

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(Сеченовский Университет)

Институт общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева

Методические материалы по дисциплине:

Микробиология, вирусология, иммунология

основная профессиональная образовательная программа высшего образования -
программа специалитета

КОД Наименование ОП: 31.05.02 Педиатрия

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

Институт общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева



УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ

**(учебно-методическое пособие по общей микробиологии для
организации самостоятельной работы студентов на практических
лабораторных занятиях)**

Авторский коллектив: ***Е.О. Халтурина***
 М.И. Карсонова

Москва - 2022

КУРС: «УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ»

Цель раздела. Знать: свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, их роль в возникновении инфекционного процесса; защитные механизмы микроорганизмов; строение и функции иммунной системы; виды иммунитета; факторы врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунитета; современные методы диагностики инфекционных болезней; принципы и проблемы вакцинопрофилактики и серотерапии инфекционных болезней.

Уметь: поставить диагностические иммунологические реакции и интерпретировать полученные результаты; обосновывать выбор препаратов для иммунопрофилактики и иммунокоррекции инфекционных и неинфекционных болезней.

ЗАНЯТИЕ-

Тема: «ИНФЕКЦИЯ. ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ (семинар)»

Инфекция (infectio /лат./ - загрязнение, заражение) – проникновение в организм болезнетворных микроорганизмов и возникновение сложного комплекса процессов взаимодействия.

Инфекционный процесс – процесс взаимодействия патогенного микроорганизма и восприимчивого макроорганизма в определенных условиях окружающей среды.

Инфекционная болезнь – крайняя степень развития инфекционного процесса.

«Инфекционный процесс» и «инфекционная болезнь» – это не равнозначные понятия. Каждый человек ежедневно сталкивается с миллионами микробов, при этом процесс взаимодействия заканчивается, как правило, победой макроорганизма - и болезнь не возникает. Для возникновения инфекционного процесса и инфекционного заболевания необходимо три компонента (фактора): микроорганизм (возбудитель инфекции), макроорганизм (человек) и окружающая среда. Формы взаимодействия инфекционного агента и организма человека разнообразны и зависят от свойств возбудителя, особенностей реактивности макроорганизма и условий окружающей среды

ВОЗБУДИТЕЛЬ – ИСТОЧНИК - ПЕРЕНОСЧИК

Возбудитель инфекционной болезни – это патогенные микробы, которые способны вызывать заболевание. В зависимости от природы инфекционного

агента болезни разделяют на вирусные, бактериальные, грибковые (микозы), протозойные.

Источник инфекции – это объект, в котором в естественных условиях размножается, накапливается и выделяются во внешнюю среду возбудители и могут заражать здоровых людей.

Инфекционные заболевания делятся по источнику заболевания на:

- 1) **антропонозы** – инфекционные заболевания при которых источником является человек;
- 2) **зоонозы** – инфекционные заболевания при которых источником является животные;
- 3) **сапронозы** – инфекционные заболевания при которых источником заражения являются объекты окружающей среды (воздух, вода, почва).

Переносчик инфекции – это организм, который не вызывает болезни сам по себе, но способен передавать возбудителей инфекционных болезней.

Переносчики относятся к членистоногим (вши, блохи, комары, клещи и др.)

Механизмы и пути передачи инфекционных заболеваний

Механизмы заражения	Пути передачи инфекции	Факторы передачи инфекции	"Входные ворота" инфекции	Группа инфекционных заболеваний
Фекально-оральный	<i>Пищевой (алиментарный)</i>	Контаминированные пищевые продукты	Рот, желудочно-кишечный тракт	Кишечные инфекции
	<i>Водный</i>	Инфицированная вода		
	<i>Контактно-бытовой</i>	Грязные руки, контаминированная посуда, «механические» переносчики (мухи, тараканы)		
Аэрогенный	<i>Воздушно-капельный</i>	Капли слюны из носоглотки при кашле, чихании, разговоре, шепоте и дыхании	Слизистые оболочки дыхательных путей	Респираторные инфекции (инфекции дыхательных путей)
	<i>Воздушно-пылевой</i>	Частицы пыли, несущие на себе микробы		
	<i>Аэрозольный</i>	Пылевой или водный аэрозоль		
Кровяной	Прямой	<i>Трансфузионный</i>	Кровь	Кровяные инфекции
		<i>Трансплацентарный</i>		
		<i>Половой</i>		
	Непрямой	<i>Трансмиссивный</i>		
Контактный	<i>«Манипуляционный»</i>		Кожа, слизистые оболочки мочевыделительной и половой систем, конъюнктивы глаз, волосы, ногти	Сексуально-трансмиссивные инфекции
	<i>Контактный (прямой)</i>	Контаминированные руки (при рукопожатии, дотрагивании и т.п.), поцелуй, укус животного, травма, прохождение плода через инфицированные родовые пути матери		
	<i>Половой (прямой)</i>	Половой контакт		
	<i>Контактно-бытовой (непрямой)</i>	Контаминированные предметы (контакт или ранение), все виды оружия, медицинская аппаратура перевязочный материал		Контактные инфекции

ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ

По происхождению: *экзогенная, эндогенная*

По локализации возбудителя: *очаговая (локальная, местная), генерализованная*

По количеству возбудителя: *моноинфекция, смешанная (mixed-инфекция)*

По длительности взаимодействия микроба с организмом:

-острая (до 3 месяцев);

-подострая (от 3 до 6 месяцев);

-хроническая, микробоносительство, латентная (от 6 месяцев)

По характеру клинических проявлений:

-манифестная форма (полный набор характерных клинических симптомов),

-инаппаратная форма (бессимптомная)

По очагу распространенности:

-спорадическая – невысокий, обычный для данной местности и времени уровень заболеваемости;

-эпидемия – массовое распространение инфекционного заболевания в какой-либо местности, значительно превышающее обычный уровень заболеваемости;

-пандемия – эпидемия, охватывающая значительную часть населения страны, группы стран, континента

ФОРМЫ ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ

Бактериемия – циркуляция бактерий в крови без размножения в ней

Сепсис (септицемия) – генерализованная форма инфекции, при которой возбудитель циркулирует и размножается в крови

Септикопиемия – процесс размножения бактерий в крови с формированием вторичных гнойных очагов во внутренних органах

Антигенемия – наличие антигенов в крови в форме комплексов, представляющих целиком клетку микроба или отдельные антигены микробов

Токсинемия – циркуляция токсинов бактерий в крови

ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Патогенность – потенциальная способность микроба вызывать инфекционный процесс

у определенного макроорганизма при определенных условиях окружающей среды.

Является генотипическим признаком (контролируется хромосомными генами).

Является видовым признаком (присущим виду микроба).

Вирулентность – степень патогенности, индивидуальное свойство конкретного штамма микроба вызывать инфекционный процесс.

Контролируется хромосомными и плазмидными генами.

Изменяется под действием окружающей среды.

Единицы измерения вирулентности бактерий

LD (dosis letalis) – наименьшее количество живого возбудителя или его токсина, вызывающего в определенный срок гибель определенного количества (%) подопытных животных.

LDm (dosis letalis minima) – наименьшее количество живого возбудителя или его токсина, вызывающего в определенный срок гибель 95% подопытных животных.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

Факторы, обуславливающие способность микробов вызывать инфекционный процесс.

Адгезия	-пептидогликан; -пили, основные белки наружной мембраны, ЛПС. -поверхностные белки, липотейхоевые кислоты у Gr⁺ бактерий; -капсула бактерий; -белок Р1 в составе выростов ЦПМ у бактерий рода <i>Mycoplasma</i>; -белки капсида, гликопротеины суперкапсида у вирусов
----------------	--

Инвазия	-инвазины – белки наружной мембраны Грам-бактерий; - некоторые ферменты агрессии
Колонизация	- IgA-протеазы; - антилимфоцитарный фактор бактерий; - продукция бактериоцинов, антиоксидантов, сидерофоров
Антифагоцитарная активность	- капсула, микрокапсула, слизистый чехол; - антигены, входящие в их состав (экранируют поверхностные структуры микробов, защищают от действия лизосомальных ферментов и перекисных радикалов)
Ферменты агрессии	- гиалуронидаза (соединительная ткань); - нейраминидаза (слизистые оболочки); - фибринолизин (сгустки фибрина); - плазмокоагулаза (переводит фибриноген в фибрин); - коллагеназа (коллаген мышечных волокон); - лецитиназа С (лецитин и фосфоглицериды)
Другие факторы патогенности	- жгутики – Н-антиген; - гемолизины и пр.
Токсины бактерий	- эндотоксины; - экзотоксины

ТОКСИНЫ БАКТЕРИЙ

ЭНДОТОКСИНЫ	- липополисахариды, липид А отвечает за токсичность - обнаружены только у Гр- бактерий - - относительно термостабильны; выдерживают нагревание при температуре 60°C в течение часа без потери токсичности - слабые иммуногены; титры специфических антител и их защитная функция ниже, чем для экзотоксинов - не трансформируются в анатоксины, не чувствительны к формалину - умеренно токсичны; смертельные дозы для животных измеряются десятками и сотнями микрограмм - эндотоксины разных групп бактерий не имеют строго специфичных рецепторов, не обладают
--------------------	---

