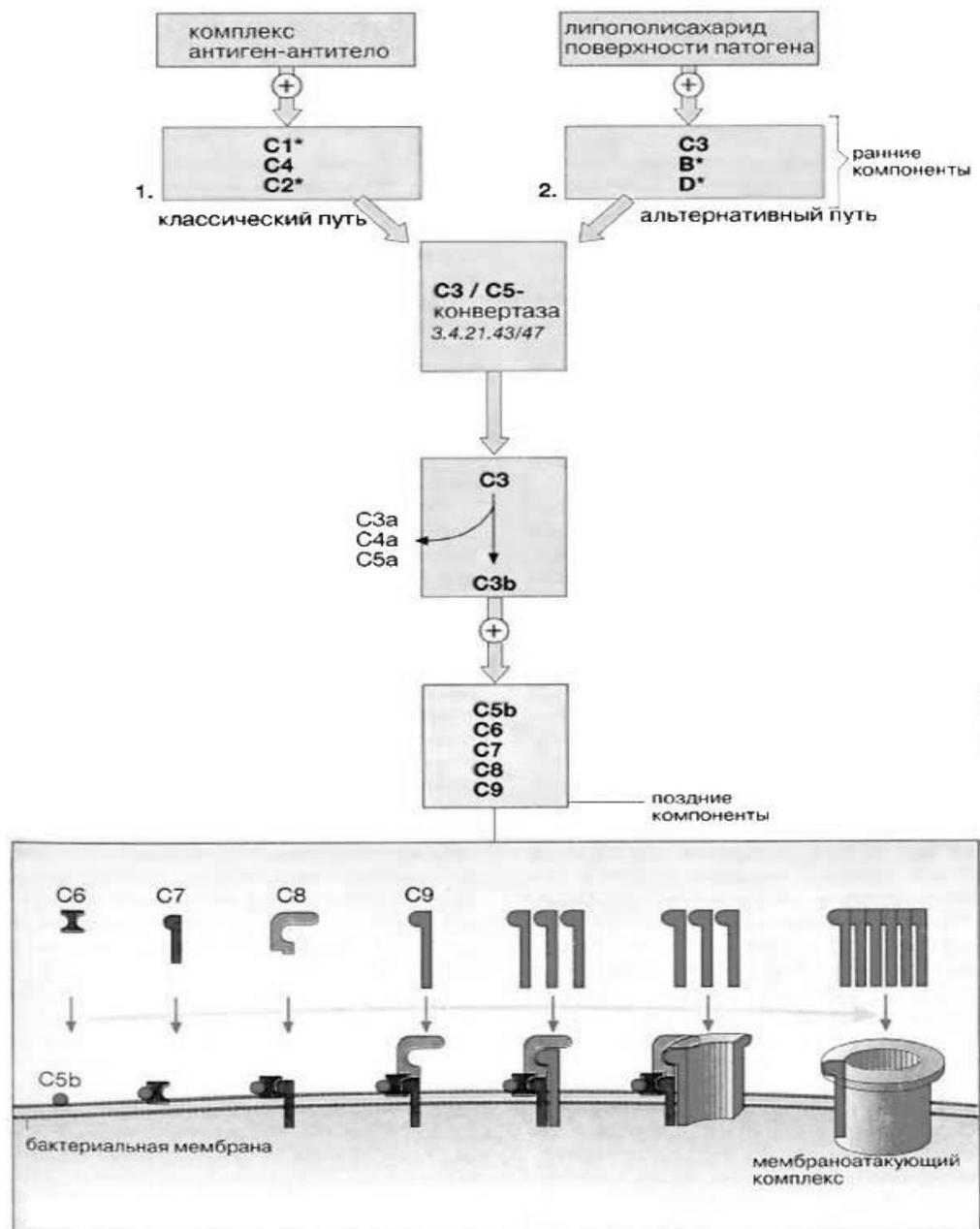
**Альтернативный путь** активации системы комплемента срабатывает мгновенно в ответ на внедрение в организм бактериальных полисахаридов, вирусов, опухолевых клеток, паразитов. Он не требует образования иммунных комплексов, поэтому активация происходит быстрее, чем в случае классического пути. В альтернативном пути не принимают участия первые компоненты комплемента —  $C1$ ,  $C4$  и  $C2$ .

В первых реакциях альтернативного пути активации активное участие принимает пропердиновая система. Она состоит из белков, называемых факторами  $D$  и  $B$ . Фактор  $D$  находится в сыворотке крови в виде активного фермента, субстратом для которого является фактор  $B$ .

Данный белок расщепляется под влиянием фактора  $D$ , в результате чего образуется активный фрагмент — фактор  $Bb$ , в комплексе с  $C3b$  образующий конвертазу 3-го компонента комплемента альтернативного пути активации. Она несколько отличается от конвертазы классического пути.

$C3bBb$ , стабилизированный белком пропердином, активирует  $C3$  с образованием  $C5$ -конвертазы и далее начинается сборка мембраноатакующего комплекса (МАК).

**Схема 1. «Механизмы активации системы комплемента по классическому и альтернативному путям»**



Задание №3. Заполните таблицу «Фагоцитирующие клетки».

Клетки	Источник	Формы участия в защитных реакциях


**Задание №6. Заполните таблицу «Стадии фагоцитоза».**

Стадия		Механизм протекания	Рисунок
I			
II			
III			
IV			

V			
VI			

**СРС №1.1. В тетради для конспектов напишите конспект на тему «Воспаление – как фактор неспецифической резистентности».**

Занятие №2

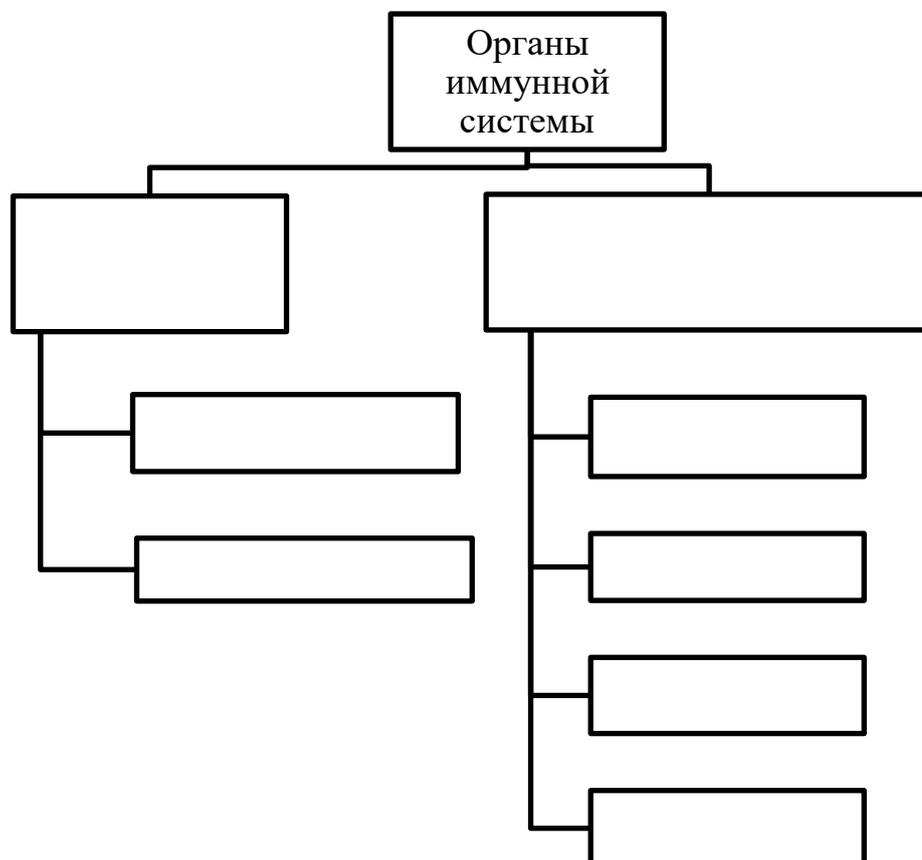
Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Иммунная система организма. Органы и клетки иммунной системы.**

**Основные вопросы рассматриваемой темы:**

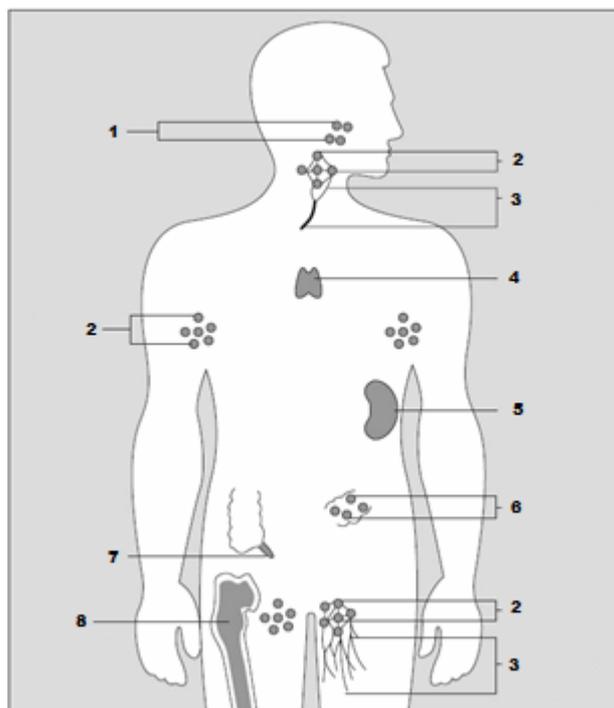
1. Имунокомпетентные органы (центральные и периферические): строение и функции, изменения в онтогенезе.
2. Имунокомпетентные клетки: типы, морфология, происхождение, маркеры, идентификация и выделение.
3. Факторы межклеточного взаимодействия. Цитокины. Определение. Свойства цитокинов. Функция цитокинов.

**Задание №1. Заполните схему «Классификация органов иммунной системы».**



**Задание №2. Впишите названия органов иммунной системы в соответствии с их анатомическим расположением.**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_
8. \_\_\_\_\_



**Задание № 3. Заполните таблицу «Функции органов иммунной системы».**

	Орган	Основные функции
<b>Центральные</b>		
<b>Периферические</b>		

**Задание № 4. Заполните таблицу «Имунокомпетентные клетки».**

Название	Функция	Происхождение	Маркеры
Антигенпрезентирующие клетки			
Иммунорегуляторные клетки			
Эффекторные клетки			
Клетки памяти			

--	--	--	--

Различают следующие (основные) факторы межклеточного взаимодействия:

а) на поверхности клеток: (рецепторы-лиганды)

- молекулы иммуноглобулинового суперсемейства: Ig, TCR, MHC, CD2, 3, 4, 8, адгезины клеток иммунной системы (ICAM);
- селектины;
- интегрины;
- прочие молекулы (например, CD44);

б) факторы дистанционного взаимодействия:

- цитокины;
- интерфероны.

Цитокины - небольшие пептидные сигнальные молекулы, участвующие в био-, хемо- и иммунорегуляции, которые секретируются неэндокринными клетками и оказывают воздействие на клетки – мишени.

Свойства цитокинов:

- цитокины не депонируются в клетке, а синтезируются после соответствующего стимула;
- для восприятия цитокинового сигнала клетка экспрессирует соответствующий рецептор, который может взаимодействовать с несколькими различными цитокинами;
- цитокины синтезируются клетками разных ростков, уровней и направлений дифференцировки;
- субпопуляции клеток иммунной системы различаются по спектру синтезируемых цитокинов и их рецепторов;
- цитокины обладают универсальностью, множественностью эффектов и синергизмом;
- цитокины могут воздействовать как на рядом расположенную клетку (паракринная регуляция), так и на сам продуцент (аутокринная регуляция);
- цитокиновая регуляция носит каскадный характер: активация клетки одним цитокином вызывает синтез другого;
- в подавляющем большинстве это короткодистантные медиаторы - их эффекты проявляются на месте выработки. Вместе с тем ряд провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, 6,  $\alpha$ -ФНО и др.) могут оказывать системное действие.