	органотропностью. -CD14 – общий рецептор для ЛПС - все эндотоксины имеют общий эффект: гипертермия, токсикоз, слабость, одышка, диарея, нарушения сердечно-сосудистой системы, снижение давления, гипогликемия, при образовании больших доз эндотоксина в крови – эндотоксический шок - синтез контролируется хромосомными генами
ЭКЗОТОКСИНЫ	- выделяются живой клеткой; в высоких концентрациях обнаруживаются в жидких питательных средах - продуцируются Гр⁺ и Гр⁻ бактериями - полипептиды - относительно термонестабильны; токсичность часто быстро теряется при температуре выше 60°C - обладают высокой антигенностью; стимулируют образование высоких титров антитоксинов (антител) в сыворотках крови; -антитоксины нейтрализуют экзотоксины - трансформируются в анатоксины (токсины, лишенные своих токсических свойств, но сохранившие антигенность) при действии 0,4% р-ра формалина при 38-40°C в течение 4 недель; -анатоксины используют для вакцинации - создания приобретенного искусственного активного антитоксического иммунитета - высокотоксичны; смертельные дозы для животных составляют единицы микрограммов и менее - каждый экзотоксин имеет специфические рецепторы на клетках-мишенях - каждый экзотоксин обладает специфическим эффектом - часто синтез контролируется экстра хромосомными генами (например, плазмидами)

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОТОКСИНОВ

- Токсины, повреждающие клеточные мембраны: энтеротоксины, нейротоксины;
- Токсины, ингибирующие синтез белка: эритрогенин, цитотоксины (гемолизины, лейкоцидины);
- Токсины, активирующие пути метаболизма вторичных мессенджеров (холероген и пр);
- Протеазы;
- Суперантигены

Токсигенность – способность бактерий образовывать белковые токсины.

Токсичность – свойство бактерий образовывать токсические вещества, вызывающие

симптомы интоксикации, в том числе выделять в окружающую среду при разрушении бактерий эндотоксины.

Токсинемиическая инфекция – инфекция, при которой возбудитель находится во входных воротах инфекции, а выделенный им экзотоксин циркулирует в крови, повреждая органы и ткани.

Условия возникновения инфекционного процесса:



Активность и интенсивность этого процесса связаны с эффективностью действия всех условий и зависят от дозы и вирулентности возбудителя, от состояния естественных защитных барьеров макроорганизма и места проникновения возбудителя (входных ворот инфекции).

Любое инфекционное заболевание характеризуется своей динамикой, последовательной сменой разных периодов: инкубационного, продромального, клинического (разгар болезни) и исход заболевания.

Восприимчивый макроорганизм

Способность организма противостоять различным микробам обусловлена двумя механизмами: развитием врожденного и адаптивного (приобретенного) специфического иммунного ответа к отдельным патогенам на основе гуморальных и клеточных факторов, которая сразу направлена против множества инфекционных агентов

ИММУННАЯ СИСТЕМА

Иммунная система человека имеет сложную структурно-функциональную организацию и состоит из центральных органов (тимус и красный костный мозг), где происходят процессы антигеннезависимой дифференцировки лимфоцитов (иммунопоз), периферических органов (селезенка, лимфатические узлы, пейеровы бляшки), где происходит антигензависимая дифференцировка лимфоцитов (иммуногенез) и лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей и слизистыми/серозными оболочками или иммунной системы кожи, слизистых/серозных оболочек, печени (системы SALT – Skin-Associated Lymphoid Tissue; MALT— Mucosal-Associated Lymphoid Tissue; GALT— Gut-Associated Lymphoid Tissue; BALT— Bronchus-Associated Lymphoid Tissue; NALT— Nose-Associated Lymphoid Tissue; VALT— Vulvovaginal-Associated Lymphoid Tissue). Расположение периферических органов иммунной системы и систем SALT, BALT MALT и пр соответствует основным путям проникновения и распространения биологических агентов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие) в организме.

Основными задачами иммунитета являются: распознавание генетического отличия агрессивных чужеродных агентов и измененных собственных макромолекул от нормальных структур организма и устранение их влияния на биологические процессы, протекающие в организме, а также запоминание контакта с конкретными макромолекулами (антигенами), определяющее их ускоренное удаление при повторном попадании в организм. Конечными целями деятельности системы иммунной защиты являются сохранение гомеостаза, структурной и функциональной целостности и генетической индивидуальности

как отдельного организма, так и вида в целом, а также выработка средств профилактики подобных интервенций в будущем.

Иммунная защита от биологической агрессии как внешней, так и внутренней реализуется посредством триады реакций:

- распознавание чужеродных и измененных собственных макромолекул;
- элиминация (удаление) из организма антигенов и несущих их клеток и структур;
- запоминание контакта с конкретными антигенами, для ускоренной их элиминации при повторном поступлении в организм.