Разнообразные биологические функции цитокинов подразделяются на три группы:

- управляют развитием и гомеостазом иммунной системы;
- осуществляют контроль за ростом и дифференцировкой клеток крови (системой гемопозеза);
- принимают участие в неспецифических защитных реакциях организма, оказывая влияние на воспалительные процессы, свертывание крови, кровяное давление.

**Задание №5. Заполните таблицу «Биологические эффекты цитокинов».**

Цитокин		Клетка продуцент	Биологический эффект
Интерлейкин	ИЛ 1 IL 1		
	ИЛ 2 IL 2		
	ИЛ 3 IL 3		
	ИЛ 4 IL 4		
	ИЛ 10 IL 10		
	ИЛ 13 IL 13		
Интерферон	ИФН- $\alpha$ (INF- $\alpha$ )		
	ИФН- $\beta$ (INF- $\beta$ )		
	ИФН- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )		
Трансформирующий фактор роста	ТФР $\beta$ (TGF- $\beta$ )		
Фактор некроза опухоли	ФНО $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )		
	ФНО- $\beta$ (TNF- $\beta$ )		
Колониестимулирующий фактор	ГМ-КСФ (GM-CSF)		
	Г-КСФ (G-CSF)		

Основная биологическая активность цитокинов - регуляция иммунного ответа на всех этапах его развития, в которой они играют центральную роль.

Занятие № 3

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Антигены.**

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Антигены. Структура, свойства.
2. Классификация антигенов.
3. Антигены микроорганизмов.
4. Антигены гистосовместимости МНС (HLA)
5. Антигенная изменчивость. Перекрёстнореагирующие антигены. Антигенная мимикрия.
6. Т-зависимые и Т-независимые антигены. Суперантигены. Митогены, строение и функции.

**Антигены** - это генетически чужеродные вещества, при введении в организм вызывающие развитие специфических иммунологических реакций (синтез антител, реакции клеточного иммунитета, повышенную чувствительность, иммунологическую толерантность, а также иммунологическую память).

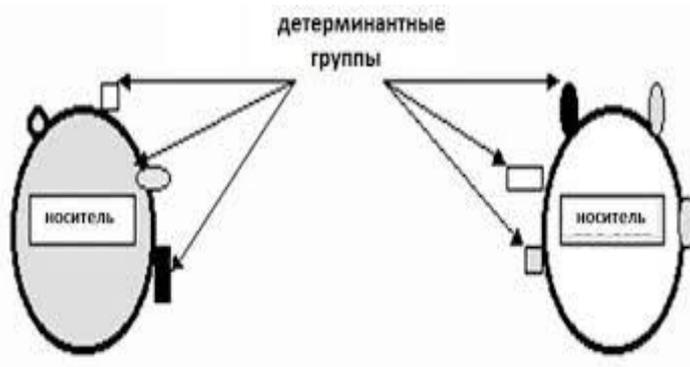
**Задание №1. Дайте определения основным свойствам антигенов.**

Свойства антигенов

Свойство	Определение
Чужеродность	
Антигенность	
Специфичность	
Иммуногенность	

Молекула любого антигена состоит из 2 частей:

- 1-я часть - эпитоп (детерминанта), участок антигена, вызывающая иммунную реакцию;
- 2-я часть молекулы антигена называется проводниковой, при ее отделении от эпитопа не проявляет антигенного действия, но сохраняет способность реагировать с гомологичными антителами.



## Классификация антигенов.

### По специфичности:

- Групповые – Аг, общие для рода (родоспецифические) или для нескольких родов микроорганизмов (межвидовые).
- Видовые – общие для всего вида и не встречающиеся у других видов.
- Типовые – различия по антигенным свойствам внутри одного вида (серовары).

### По степени иммуногенности:

- Полноценные Аг обладают выраженной антигенностью и иммуногенностью.
- Неполноценные Аг (**гаптены**) обладают антигенностью, но не способны индуцировать в организме иммунный ответ.

### По происхождению:

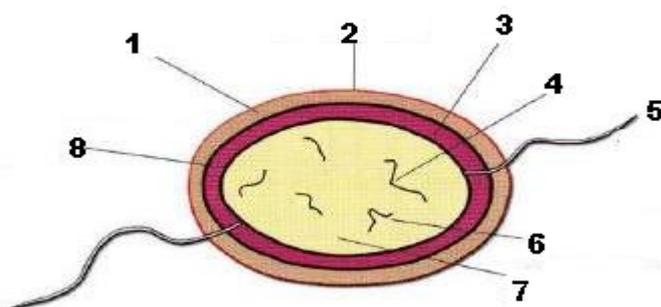
- Экзогенные антигены попадают во внутреннюю среду организма из внешней среды через органы дыхания, желудочно-кишечный тракт, путем инъекции.
- Эндогенные антигены возникшие внутри организма:
  - аутоантигены – Аг собственного организма;
  - неоантигены – возникают в организме в результате патологических процессов.

**Задание №2.** Заполните таблицу «Классификация антигенов по степени чужеродности»

Название группы	Определение	Пример
Ксеногенные Аг		
Аллогенные Аг		
Изогенные Аг		
Аутоантигены		

**Задание №3.** Впишите в графы цифры соответствующие основным антигенам бактериальной клетки на рисунке справа.

- Капсула (К-АГ) - \_\_\_\_\_
- Содержимое цитоплазмы (ферменты и пр.) - \_\_\_\_\_
- Пили (F-АГ) - \_\_\_\_\_
- Жгутики (H-АГ) - \_\_\_\_\_
- Плазмиды - \_\_\_\_\_
- Клеточная стенка (O-АГ) - \_\_\_\_\_
- Белки ЦПМ - \_\_\_\_\_



### Антигены вирусов:

- 1) суперкапсидные антигены – поверхностные оболочечные;
- 2) белковые и гликопротеидные антигены;
- 3) капсидные – оболочечные;
- 4) нуклеопротеидные (сердцевинные) антигены.

**Молекулы МНС** (от англ. major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости) являются основными антигенпредставляющими молекулами. Именно они представляют для Т-лимфоцитов пептидные антигены, которые играют ведущую роль в индукции иммунного ответа. При этом Т-лимфоциты распознают именно комплекс [антиген + молекула МНС]. У человека они были первоначально открыты на лейкоцитах, поэтому получили название молекул (или антигенов) HLA (human leucocyte antigen). Молекулы МНС являются мембранными гликопротеинами и представлены двумя классами.

Молекулы **МНС первого класса** обычно обозначаются как **МНС-I**.

1. МНС-I экспрессируются на всех ядродержащих клетках (т.е. их нет лишь на эритроцитах). В наибольшем количестве они присутствуют на лимфоцитах и лейкоцитах.
2. МНС первого класса связываются с антигенами цитозоля и внутриядерного содержимого АПК.

**а.** Поэтому МНС-I презентируют (представляют) Т-лимфоцитам прежде всего вирусные антигены.

**б.** Кроме этого МНС-I презентируют (представляют) Т-лимфоцитам антигены бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию.

3. МНС первого класса выполняют две основные функции

**а.** Во первых, МНС-I представляют антиген CD8-лимфоцитам.

**б.** Кроме антигенпредставляющей функции, МНС-I играют важную роль в регуляции активности НК-клеток.

Молекулы **МНС второго класса** обычно обозначаются как **МНС-II**.

1. МНС-II экспрессированы, в отличие от МНС первого класса, лишь на некоторых клетках.

**а. Во первых,** они экспрессируются на **профессиональных антигенпредставляющих клетках**, а именно:

– на макрофагах/моноцитах,

– дендритных клетках,

– В-лимфоцитах.

**б. Во-вторых,** МНС-II экспрессируются на **клетках эндотелия сосудов**.

2. МНС второго класса связываются с антигенами мембранных структур клетки (т.е. той зоны клетки, которая непосредственно сообщается с внешней средой).

**а.** Поэтому МНС-II презентируют (представляют) Т-лимфоцитам **антигены возбудителей внеклеточных инфекций**.

**б.** Кроме этого МНС-II презентируют (представляют) Т-лимфоцитам антигены возбудителей так называемых везикулярных инфекций, которые находятся в клетке внутри везикул, а не непосредственно в цитоплазме (например, хламидий).

3. МНС второго класса представляют антиген **CD4-лимфоцитам**.

### **Задание № 4. Зарисовать строение МНС I и II класса**

**Задание №5. Заполните таблицу «Характеристики молекул МНС» (функции молекул опишите своими словами).**

Класс	Клетки, экспрессирующие МНС	Функции
МНС I класса		
МНС II класса		

**Перекрестно-реагирующие (гетероантигены)** - общие для представителей разных видов антигенные комплексы или общие антигенные детерминанты на различающихся по другим свойствам комплексах. Так наличие общих антигенных детерминант у  $\beta$ -гемолитического стрептококка и соединительной ткани (коллагена) клапанов сердца, обуславливает развитие ревматического поражения клапанного аппарата (ревматического эндокардита) после перенесенной ангины.

**Антигенная мимикрия** - общие, сходные по строению антигены встречающиеся у микробов различных видов и у человека, в результате которой микроб не распознается иммунной системой как чужеродный, что способствует его сохранению в организме человека.

Занятие № 4

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Фазы иммунной реакции. Клеточный иммунный ответ.**

**Основные вопросы рассматриваемой темы:**

1. Фазы иммунной реакции
2. Антигенпрезентирующие клетки. Типы, характеристика.
3. Взаимодействие антигенпрезентирующих клеток с антигенами: процессирование и презентация антигена. Активированный макрофаг и регуляция его функций.
4. Т-лимфоциты и их характеристика. Субпопуляции Т-клеток.
5. Т-клеточный рецептор, структура. Роль Т-клеточного рецептора и др. ко-стимуляционных макромолекул (CD28, CD80, CD81, CD40, CD4, CD8, CD20), вовлекаемых в процесс активации Т-лимфоцитов. Т-зависимые и регуляторные механизмы.

6. Клеточный иммунный ответ и его проявления.

**Иммунный ответ** – это цепь последовательных сложных кооперативных процессов, происходящих на местном и общем уровне, в ответ на проникновение антигена во внутренние среды организма.

**Задание №1.** Нарисуйте схему, отражающую взаимодействие иммунокомпетентных клеток при клеточном иммунном ответе.

**Задание №2.** Опираясь на рисунок из задания №1, заполните таблицу «Фазы иммунного ответа».

		События характерные для данной фазы
I	Индукторная	

II	Иммунорегуляторная	
III	Эффекторная	
IV	Формирование иммунологической памяти	

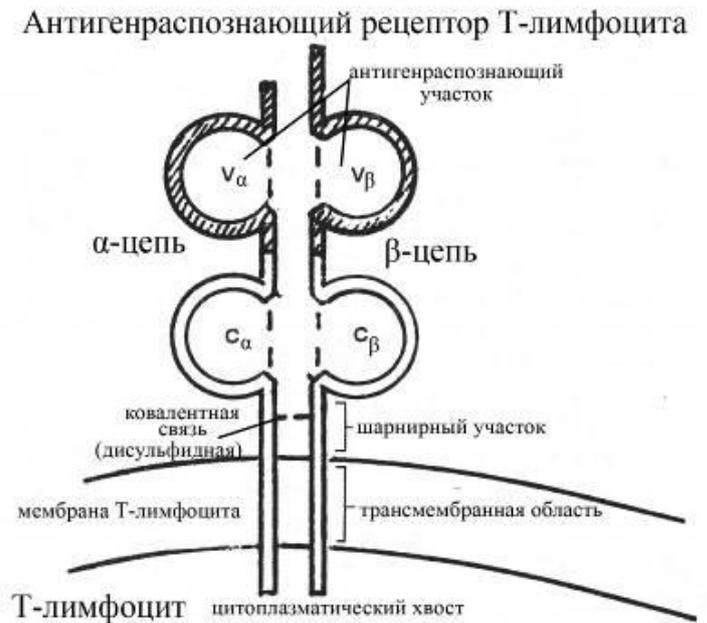
**Задание №3. Заполните таблицу.**

Название клетки (обозначение)		Маркёры	Функции
Т-хелперы (Th)	Th1		
	Th2		
Т-киллеры (Tc)			

NK-клетки(NK)		
---------------	--	--

### Строение Т-клеточного рецептора

**Т-клеточные рецепторы (TcR)** — поверхностные белковые комплексы Т-лимфоцитов, ответственные за распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) на поверхности антигенпрезентирующих клеток. TCR состоит из двух белковых цепей, заякоренных в клеточной мембране и ассоциирован с многосубъединичным комплексом CD3. Взаимодействие TCR с MHC и связанным с ним антигеном ведет к активации Т-лимфоцитов и является одной из ключевых точек в механизме иммунного ответа.



#### Задание №4. Зарисуйте схему клеточного иммунного ответа

Занятие № 5

Дата \_\_\_\_\_

#### Тема: Гуморальный иммунный ответ. Антитела.

##### Основные вопросы, разбираемые на занятии:

1. В-лимфоциты: поверхностные маркеры, В-клеточный рецептор, структура (константные и вариабельные участки, полипептидные цепи). Механизмы В-клеточной активации. Функция В-лимфоцитов.
2. Этапы гуморального адаптивного иммунного ответа. Взаимодействие клеток при формировании гуморального адаптивного ответа.
2. Антитела. Структура молекулы иммуноглобулинов. Классы иммуноглобулинов. Биологические свойства.
3. Полные и неполные антитела. Генетика иммуноглобулинов: изотипы, аллотипы, идиотипы.
4. Биологические эффекты взаимодействия антител с антигенами: активация системы комплемента, нейтрализация токсинов и вирусов, лизис агглютинация и опсонизация.

Иммунные реакции принято подразделять на два типа: **ГУМОРАЛЬНЫЕ** и **КЛЕТОЧНЫЕ**. Для иммунного ответа **гуморального типа** характерна выработка **АНТИТЕЛ**, которые называются эффекторами В-звена иммунной системы, так как именно В-лимфоциты становятся антителопродуцирующими (плазматическими) клетками.

В-лимфоциты – это те клетки, которые обеспечивают выработку антител и являются основным клеточным субстратом гуморального иммунного ответа.

В процессе дифференцировки В-лимфоцитов выделяют 2 основных ЭТАПА:

1. **АНТИГЕННЕЗАВИСИМЫЙ** и
2. **АНТИГЕНЗАВИСИМЫЙ**.

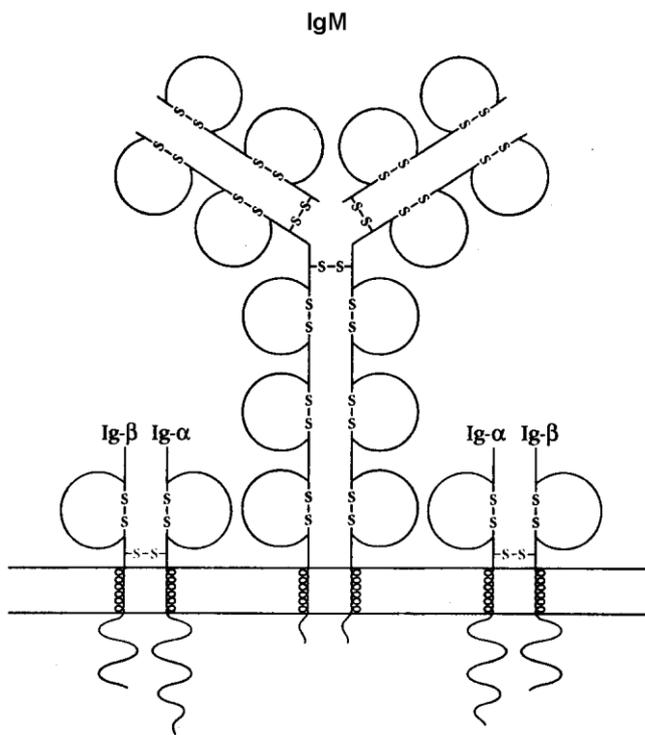
**АНТИГЕННЕЗАВИСИМАЯ** дифференцировка В-клеток происходит в костном мозге без участия антигена, причем происходит постоянно по следующей схеме:

1. Стволовая кроветворная клетка (гемопоэтическая стволовая клетка, англ. HSC) ↓
2. Общий предшественник Т- и В-лимфоцитов ↓
3. Про В-клетка ↓
4. Предшественник В лимфоцитов (Пре-В-клетка) ↓
5. Незрелые В-лимфоциты ↓
6. В-лимфоциты (зрелые) - прямые предшественники антителообразующих клеток.

Принципиальной основой В-лимфопоэза является образование зрелых лимфоцитов, несущих на поверхностной мембране **молекулы Ig M** (мембранная форма IgM – sIgM или **BCR**), выполняющих функции рецепторов специфичных к **одному определенному антигену**. Кроме того, появляются другие мембранные структуры, значимые для функционирования лимфоцита. Важным является процесс формирования различных индивидуальных для каждой В-клетки антигенраспознающих рецепторов. В-лимфоциты в костном мозге проходят обязательный этап – **селекцию**, заключающуюся в программированной **гибели** (апоптозе) **аутореактивных клонов** лимфоцитов, что называется делецией клона (clonal deletion). Этот механизм обеспечивает толерантность к собственным (аутологичным) антигенам организма.

**Второй этап.** В-лимфоциты, встретив и распознав антиген своим **иммуноглобулиновым рецептором (BCR)**, размножаются, образуя клон идентичных клеток, и дифференцируются в **плазматические клетки** – продуценты антител. Таким образом, вторым этапом развития В-лимфоцитов является их иммуногенез – **АНТИГЕНЗАВИСИМАЯ дифференцировка**, которая происходит в **периферических органах иммунной системы**. В отличие от антигеннезависимой дифференцировки не все клоны В-лимфоцитов претерпевают антигензависимую дифференцировку. Этот этап развивается лишь в том случае, если клон В-лимфоцитов реагирует на внедрившийся в организм **АНТИГЕН**. При этом с антигеном будут взаимодействовать **только** те клоны В-лимфоцитов, антигенраспознающие рецепторы которых **специфичны к его антигенным детерминантам**. **Плазматические клетки** - конечная стадия полностью дифференцировавшихся В-лимфоцитов и **продуцирующих антитела** к определенному антигену.

Каждый В-лимфоцит способен синтезировать только **единственный** вид антител к определенной антигенной детерминанте (эпитопу). Антигензависимая дифференцировка зависит не только от распознавания антигена клоном В-лимфоцитов. В этом процессе участвуют **антигенпрезентирующие** клетки и **Т-лимфоциты**, если антиген **Т-зависимый**.



**Антигенраспознающим рецептором В-лимфоцитов (BCR)** является мономерный иммуноглобулин М, связанный с мембраной клетки. Молекула IgM также плотно связана с гетеродимерами Ig-α/Ig-β. Этот комплекс молекул и формирует единый В-клеточный рецептор (ВКР). Каждый гетеродимер содержит экстрацеллюлярный Ig-подобный сегмент, мембранный участок и цитоплазматический хвост, который связан с внутриклеточными сигнальными молекулами. Гетеродимеры Ig-α /Ig-β участвуют в трансдукции сигнала с IgM в ядро клетки. Дефектность молекул Ig-α /Ig-β нарушает проведение сигнала с рецептора внутрь клетки.

**Задание №1. Заполните таблицу «Общая характеристика клеток-участниц гуморального иммунного ответа»**

	Клетка	Цитокины	Рецепторы	Биологический эффект
<b>АПК</b>				
<b>Регуляторная</b>				
<b>Эффекторная</b>				

**Задание №2. Зарисуйте схему гуморального иммунного ответа на Т-зависимые и Т-независимые антигены. Отрадите в схеме роль клеток участвующих в этом процессе.**

**Задание №3** Схематично зарисуйте строение молекулы иммуноглобулина класса G. Обозначьте на рисунке структурные компоненты этих молекул (выберите из списка справа).

	1- H-цепь, 2-L- цепь, 3- дисульфидные связи (-S-S-), 4-вариабельная область - V- домены, 5-константная область - C- домены 6- антигенсвязывающий центр 7- Fab фрагмент 8- Fc фрагмент
--	--

**Задание №4.** Заполните таблицу «Основные характеристики иммуноглобулинов человека»

Характеристика	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Молекулярная масса, кД					

Субклассы					
Количество мономеров					
Валентность					
H-цепь					
L-цепь					
J-цепь					
Уровень в сыворотке крови, г/л					
% от общего уровня Ig					
Период полураспада, сут.					
Связывание комплемента					
Цитотоксическая активность					
Опсонизация					
Преципитация					
Агглютинация					
Участие в аллергических реакциях					
Прохождение через плаценту					
Наличие в секретах в секреторной форме					

**Задание №5. Дайте определение основным свойствам антител.**

Свойство	Определение
Специфичность	
Валентность	
Аффинность	
Авидность	

Занятие № 6

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Первичный и вторичный иммунный ответ. Иммунологическая память. Иммунологическая толерантность.**

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Сравнительная характеристика первичного и вторичного иммунного ответа.
2. Динамика накопления антител, фазы антителообразования.
3. Иммунологическая память.
4. Т-клетки памяти. В-клетки памяти.
5. Иммунологическая толерантность.

**Задание 1. Заполните таблицу «Сравнительная характеристика первичного и вторичного гуморального иммунного ответа».**

Характеристика	Первичный иммунный ответ	Вторичный иммунный ответ
Реагирующие клетки		
Персистенция антигена в крови		
Накопление антител в крови		
Время формирования оптимальной концентрации IgG		
Присутствие клеток памяти		
Место взаимодействия клеток с антигеном		

**Задание №2 Дайте определения и опишите события, соответствующие фазам антителообразования, обозначьте эти фазы на графике:**

1. Латентная (индуктивная) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2. Логарифмическая \_\_\_\_\_

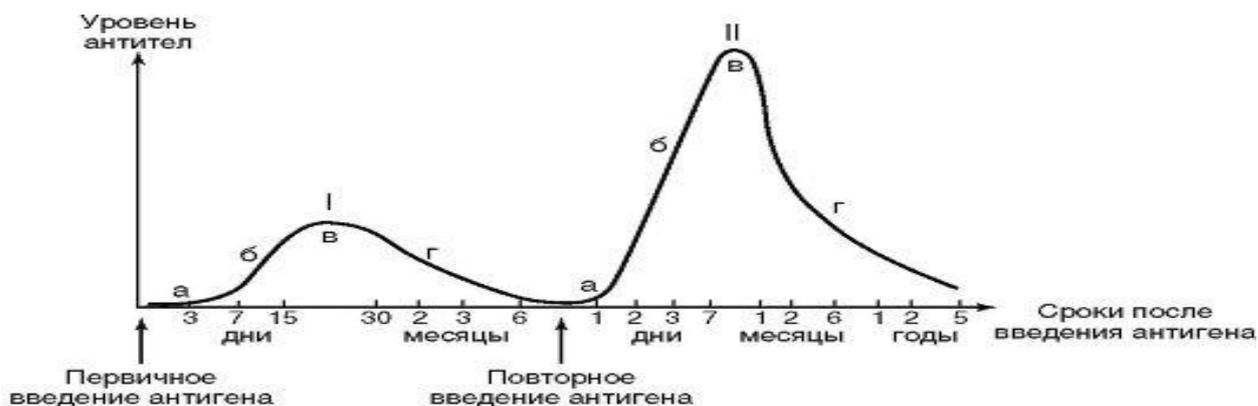
\_\_\_\_\_

3. Стационарная \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4. Фаза снижения \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**Иммунологическая память** - это способность иммунной системы отвечать более быстро и эффективно на антиген (патоген), с которым у организма был предварительный контакт.

Такая память обеспечивается (образовавшимися в результате предшествующих контактов иммунной системы с антигенами) антигенспецифическими клонами как В-клеток, так и Т-клеток (**клетками памяти**), которые функционально **более активны** в результате прошедшей первичной адаптации к определенному антигену.

В результате первой встречи запрограммированного лимфоцита с определенным антигеном образуются две категории клеток: **эффекторные**, которые немедленно выполняют специфическую функцию - секретируют антитела или реализуют клеточные иммунные реакции, и **клетки памяти**, которые циркулируют длительное время. При повторном поступлении данного антигена они быстро превращаются в лимфоциты-эффекторы, которые вступают в реакцию с антигеном. **При каждом делении запрограммированного лимфоцита после его встречи с антигеном количество клеток памяти увеличивается.**

**Иммунологическая толерантность** — состояние, характеризующееся «терпимостью» иммунной системы по отношению к чужеродным для неё Аг.

Иммунологическую толерантность подразделяют на:

- физиологическую;
- патологическую;
- искусственную.

**Физиологическая толерантность** подразумевает «терпимость» системы ИБН к собственным Аг.

- **Элиминация в антенатальном периоде** (когда иммунная система ещё недостаточно созрела) тех клонов лимфоцитов, которые подверглись антигенной перегрузке — массивному воздействию собственных Аг. Это положение выдвинули М. Бернет и Ф. Феннер в сформулированной ими клонально-селекционной гипотезе. В лабораторных условиях этот феномен воспроизводится путём подсадки эмбриону и плоду животного ткани или органа другого животного того же вида (аллотрансплантата). Повторная трансплантация взрослому животному такого же трансплантата не приводит к его отторжению — развивается толерантность к нему. Таких животных (в организме которых имеется генетически и антигенно чужеродная ткань или орган), называют химерами. Подобный химеризм развивается и у двуйцевых близнецов, которые, во время пренатального периода

обмениваются разногруппной кровью. Во взрослом состоянии им можно беспрепятственно переливать кровь обеих групп.

- **Изоляция Ag ряда органов от контакта с иммунными структурно-физиологическими барьерами.** К таким органам относятся мозг, глаза, семенники, щитовидная железа, которые отделены от внутренней среды организма гематотканевыми барьерами (гемато-энцефалическим, гемато-офтальмическим, гемато-тиреоидным). Эту разновидность толерантности называют изоляционной.
- **Подавление пролиферации и дифференцировки аутоагрессивных (действующих против собственных клеток) Т-лимфоцитов в центральном органе иммунной системы — тимусе.** Этот феномен называют центральной селекцией и ликвидацией аутоцитотоксических лимфоцитов.
- **Гибель (апоптоз) клонов лимфоцитов, активирующихся аутоантигенами.** В такой ситуации Т-лимфоциты, реагирующие на Ag собственного организма, экспрессируют Fas-рецепторы, на которые действуют Fas-лиганды нормальных клеток, что активирует программу апоптоза.
- **Депрессия цитотоксических лимфоцитов Т-супрессорами.**
- **Анергия Т-лимфоцитов, не активированных костимуляторами.**

### **Патологическая толерантность**

В этом случае речь идет о «терпимости» системой ИБН чужеродных Ag, чаще всего — бактерий, вирусов, паразитов, клеток злокачественных опухолей или трансплантата.

- **Иммунодефицитные состояния и иммунодефицит.**
- **Чрезмерное повышение активности Т-регуляторных лимфоцитов.** Последнее характеризуется торможением созревания эффекторных клеток иммунной системы: Т-киллеров, естественных киллеров, плазматических клеток.
- **Ингибирование или блокада цитотоксических реакций клеточного иммунитета на соответствующий Ag (чаще всего клеток опухоли, трансплантата или вирусосодержащих клеток) в результате «экранирования» антигенов антителами.**
- **Перегрузка иммунных клеток избытком образующихся в организме или вводимых в него извне чужеродных Ag.** Это может наблюдаться при синтезе аномальных белков в печени, амилоидозе, денатурации белковых молекул при массивных ожогах, введении большого количества белоксодержащих растворов (цельной крови, плазмы).
- **Гибель цитотоксических Т-лимфоцитов с развитием Т-клеточного иммунодефицита.** Это наблюдается при экспрессии другими клетками (например, опухолевыми) Fas-лигандов. Последние, взаимодействуя с Fas-рецепторами цитотоксических Т-лимфоцитов, активируют программу их апоптоза.

### **Искусственная толерантность**

- **Индукцированную (искусственную, медицинскую) толерантность** воспроизводят при помощи воздействий, подавляющих активность иммунной системы. Обычно с этой целью применяют ионизирующее излучение, высокие дозы цитостатиков и иммунодепрессантов.
- **Изоляционная.** Для создания состояния искусственной толерантности применяют также специальные (непроницаемые для иммунных клеток) камеры, имплантируемые

под кожу, слизистую оболочку, в мышцы или полости тела. В камеру помещают гомогенат или фрагменты чужеродной ткани (например, эндокринной железы для устранения недостатка эндогенного гормона). Такую разновидность толерантности называют изоляционной.

Состояние индуцированной толерантности применяют для повышения успеха трансплантации органов и тканей, лечения аллергии, болезней иммунной аутоагрессии, эндокринной недостаточности и некоторых других состояний.

Занятие № 7

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Противоинфекционный иммунитет.**

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Понятие о естественном и искусственном, активном и пассивном, общем и местном, постинфекционном и инфекционном (нестерильном) типах иммунитета.
2. Иммунитет против вне- и внутриклеточных паразитов.
3. Механизмы иммунной инактивации бактерий, грибов, простейших, вирусов и выделяемых ими токсинов и экзоферментов.
4. Противоопухолевый иммунитет. Механизмы трансплантационного иммунитета.

**Задание №1. Впишите в таблицу краткие характеристики различных видов иммунитета.**

Естественный	Искусственный
Активный	Пассивный
Общий	Местный
Инфекционный (нестерильный)	Постинфекционный (стерильный)

--	--

**Задание №2. Заполните таблицу механизмы инактивации бактерий.**

Факторы инактивации бактерий	Рисунок-схема отражающая механизм действия фактора
1) Фагоцитоз	
2) Антитела а) иммобилизация бактериальных клеток	
б) опсонизация	

в) блокировка факторов адгезии	
г) активация системы комплемента	
д) нейтрализация токсинов	
е) блокировка поверхностных молекул, обладающих патогенным действием	

3) Лизоцим и другие неспецифические гуморальные факторы	
---	--

**Задание №3. Заполните таблицу «Механизмы противовирусного иммунитета».**

Механизмы эффективные в отношении вирусов (описание)	Рисунок-схема
1. Интефероны	
2. Антитела  а) блокировка специфических вирусных белков, ответственных за адгезию проникновение вируса в клетку	

<p>б) индукция АЗКЦ (благодаря специфическому связыванию АТ с экспрессированными на поверхности клетки вирусными белками)</p>	
<p>3. Уничтожение клеток, пораженных вирусом цитотоксическими Т-лимфоцитами.</p>	

### **Особенности противогрибкового иммунитета**

Антигены грибов имеют относительно низкую иммуногенность: они практически не индуцируют антителообразование (титры специфических антител остаются низкими), но стимулируют клеточное звено иммунитета. Основными действующими факторами противогрибкового иммунитета являются активированные макрофаги, которые осуществляют АЗКЦТ грибов.

При микозах наблюдается аллергизация макроорганизма. Кожные и глубокие микозы сопровождаются, как правило, ГЗТ. Грибковые поражения слизистых оболочек дыхательных и мочеполовых путей вызывают аллергизацию по механизму ГНТ (реакция I типа). Напряженность противогрибкового иммунитета оценивается по результатам кожно-аллергических проб с грибковыми аллергенами.

### **Особенности иммунитета при протозойных инвазиях**

Паразитарная инвазия сопровождается формированием в макроорганизме гуморального и клеточного иммунитета. В крови определяются специфические антитела классов М и G, которые чаще всего не обладают протективным свойством. Однако они активируют АЗКЦТ с участием макрофагов, а в случае внутриклеточного паразитирования - естественных киллеров и  $\gamma\delta$ Т лимфоцитов. Паразитарные инвазии сопровождаются аллергизацией макроорганизма по механизму ГЗТ.

Характер противопаразитарного иммунитета определяется биологическими особенностями паразита. Многие паразиты обладают высокой антигенной изменчивостью, что позволяет им избегать действия факторов иммунитета. Например, каждой стадии развития малярийного плазмодия соответствуют свои специфические антигены.

Напряженность противопаразитарного иммунитета оценивается в серологических тестах по титру специфических антител и в кожно-аллергических пробах с протозойным антигеном.

### Особенности противоглистного иммунитета

Ведущую роль в осуществлении иммунной защиты макроорганизма от глистной инвазии играют эозинофилы, которые осуществляют АЗКЦТ. Эти клетки распознают паразитов, отмеченных специфическими IgE или IgA. Активированный эозинофил выделяет путем дегрануляции ряд токсичных субстанций (ферменты, белковые токсины), губительно действующих на гельминты.

Антигены гельминта, связываясь также с рецепторными комплексами тучных клеток слизистой оболочки, вызывают их дегрануляцию. Экскретированные биологически активные соединения вызывают интенсивную перистальтику, удаляющую паразита или его останки из просвета кишки.

Эозинофилы и тучные клетки синтезируют цитокины и липидные медиаторы, потенцирующие воспалительную реакцию в месте внедрения гельминта. Глистная инвазия сопровождается аллергизацией в основном по механизму ГЗТ.

Занятие № 8

Дата \_\_\_\_\_

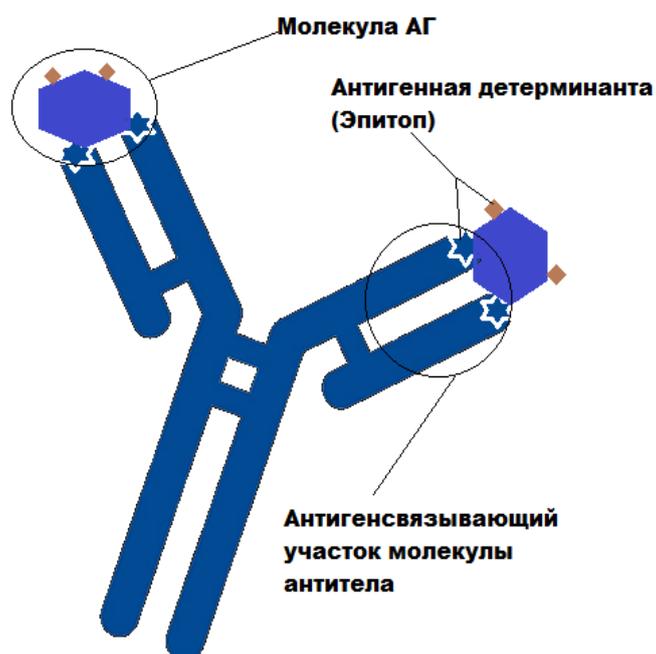
### Тема: Иммунодиагностика инфекционных заболеваний. Серологические реакции I порядка.

#### Основные вопросы, разбираемые на занятии:

1. Серологические реакции. Серологический метод диагностики, этапы, оценка.
2. Виды серологических реакций.
3. Реакции агглютинации и пассивной агглютинации.
4. Реакции иммунопреципитации.
5. Реакция нейтрализации.

**Серологические реакции** – комплекс лабораторных методик, направленных на **обнаружение** в исследуемом материале молекул обладающих свойствами **антигенов** (специфичность, антигенность, чужеродность, иммуногенность) **или антител** к специфическим антигенам.

В серологических реакциях используется принцип **специфического** связывания молекул антител со специфичными им молекулами антигенных детерминант (антигенов). Специфическое связывание происходит благодаря пространственному



соответствию (комплементарности) молекулы антигенсвязывающего участка молекулы антитела - антигенной детерминанте молекулы антигена.

Все **разнообразие** серологических реакций обеспечивается различными вариантами **обнаружения иммунных комплексов**, образующихся в результате взаимодействия антител с антигенами.

В рамках серологических реакций можно возможно:

1. Определение неизвестного антигена используя известные антитела (известной специфичности);
2. Определение неизвестных антител используя известные антигены (известной специфичности).

Условно серологические реакции можно подразделить на реакции **ПЕРВОГО ПОРЯДКА** и **ВТОРОГО ПОРЯДКА**.

**Задание №1. Отличия реакций первого порядка от реакций второго порядка.**

Реакции первого порядка	Реакции второго порядка

**Задание №2. Заполните таблицу «Механизмы серологических реакций первого порядка».**

НАЗВАНИЕ РЕАКЦИИ	МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ (рисунок-схема и описание)
Реакция агглютинации (прямой) на стекле, РА	

<p><b>Реакция (пассивной) непрямой гемагглютинации, РНГА</b></p>	<p><b>Реакция преципитации (в агаре (по Оухтерлони)</b></p>	<p><b>Реакция преципитации (кольцепреципитации)</b></p>	<p><b>Реакция агглютинации (прямой) (в пробирках)</b></p>
--	---	---	---

<b>Реакция латекс агглютинации</b>	
<b>Реакция Кумбса</b>	

**Задание 3. В тетрадях для конспектов напишите конспект на тему «Методы получения диагностических сывороток и МКАТ».**

**Лабораторная работа №1. Реакция агглютинации в пробирках и на стекле.**

**Часть 1. Реакция агглютинации на стекле**

**Ход работы:** На обезжиренное предметное стекло наносят две капли специфической (адсорбированной) сыворотки и каплю изотонического раствора. Капли на стекло наносят так, чтобы между ними было расстояние. Культуру петлей или пипеткой вносят в каплю изотонического раствора и в одну из капель сыворотки. Капля сыворотки, в которую не внесена культура, является контролем сыворотки. Смесь перемешивают стеклянной палочкой или покачивая предметное стекло в течение 2-3 минут. Контроль сыворотки должен остаться прозрачным, а в контроле антигена должна наблюдаться равномерная муть. Если в капле, где культура смешана с сывороткой, появятся хлопья агглютината на фоне прозрачной жидкости, результат считают положительным. При отрицательном результате реакции в капле будет равномерная муть, как в контроле антигена.

Результат:

Вывод:

**Часть 2. Развернутая реакция агглютинации в пробирках.**

**Ход работы:** в штативе устанавливают 7 пробирок. В 7-ю наливают 2,4мл физ. р-ра. Во все остальные – по 1мл.

1. В 7-ю пробирку добавляют 0,1мл сыворотки больного – получают разведение сыворотки 1:25.
2. Из 7 пробирки в 1-ю вносят 1,0мл разведенной сыворотки (получают разведение 1:50), перемешивают. Из нее 1,0 мл сыворотки переносят во вторую пробирку (получают разведение 1:100), перемешивают и переносят 1,0 мл сыворотки в 3-ю пробирку...и т.д. до 5-ти. В 6-ю пробирку сыворотку не вносят, так как в ней – контроль антигена.
3. В 1-6 пробирки вносят по 3 капли диагностикума. Штатив помещают в термостат на 2 часа при 37С. Делают предварительный учет, окончательный учет через 18-20 часов, выдерживая при комнатной температуре.

Ингредиенты	1	2	3	4	5	6	7
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	КА	КС(1/25)
0,9%р-р NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,4
сыворотка больного	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
диагностикум (в каплях).	3	3	3	3	3	3	-
Результат							

Учет результатов начинают с контролей. Контроль сыворотки должен оставаться прозрачным, контроль антигена – равномерно мутным. Просматривают пробирки в подхлдящем свете с помощью лупы или агглютиноскопа. Агглютинат постепенно оседает на дно в виде «зонтика», а жидкость над осадком просветляется.

Вывод:

Занятие № 9

Дата \_\_\_\_\_

**Тема: Иммунодиагностика инфекционных заболеваний. Серологические реакции II порядка. Современные иммунодиагностические реакции.**

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Реакции иммунного лизиса. Бактериолиз.
2. Реакция связывания комплемента.
2. Реакции иммунофлюоресценции: сущность, способы постановки.
3. Иммуноферментного анализа: сущность, способы постановки.
4. Радиоиммунологического анализа: сущность, способы постановки.
5. Иммуноблоттинг, механизмы и применение.

Задание №1. Заполните таблицу «Механизмы серологических реакций второго **порядка**».

НАЗВАНИЕ РЕАКЦИИ	МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ (рисунок-схема и описание)

<b>Реакция бактериолиза</b>	
<b>Реакция гемолиза</b>	
<b>Реакция связывания комплемента, РСК</b>	

#### **Лабораторная работа: Постановка основного опыта РСК**

Оттитрованные ингредиенты (АГ, комплемент, гемолитическая сыворотка) разводят физ.раствором. При постановке реакции вначале смешивают исследуемую сыворотку, антиген и комплемент. Смесь выдерживают в термостате при 37°С в течение 20-30 минут. По истечении указанного срока в пробирки добавляют сенсibilизированную гемолитическую систему. пробирки встряхивают, помещают в термостат при 37°С на 20-30 минут, а затем оценивают результат.

### Схема основного опыта РСК

Ингредиенты в мл.	1	2 (КА)	3 (КС)
Испытуемая сыворотка в разведении 1:5			
Антиген			
Комплемент			
Физ. раствор			
Пробирки инкубируют при 37°С в течение 20 – 30 минут			
Гемолитическая сыворотка			
Взвесь эритроцитов			
Пробирки инкубируют при 37°С в течение 20 – 30 минут			
Учет и оценка результата			

#### Учет и оценка результатов РСК.

В зависимости от степени выраженности гемолиза РСК оценивается по 4-плюсовой системе следующим образом:

“++++” резко положительная реакция – полная задержка гемолиза: эритроциты оседают на дно пробирки, жидкость над осадком бесцветна;

“+++” и “++” положительная реакция – полная задержка гемолиза: имеется осадок эритроцитов, жидкость окрашена в розовый цвет, более интенсивны й при ++;

“+” сомнительная реакция – неполный гемолиз: незначительный осадок эритроцитов, жидкость окрашена в розовый цвет;

“-” отрицательная реакция – полный гемолиз: жидкость ярко-розового цвета.

**Вывод:**

### Современные иммунодиагностические реакции

**Реакции иммунофлюоресценции (РИФ)**, иммунолюминесцентный метод (ИЛМ), метод флуоресцирующих антител (МФА) (англ. Immunofluorescence) - лабораторный иммунологический метод качественного определения антигена по известному глобулину или антител по известному антигену.

Сущность метода флуоресцирующих антител заключается в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами.

Различают РИФ прямой, РИФ непрямой и непрямой РИФс комплементом.

При прямом методе (пРИФ) на препарат с антигеном наносят известную, предположительно соответствующую ему, люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса, он обнаруживается, люминесцентной микроскопией в виде зеленоватого свечения разной степени интенсивности и четкости.

При непрямом методе (нРИФ) на мазок из наложения антигена и немеченой сыворотки наносят антиглобулиновую (видовую по отношению к диагностической сыворотке) люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса антиген-антитело, последний компонент реагирует с видовой антиглобулиновой люминесцирующей сывороткой. При нРИФ с комплементом, его добавляют к комплексу антиген-антитело и идентифицируют образование тройного комплекса по люминесцирующей антикомплементарной сыворотке.

Результаты описываются в так называемых «крестах» (от одного + до четырех +++) — субъективная градация исследователем степени выраженности реакции. Непрямые методы требуют наличия только антиглобулиновых видовых сывороток с флюорохромами, но при этом необходимо большое количество тестовых контролей. При постановке прямым методом делается только один контроль, но требуется множество моноспецифических сывороток. Недостатками всех видов РИФ является ограниченная чувствительность из-за наличия возможных перекрестных реакций между близкими по антигенному составу объектами и неспецифическая флуоресценция вследствие адсорбции флуоресцирующих глобулинов на различных элементах препарата. В настоящее время используются коммерческие стандартные конъюгаты, содержащие глобулины к исследуемым антигенам.

**Задание №2. Опираясь на материал, изложенный выше, нарисуйте схему реакции иммунофлуоресценции (прямой и непрямой).**

**Иммуноферментный анализ (ИФА, (англ.enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом и изменяется цвет продукта реакции — интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.**

Метод ИФА состоит из трех стадий:

1. На поверхности лунки планшета, сорбирован белок - антиген инфекционного агента или антитело к нему. В лунку вносится исследуемый биологический материал, чаще всего сыворотка крови больного. Если в ней содержатся антитела к данному инфекционному агенту или антигены (сами инфекционные агенты), то они образуют иммунные комплексы “антиген-антитело” и остаются связанными при последующей промывке. На этом первая стадия заканчивается. Это основная — “специфическая” стадия процесса. Последующие стадии нужны лишь для выявления образовавшегося иммунного комплекса.

2. На второй стадии анализа в лунку вносят комплекс, состоящий из антитела и фермента (т.н. конъюгат), способный связываться с образовавшимися иммунными комплексами. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии процесса иммунные комплексы, то конъюгат с ними связывается.

3. На следующей стадии в лунку добавляется раствор бесцветного вещества — хромогена. Это вещество приобретает окраску после расщепления его присутствующим в ячейке ферментом. То есть, если все элементы цепочки присутствуют, в лунке образуется окрашенный комплекс. Произошедшая цветовая реакция полностью пропорциональна предшествующей иммунологической, что позволяет выявить и количественно измерить в исследуемом биологическом материале искомый антиген или антитело.

**Задание №3. Опираясь на материал, изложенный выше, нарисуйте схему постановки иммуноферментного анализа.**

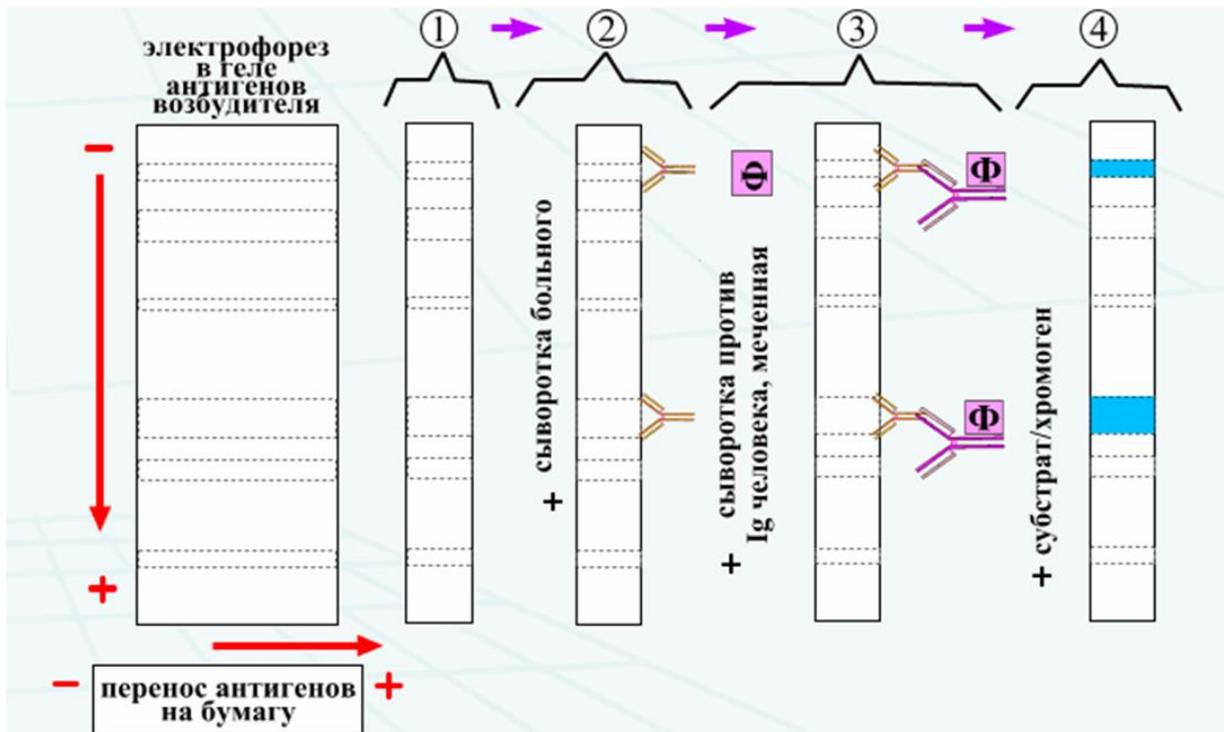
#### **Радиоиммунологический анализ (РИА), радио-иммунный метод (РИМ).**

Радиоиммунологический анализ - метод количественного определения биологически активных веществ, (гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и др.) в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомого стабильного и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами. Последними чаще всего являются специфические антитела. В связи с тем, что меченый антиген добавляют в определенном количестве, можно определить часть вещества, которая связалась с антителами, и часть, оставшуюся несвязанной в результате конкуренции с выявляемым немеченым антигеном. Исследование выполняют *in vitro*. Для

РИА выпускают стандартные наборы реагентов, каждый из которых предназначен для определения концентрации какого-либо одного вещества. Исследование проводят в несколько этапов: смешивают биологический материал с реагентами, инкубируют смесь в течение нескольких часов, разделяют свободное и связанное радиоактивное вещество, осуществляют радиометрию проб, рассчитывают результаты. Метод отличается высокой чувствительностью, его можно использовать в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, для установления причин бесплодия, нарушения развития плода, в онкологии для определения маркеров опухолей и контроля за эффективностью лечения, для определения концентрации в крови иммуноглобулинов, ферментов и лекарственных веществ. В ряде случаев исследования выполняют на фоне нагрузочных функциональных проб (например, определение содержания инсулина в сыворотке крови на фоне пробы на толерантность к глюкозе) либо в динамике (например, определение в крови половых гормонов на протяжении менструального цикла).

**Задание №4. Опираясь на материал, изложенный выше, нарисуйте схему постановки радиоиммунного анализа.**

**Иммуноблоттинг (вестернблоттинг)** - высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.



Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг - от англ. blot, пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с "блотами" антигенов\*. На эти полоски наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3). Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента.

Занятие № 10

Дата \_\_\_\_\_

### Тема: Иммунный статус.

#### Основные вопросы, разбираемые на занятии:

1. Что такое иммунный статус.
2. Что такое иммунная диагностика.
3. Основные показания, характеристики и отличия тестов 1-го и 2-го уровней.
4. Биологические материалы, используемые для иммунодиагностики.
5. Патогенетический принцип оценки функций иммунной системы.
6. Определение термина иммунорегуляторный индекс.
7. Современные методы иммуноанализа.
8. Клиническое значение изменения содержания в крови основных субпопуляций лимфоцитов.
9. Современные подходы к определению функции фагоцитоза
10. Клиническое значение изменения содержания в крови компонентов комплемента.

**Иммунный статус** - комплекс количественных и функциональных показателей, отражающих конкретное состояние иммунной системы, определяемое с помощью стандартных общепринятых тестов.

Кроме того, выделяют понятие «иммунодиагностика».

**Иммунодиагностика** - проведение лабораторного и клинического исследований, которые помогают выявить конкретные нарушения в иммунной системе, позволяющие:

- 1) выявить нарушенное звено в стройной системе функционирования иммунной системы;
- 2) провести анализ этиологии, патогенеза, прогноза заболевания;
- 3) выбрать средство иммунокоррекции;
- 4) провести оценку эффективности проводимой иммунокорректирующей терапии.

**Оценка иммунного статуса** складывается из нескольких этапов:

1. **Клинико-лабораторный этап**, который включает в себя:

- сбор и оценку иммунологического анамнеза (частота инфекционных заболеваний, характер их течения, выраженность температурной реакции, наличие очагов хронической инфекции, реакции на вакцинации или введение лекарственных средств);
- оценку результатов общего клинического анализа крови (содержание гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов);
- выявление с помощью бактериологических, вирусологических и/или серологических исследований бактерионосительства и вирусоносительства.

2. **Лабораторно-иммунологический этап.**

На этом этапе в иммунологической лаборатории проводятся исследования, целью которых, собственно, и является качественная и количественная оценка функциональной активности иммунной системы (иммунокомпетентных клеток). Для этого разработан ряд (набор) тестов, которые делят на тесты 1-го (ориентировочного) и 2-го (аналитического) уровней.

**Отличительные особенности иммунодиагностических тестов 1 и 2 уровня.**

<b>Тесты 1-го уровня</b>	<b>Тесты 2-го уровня</b>
Ориентировочные	Аналитические
Методики доступны	Методики трудоемкие
Получение результата в течении нескольких суток	Получение результата в течении суток, недель.
Информативны	Высокая информативность
Возможно проведение в гематологических и биохимических лабораториях	Возможно проведение только в специализированных лабораториях

**Иммунодиагностические методы 1-го уровня**

Иммунодиагностические методы 1-го уровня включают в себя определение:

- 1) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

4) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

5) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Минимальный набор тестов должны выполнять все лаборатории и центры клинической иммунологии, входящие в систему иммунологической службы РФ.

**Иммунодиагностические методы 2-го уровня включают в себя определение:**

1. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

5. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

8. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

9. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

10. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Нормативные показатели состояния иммунной системы у человека.**

1. Лейкоциты	4,0-9,5 x 10 <sup>9</sup> /л	
2. Нейтрофилы	4,8-7,5 x 10 <sup>9</sup> /л	50-77 %
3. Лимфоциты	1,0-4,5 x 10 <sup>9</sup> /л	18-38%
4. Моноциты	0,09-0,6 x 10 <sup>9</sup> /л	2-10%
5. Базофилы		0,5-1,0 %
6. Эозинофилы		1-4 %
7. IgM	0,8-2,0 г/л	58-230 МЕ/мл
8. IgG	8-13,0 г/л	80-218 МЕ/мл
9. IgA	1,4-3,0 г/л	54-268 МЕ/мл
10. IgE	0,00025 г/л	0-200 МЕ/мл
11. IgD	0,03 г/л	20 МЕ/мл
12. ЦИК (циркулирующие иммунные комплексы)	30 – 90 Ед	
13. Фагоцитирующая активность нейтрофилов (латекс-тест)	55-95%	
14. Комплемент	20-50 ед	75-160 КЕ/л
15. С1q	58-72 мг/л	
16. С3	1,3-1,5 г/л	
17. С4	150-450 мг/л	
18. С5	51-77 мг/л	
19. С9	47-69 мг/л	
20. Пропердин	0,02 г/л	
21. Т-лимфоциты, CD3 <sup>+</sup>	0,7-1,9 x 10 <sup>9</sup> /л	65-80 %
22. Т-хелперы, CD4 <sup>+</sup>	0,4-1,4 x 10 <sup>9</sup> /л	35-48 %
23. Т-киллеры, CD8 <sup>+</sup>	0,2-0,9 x 10 <sup>9</sup> /л	20-30 %
24. Натуральные киллеры, CD16 <sup>+</sup>	0,1-0,7 x 10 <sup>9</sup> /л	10-15 %
25. В-лимфоциты, CD20 <sup>+</sup>	0,1-0,4 x 10 <sup>9</sup> /л	6-12 %

Результатом оценки лабораторных показателей функционирования иммунной системы является – иммунограмма.

**Иммунограмма назначается при:**

1. Частых – более 6 раз в год — инфекционных заболеваний кожи, слизистых оболочек, верхних дыхательных путей с тяжелым, длительным течением, низкой успешностью лечения антибиотиками, частыми осложнениями.
2. Повышении температуры тела неясного происхождения более 2-х недель без видимой причины.
3. Увеличении лимфатических узлов неясного генеза.
4. Постоянном чувстве усталости, боли в мышцах и суставах, снижении работоспособности (вплоть до ее потери).
5. Снижении массы тела без видимой причины.

**Иммунограмма не назначается при:**

1. Венерических заболеваниях – ведь половой инфекцией может заболеть и полностью здоровый человек.
2. Нормальной беременности — в процессе вынашивания плода развивается физиологическая иммуносупрессия – угнетение иммунитета.
3. Подозрении на ВИЧ – сперва проводится специфическая диагностика ВИЧ инфицирования, а уж затем иммунограмма.

4. Острой вирусной инфекции – данные будут изменены и установить, кто же виновен – будет невозможно.
5. Нарушениях местного иммунитета кожи и слизистых оболочек — частая сыпь на коже является показанием к постановке кожно-аллергических проб, а не иммунограммы.

**СРС. В тетрадах для конспектов напишите конспект на тему «Проточная цитометрия. Механизм. Применение».**

**В тетрадах для конспектов напишите конспект на тему «Критические периоды в онтогенезе иммунной системы».**

Занятие № 11

Дата \_\_\_\_\_

### **Тема: Типы иммунопатологии.**

#### **Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Иммунодефицитные состояния: причины возникновения, классификация.
2. Врождённые и приобретённые иммунодефициты.
3. Аутоиммунные болезни, механизмы развития.
4. Аллергия. Определение. Аллергены
5. Стадии аллергии.
6. Типы аллергических реакций.

Существует 4 типа патологии иммунной системы

- Иммунологическая недостаточность вследствие дефектов развития или действия повреждающих факторов (иммунодефициты);
- Гиперчувствительность, или извращенная реактивность, основной формой которой является аллергия;
- Иммунопатология, обусловленная аутоагрессией;
- Опухоли иммунной системы.

**Иммунодефициты** – снижение функциональной активности основных компонентов системы иммунитета, ведущее к нарушению антигенного гомеостаза организма и прежде всего к снижению способности организма защищаться от микробов, проявляющееся в повышенной инфекционной заболеваемости.

Среди иммунодефицитных состояний различают:

**1) первичные иммунодефициты (врожденные);**

**2) вторичные иммунодефициты (приобретенные).**

Первичные иммунодефициты (ПИД), в свою очередь по механизму развития подразделяются на 4 основные группы:

**1-я группа** - преимущественно гуморальные, или В-клеточные ПИД;

**2-я группа** - комбинированные ПИД (при всех Т-клеточных иммунодефицитах есть нарушение функции В-клеток);

**3-я группа** - ПИД, обусловленные дефектами фагоцитоза;

**4-я группа** - ПИД, обусловленные дефектами в системе комплемента.

**Задание 1. Заполните таблицу «Первичные иммунодефициты»**

Название	Суть нарушения
Преимущественно гуморальные	
Транзиторная гипогаммаглобулинемия у детей	
Селективный дефицит иммуноглобулина А	
Х-сцепленная агаммаглобулинемия (болезнь Брутона)	
Общая переменчивая иммунная недостаточность	
Комбинированные, с преимущественным дефектом Т-лимфоцитов	
Тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность	
Синдром ДиДжорджи	
Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром	
Обусловленные дефектами фагоцитоза	
Хроническая гранулематозная болезнь	

Дефекты адгезии лейкоцитов	
Обусловленные дефектами в системе комплемента	
Синдром Шегрена	
Наследственный ангионевротический отек	
Системная красная волчанка (СКВ)	

**Приобретенный (вторичный) иммунодефицит** возникает в течение жизни пациентов и является результатом действия на организм целого ряда химических, радиоактивных, медикаментозных и других веществ, а также влияния вирусных инфекций, хронических воспалительных процессов, сложных операций, травм, стресса. Приобретенные иммунодефициты представляют собой группу заболеваний, в основе которых лежат нарушения либо **отдельных звеньев иммунитета**, либо **комплексное повреждение этой системы** под влиянием факторов внешней среды или патологических процессов, в своей этиологии **не связанных с иммунной системой**, но оказывающих на нее подавляющее действие.

Иммунодефицитное состояние может быть вызвано

- Облучением,
- Глюкокортикоидной терапией,
- Применением фармакологических препаратов
- Вирусными инфекциями
- Лимфопролиферативными заболеваниями
- Истощением, в результате недостаточного питания (самая частая причина иммунодефицитных состояний).

Кроме того, иммунодефицит возникает в качестве сопутствующего явления при таких патологиях, как заболевания желудочно-кишечного тракта, нефротические нарушения, множественные миеломы и др.

Наиболее опасен в настоящее время синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Иммунодефицит, называемый СПИДом, - единственный известный на сегодняшний день приобретенный иммунодефицит, связанный с конкретным вирусом-возбудителем. Дефекты, обуславливающие вторичные иммунодефициты, разнообразны, и как при врожденном иммунодефиците, затрагивают различные компоненты иммунной системы.

**Аллергия** (от греч . allos - другой и ergon - действие) - это повышенная или извращенная чувствительность организма к какому-либо аллергену - веществу, вызывающему аллергию.

### **Классификация аллергенов**

**Экзоаллергены** (попадающие в организм извне)

#### Инфекционные аллергены

Бактерии (стафилококки, стрептококки, нейссерии, кишечная палочка, протей и др.)

Вирусы

Грибы (Aspergillus, Penicillium, Rizopus, Alternaria, Candida, Cladosporium, Pleurotus и др.)

Простейшие

Паразиты (гельминтов, токсокар, лямблий и др.)

#### Неинфекционные аллергены

##### *Ингаляционные аллергены*

- Бытовые аллергены
  - пыль бытовая и производственная
  - споры дрожжеподобных и плесневых грибов
  - клещи домашней пыли
  - корм для рыб (мотыль, дафнии)
- Эпидермальные аллергены
  - Эпидермис, частицы эпидермиса, перхоть, и волосы человека, шерсть, секреты (слюна, моча и выделение сальных и потовых желёз) животных (кошки, собаки, свиньи, морские свинки, хомяки, лошади и др.).
- Пыльцевые аллергены пыльца растений: деревьев, злаковых трав, сорных трав (амброзия, полынь обыкновенная, подсолнечник), луговых трав (овсяница луговая, ежа, мятлик) берёзы, дуба и др.
- Продукты химического производства (промышленные аллергены): краски, синтетические материалы, ядохимикаты, латекс, скипидар, масла, никель, хром, мышьяк, деготь, смола, дубильные вещества, танин, пирогаллол, инсектофунгициды, лаки, фенопласты и аминопласты, формалин, мочевины, химические чистящие средства (стиральный порошок, жидкости для мытья посуды) и др.
- Лекарства антибиотики, сульфаниламиды, НПВС ит. д.
- Частицы тел насекомых

##### *Энтеральные аллергены*

- Пищевые аллергены (чаще гликопротеиды, реже полипептиды и гаптены):
  - Пищевые продукты: растительные, животные – мёд, рыба, молоко, цитрусовые, орехи, яйца, кунжут, море продукты, бобовые, злаки, томаты и др.
  - Добавки (консерванты, эмульгаторы, красители, др.)
  - Лекарства
  - Метаболиты насекомых (экскременты и пр.)

##### *Парентеральные аллергены*

- Лекарства
- Сыворотки
- Инсектные аллергены: яды перепончатокрылых насекомых при ужалении (пчелиный, осиные, шмелиные, шершней, оводов, слепней и др. яды)
- слюна кровососущих насекомых (комары, клопы, мошка) при укусе

**Эндоаллергены** (образующиеся в самом организме, аутоаллергены)

**Первичные (или естественные) эндоаллергены (аутоаллергены)** – это антигены, содержащиеся в некоторых органах (хрусталике глаза, в коллоиде щитовидной железы, сером веществе головного мозга, семенниках) в изолированном от аппарата иммуногенеза состоянии. При повышении проницаемости гистологических барьеров происходит дистопия антигенов этих органов. Контакт с иммунокомпетентными клетками и начинается выработка аутоантител – возникает аутоиммунный тиреоидит, орхит и т. д.

**Вторичные (приобретенные) эндоаллергены (аутоаллергены)** Образуются: Из собственных белков под влиянием вредных факторов (высокая, низкая температура, ионизирующее излучение, ишемия органа). На них вырабатываются антитела. Эти механизмы играют важную роль в развитии лучевой, ожоговой болезней ит. д. Под влиянием воздействия микроорганизмов на белки макроорганизма;

Антиген при попадании в организм вызывает его **сенсibilизацию**. **Сенсibilизация** – это иммунологически опосредованное повышение чувствительности организма к антигенам (аллергенам) экзогенного или эндогенного происхождения. Понятия сенсibilизации и аллергии различаются между собой. Аллергия включает в себя не только повышение чувствительности к какому-либо антигену, но и реализацию этой повышенной чувствительности в виде аллергической реакции. **Вначале повышается чувствительность** к антигену, и только тогда, **если** аллерген (антиген) остается в организме или попадает в него вновь, **развивается аллергическая реакция**, т. е. сама аллергическая реакция имеет две составляющие части. Эти части разделены во времени. При этом сенсibilизация является первой (или подготовительной) частью, а вторая часть является собственно аллергической реакцией.

**По характеру механизмов**, которые участвуют в развитии аллергии, выделяют **III стадии**.

**I – иммунологическая стадия.** Она охватывает все изменения в иммунной системе, возникающие с момента поступления аллергена в организм, образование антител и сенсibilизированных лимфоцитов и соединение их с повторно поступившим или существующим в организме аллергеном.

**II – патохимическая стадия.** На этой стадии образуются биологически активные медиаторы. Медиаторы образуются при соединении аллергена с антителами или сенсibilизированными лимфоцитами в конце иммунологической стадии.

**III – патофизиологическая стадия**, или стадия клинических проявлений. Она характеризуется тем, что образовавшиеся медиаторы оказывают патогенное действие на клетки, органы и ткани организма.

**Задание №1. Заполните таблицу «Механизмы аллергических реакций».**

Тип аллергической реакции	Механизм (рисунок-схема)	Варианты клинических проявлений
---------------------------	--------------------------	---------------------------------

I тип Реагиновый (ГНТ)		
II тип Цитотоксический		
III тип Иммунокомплексный		
IV тип Гиперчувствительность замедленного типа (ГЧЗТ)		

**Тема: Иммуноterapia. Иммунопрофилактика.****Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Иммунопрофилактика инфекционных заболеваний.
2. Вакцины. Типы вакцин.
3. Основные бактериальные, вирусные и паразитарные вакцины.
4. Факторы, оказывающие влияние на эффективность поствакцинального иммунитета.
5. Пассивная иммунопрофилактика.
6. Иммунные сыворотки и сывороточные иммунопрепараты.
7. Иммуноterapia инфекционных заболеваний.
8. Препараты для иммунотерапии. Механизм действия.

**Компоненты вакцин:****1. Протективные антигены.**

Основу каждой вакцины составляют протективные антигены, представляющие собой лишь небольшую часть бактериальной клетки или вируса и обеспечивающие развитие специфического иммунного ответа. Протективные антигены могут являться белками, гликопротеидами, липополисахаридобелковыми комплексами. Они могут быть связаны с микробными клетками (коклюшная палочка, стрептококки и др.), секретироваться ими (бактериальные токсины), а у вирусов располагаются преимущественно в поверхностных слоях суперкапсида вириона.

**2. Консерванты, стабилизаторы, антибиотики.**

Эти компоненты вакцин используются для ингибиции и предотвращения роста бактерий в вирусных культурах, для стабилизации антигенов. Для лиофилизации используют лактозу, сахарозу, человеческий альбумин, мальтозу и др. В качестве консервантов наиболее часто в отечественных вакцинах используют меркуротиолят (мертиолят или тимеросал), стабилизатора - раствор хлористого магния. Наряду с этим в зарубежных вакцинах используют формальдегид, гидрометиламинометан, фенол, феноксиэтанол и др.

**3. Растворители вакцин.**

В качестве растворителей могут использоваться стерильная вода, физиологический раствор, раствор, содержащий протеин или другие составляющие, происходящие из биологических жидкостей - сывороточные протеины.

**4. Адьюванты** (лат. *adjuvans* — помогающий, способствующий) - вспомогательные факторы различного происхождения и различной химической природы, оказывающие неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ при совместном их применении со специфическими антигенами; вещества, повышающие иммунный потенциал вакцин.

**Задание 1. Заполните таблицу «Современная классификация вакцин»**

		Состав	Примеры	Применение
<b>Цельноклеточные и цельновирионные</b>	Живые аттенуированные			
	Инактивированные (убитые)			
<b>Субъединичные</b>	Химические			
	Расщепленные			
	Рекомбинантные			
<b>Анатоксины</b>				

Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 252н

«Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»

«Национальный календарь профилактических прививок»

Прививки против	Сроки вакцинации	Сроки ревакцинации			Вакцины	Примечание
		1	2	3		
Гепатита В	новорожденные (в первые 24 часа) 1 месяц 6 месяц	-	-	-	Энджерикс В Эувакс В	Детям, родившимся от матерей-носителей вируса гепатита В, вакцинация проводится по схеме 0-1-2-12 месяцев
Туберкулеза	новорожденные (3-7 дней)	6-7 лет	14 лет	-	БЦЖ-М	ревакцинация проводится только туберкулиннегативным лицам
Пневмококковой инфекции	2 месяца 4,5 месяца	15 месяцев	-	-	Превенар 13	
Коклюша Дифтерии Столбняка	3 месяца 4,5 месяца 6 месяцев	18 месяцев	6-7 лет	14 лет	Инфанрикс АДС-М Пентаксим	Взрослым каждые 10 лет от момента последней вакцинации АДС
Полиомиелит	3 месяца 4,5 месяца 6 месяцев	18 месяцев	20 месяцев	14 лет	ОПВ Имовакс Полио Полиорикс Пентаксим	
Гемофильной инфекции	3 месяца 4,5 месяца 6 месяцев	18 месяцев	-	-	Акт-ХИБ Пентаксим	
Кори Краснухи Эпидемического паротита	12 месяцев	6 лет	-	-	Приорикс	

**Задание 2. Заполните таблицу «Сывороточные препараты»**

СЫВОРОТОЧНЫЕ ПРЕПАРАТЫ					
Гомологичные (гаммаглобулины)		Гетерологичные (иммунные сыворотки)			Моноклональные АТ
		Диагностические		Лечебные	
Нормальные	Специфичные	Противовирусные	Противобактериальные	Антитоксические	

п р и м е р ы						
п о л у ч е н и е						
п р и м е н е н и е						

**Вопросы к зачету по иммунологии:**

1. Введение в иммунологию. история развития иммунологии.
2. Иммунитет и его виды.
3. Понятие о факторах неспецифической резистентности организма. Внешние и внутренние барьеры, клеточные и гуморальные факторы.
4. Фагоцитоз. Клетки, участвующие в фагоцитозе. Стадии и виды фагоцитоза. Кислород-зависимые и кислород-независимые механизмы бактерицидности. Опсонины. Методы изучения фагоцитарной активности клеток.
5. Гуморальные факторы резистентности. Лизоцим, нормальные антитела, белки острой фазы.

6. Комплемент, понятие, роль в реакциях неспецифической резистентности, механизм действия. Классический и альтернативный пути активации комплемента.
7. Интерфероны, природа, механизм действия, способы получения, применение. Понятие об интерфероногенах.
8. Нормограмма резистентности.
9. Понятие об иммунитете, его виды. Пути формирования естественного и искусственного иммунитета.
10. Становление иммунной системы в эмбриогенезе.
11. Иммунитет новорожденных.
12. Развитие иммунной системы в постнатальном периоде
13. Функции иммунной системы. Центральные и периферические органы иммунной системы.
14. Генез иммунокомпетентных клеток (макрофаги, В-, Т-лимфоциты). Клеточная кооперация в иммунном ответе.
15. Понятие об антигенах, их строение и свойства. Антигены бактерий и вирусов.
16. Антитела (иммуноглобулины), структура, классы, функции. Понятие о моноклональных антителах. Гибридомы, получение, применение.
17. Антителообразование: первичный и вторичный иммунный ответ. Иммунологическая память.
18. Типы иммунного ответа при инфекционных заболеваниях.
19. Схема Th1 ответа. Эффекторы клеточного ответа.
20. Схема Th2 ответа. Эффекторы гуморального ответа.
21. Антитоксический иммунитет, его особенности.
22. Антивирусный иммунитет и его особенности.
23. Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма.
24. Иммунокомпетентный и иммунокомпрометированный организм.
25. Иммунологические взаимоотношения в системе «мать-плод».
26. Реакция агглютинации, ее разновидности, механизм и техника постановки.
27. Реакции пассивной агглютинации. Реакции ко-агглютинации, латекс-агглютинации и непрямой гемагглютинации. Механизм и применение.
28. Реакция преципитации, ее разновидности, механизм и применение.
29. Феномен вирусной гемагглютинации, применение и механизм реакции гемагглютинации (РГА). Реакция торможения гемагглютинации (РТГА), применение и механизм.
30. Реакция нейтрализации (РН) с использованием лабораторных животных (РБН) и культуры ткани (метод цветной пробы). Механизм и применение.
31. Серологические реакции с использованием метки. Реакция иммунофлюоресценции (прямая и непрямая РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА). Механизм реакций.
32. Имуноблотинг. Механизм и применение.
33. Типы вакцин. Получение живых, убитых, субъединичных и рекомбинантных вакцин. Проверка их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
34. Анатоксины. Получение анатоксинов. Адьюванты, механизм их действия.
35. Получение лечебных иммуноглобулинов и антитоксических сывороток. Проверка их реактогенности и иммуногенности.
36. Диагностические препараты. Антигенные препараты (диагностикумы, эритроцитарные диагностикумы, антигены).
37. Диагностические сыворотки. Получение и применение. Способ получения адсорбированных агглютинирующих сывороток по Кастеллани.
38. Аллергия. Классификация гиперчувствительности по Джеллу и Кумбсу.

39. IV тип гиперчувствительности (клеточноопосредованный), его роль в инфекционном процессе. Реализация механизмов клеточного типа аллергии в нестерильном иммунитете.
40. Механизм кожно-аллергических реакций. Инфекционные аллергены как диагностические препараты.
41. Роль I типа (анафилактического) и III типа (иммунокомплексного) аллергических реакций в развитии побочных эффектов серотерапии. Правила введения гетерологических сывороток и иммуноглобулинов.

## Приложение 1.

### Принципы организации и оборудования микробиологической лаборатории, правила работы в ней

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля выполняет бактериологические, вирусологические и иммунологические исследования. В соответствии с назначением, лаборатория должна быть оснащена соответствующей аппаратурой и помещением. Лаборатория должна располагаться в отдельном здании или изолированной его части, оборудована водопроводом, канализацией, отоплением, горячим водоснабжением и иметь отдельный вход. Микробиологическая лаборатория общего назначения должна иметь следующие комнаты.

1. Лабораторные
2. Средоварочную
3. Бактериологическую с боксами
4. Моечную
5. Виварий
6. Подсобные помещения (душ, склад, гардероб, туалет)

Лабораторная комната должна быть светлой, просторной, стены окрашены масляной краской или облицованы керамической плиткой. В лабораторной комнате необходима холодная и горячая вода, раковина, дезинфицирующий раствор для мытья и обработки рук, аптечка для оказания первой медицинской помощи. В комнате должен находиться холодильник, термостат, центрифуги, микроскопы, лабораторная мебель, рабочие столы, емкость для сбора инфицированной посуды и материала.

Бактериологическая комната с боксами. Для работы в стерильных условиях в бактериологической комнате должны быть оборудованы боксы с предбоксниками, с системой приточно-вытяжной вентиляции и бактерицидными лампами. В боксе должен находиться стол с необходимыми принадлежностями для проведения стерильных посевов (горелка, стерильные пипетки, пробирки, чашки Петри и пробирки с питательной средой, бактериологическая петля и др.). Поверхность рабочего стола должна быть водонепроницаема, устойчива к дезинфектантам, кислотам, щелочам, органическим растворителям и умеренному нагреванию. Стены, потолок и пол комнаты должны быть моющимися, непроницаемыми для жидкости, устойчивы к дезинфицирующим растворам. В настоящее время используют для проведения стерильных работ ламинированные боксы, где оборудована подача стерильного воздуха под давлением.

Автоклавная используется для стерилизации посуды, питательных сред, одежды, а также для обеззараживания лабораторных отходов. Автоклавная должна быть оснащена следующим оборудованием: автоклавы, печи Пастера, стерилизаторы различной емкости, шкафы для стерильной посуды. К работе на автоклавах допускаются лица прошедшие специальную подготовку.

Виварий предназначен для проведения исследований на животных. Необходимо иметь два помещения вивария – одно для содержания чистых животных и второе для лабораторных животных, с которыми проводятся исследования. Вход в виварий должен быть ограничен специально отобранным персоналом. Клетки, кормушки для животных должны быть изготовлены из материала устойчивого к дезинфицирующим растворам.

Моечная комната предназначена для мойки лабораторной посуды и должна быть оборудована холодным и горячим водоснабжением, раковиной, а также шкафами для хранения и складирования пипеток, колб, чашек Петри и другой посуды.

Средоварочная комната располагается рядом с моечной и стерилизационной комнатами и предназначена для приготовления и разлива питательных сред. Комната оборудуется газовой или электрической плитой, раковиной с подведенной холодной и горячей водой. В ней необходимо иметь дистиллятор,

холодильник для хранения питательных сред и биологических компонентов, бокс для приготовления и разлива питательных сред и растворов в стерильных условиях, шкафы для хранения сухих питательных сред, лабораторной посуды и химических реактивов.

## Приложение 2.

### Сложные методы окраски

#### ***Методика окраски по Граму***

1. На мазок кладут фильтровальную бумагу и наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 1-2 мин.
2. Снимают бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 мин.
3. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 96<sup>0</sup> спирте в течение 30 сек.
4. Промывают водой.
5. Красят 1-2 мин водным раствором фуксина.
6. Промывают водой и высушивают.

#### ***Методика окраски кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена***

1. На фиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля и осторожно нагревают на горелке до появления паров. Операцию повторяют 2-3 раза.
2. Когда препарат остынет, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают препарат водой.
3. Препарат погружают 2-3 раза в стакан с 5% серной кислотой на 1-2 сек.
4. Тщательно промывают препарат водой и докрашивают щелочным метиленовым синим 3-5 мин.
5. Промывают водой и подсушивают.

#### ***Метод окраски по Нейссеру***

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синей 4 мин, затем сливают краску.
2. Промывают водой и наливают раствор Люголя на 20-30 сек.
3. Не промывая водой, окрашивают везувином 1-3 мин.
4. Промывают водой, высушивают.

#### ***Метод выявления капсулы по Бурри-Гинса***

1. На середину предметного стекла наносят каплю черной туши и смешивают ее с помощью петли с каплей культуры капсульных бактерий.
2. Краем другого предметного стекла делают мазок по типу кровавого. Мазок сушат на воздухе и фиксируют в пламени горелки.
3. Окрашивают 5 мин карболовым фуксином, разведенным водой 1:3.
4. Осторожно промывают водой, высушивают.

#### ***Метод окраски спор по Ожешко***

1. На высушенный мазок наливают 0,5 % раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1-2 мин.
2. Препарат промывают водой и фиксируют над пламенем горелки.
3. Окрашивают по способу Циля-Нильсена.

#### ***Метод окраски по Романовскому-Гимзе***

1. Мазки, фиксированные в метиловом спирте, окрашивают раствором (1 мл готовой жидкой краски + 2 мл основного буферного раствора + 47 мл дистиллированной воды) в течение 40—120 мин (продолжительность окрашивания подбирают эмпирически).
2. Ополаскивают в дистиллированной воде, высушивают.

## Приложение 3.

## Перечень рекомендуемой литературы

### Основная:

№	Авторы	Наименование	Изд-во, год	Назначение
1	Зверев В.В., Бойченко М.Н.	Медицинская микробиология, вирусология и иммунология	М., 2010	Учебник
2	Тец В.В.	Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии	М., 2002	Практикум

### Дополнительная:

№	Авторы	Наименование	Изд-во, год	Назначение
1	Борисов Л.Б.	Медицинская микробиология, вирусология и иммунология	М., 2002	Учебник
2	Воробьев А.А.	Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии	М., 2003	Атлас
3	Поздеев О.К.	Медицинская микробиология	М., 2005	Учебник

### Электронные ресурсы

№	Авторы	Наименование	Изд-во, год	Назначение	Ссылка
1	Коротяев А.И., Бабичев С. А	Медицинская микробиологи, иммунология и вирусология	СПб. : СпецЛит, 2010	Учебник для мед. вузов	<a href="http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785299004250.html">http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785299004250.html</a>
2	Под. ред. С. В. Кострова	"Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"	М.: Медицина	Научно-теоретический журнал	<a href="http://www.rosmedlib.ru/book/0208-0613-2012-01.html">http://www.rosmedlib.ru/book/0208-0613-2012-01.html</a>
3	Н.Ф. Снегова, Р.Я. Мешкова, М.П. Костинов, О.О. Магаршак	Вакцинопрофилактика в аллергологии и иммунологии	М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011	Учебное пособие	<a href="http://www.studmedlib.ru/ru/book/970409039V0005.html">http://www.studmedlib.ru/ru/book/970409039V0005.html</a>
4	Под. ред. Д.К. Львова.	Вопросы вирусологии	М.: Медицина	Научно-теоретический журнал	<a href="http://www.rosmedlib.ru/book/0507-4088-2011-06.html">http://www.rosmedlib.ru/book/0507-4088-2011-06.html</a>

### Методические разработки ЯГУ, СВФУ

№	Авторы	Наименование	Изд-во, год	Назначение
1	Иноземцева Л.О., Ахременко Я.А.	Микроэкологические аспекты состояния здоровья человека. Дисбактериозы.	Якутск, 2004	Учебное пособие
2	Тарасова Л.А., Ахременко Я.А.	Генетика бактерий	Якутск, 2013	Учебное пособие