Для реализации этих задач на определенных этапах эволюции сформировалась специализированная система - **иммунная система**, которая представляет собой комплекс лимфоидных органов, а также диссеминированных по всему организму клеток, способных выполнять иммунологических функции. Жидкие среды организма (кровь, лимфа, межклеточная жидкость, ликвор и пр) объединяют в единое целое разобщенные компоненты иммунной системы, а также обеспечивают рециркуляцию (перемещение) клеток иммунной системы, способствуя поддержанию ее целостности. В рециркуляции способны принимать участие практически все клетки иммунной системы, а также гемопоэтические стволовые клетки.

В процессе эволюции сформировались специализированные клетки, имеющие мощные системы внутриклеточного киллинга, основной «профессией» которых является **фагоцитоз** (от греч. *phagos* — пожираю, *cytos* — клетка) — поглощение частиц диаметром не менее 0,1 мкм (в отличие от пиноцитоза — поглощения частиц меньшего диаметра и макромолекул) и уничтожение захваченных микробов. Такими свойствами обладают профессиональные фагоциты - полиморфноядерные лейкоциты (в основном нейтрофилы) и мононуклеарные фагоциты - моноциты/макрофаги.

Фагоцитоз складывается из нескольких последовательно протекающих этапов:

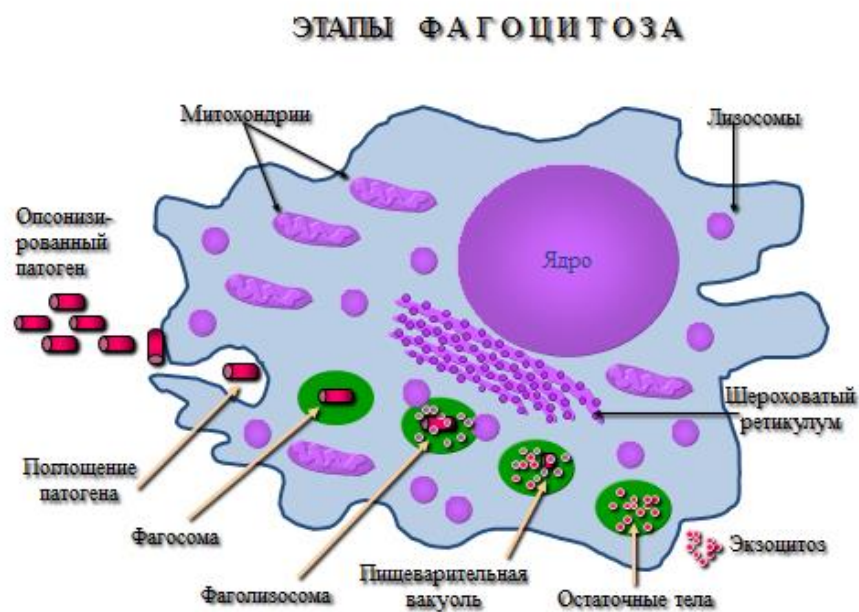
- активация и хемотаксис — целенаправленное движение клетки к объекту фагоцитоза в сторону повышающейся концентрации хемоаттрактантов, роль которых играют хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;

- адгезия (прикрепление) частиц к поверхности фагоцита. В адгезии важную роль играют PRR (патоген-распознающие рецепторы), а также рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина и C3-компоненту комплемента (такой фагоцитоз называется иммунным).

- поглощение частиц, их погружение в цитоплазму и образование вакуоли (фагосомы);

- внутриклеточный киллинг (убийство) и переваривание. После поглощения частицы фагосомы сливаются с лизосомами — образуется фаголизосома, в которой бактерии гибнут под действием бактерицидных продуктов гранул.

Однако не все микроорганизмы чувствительны к бактерицидным системам фагоцитов и их выживание после контакта с фагоцитами называется *незавершенным фагоцитозом*.



Определение факторов вирулентности бактерий:

А. Гемолизины (гемолитическая активность)

Вирулентные штаммы стафилококков, стрептококков и др. образуют зоны α - или β -гемолиза вокруг колоний на кровяном агаре:

- α -гемолиз характеризуется появлением зеленоватых зон вокруг колоний на кровяном агаре, в результате выработки метгемоглобина (например, характерен для *Streptococcus pneumoniae*)

- β -гемолиз характеризуется образованием прозрачных зон вокруг колоний на кровяном агаре (характерен для *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*)

- γ - гемолиз- это отсутствие видимой зоны просветления вокруг колонии при росте на кровяном агаре

Задание:

- ◆ Определить может ли тестируемый микроорганизм продуцировать гемолизины.
- ◆ Сделать вывод о типе гемолиза.
- ◆ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

В. Коагулазная активность

Вирулентные штаммы стафилококков (*Staphylococcus aureus*) обладают способностью коагулировать плазму в результате продукции плазмокоагулазы. Выделенную чистую культуру помещают в пробирку с цитратной плазмой кролика и затем инкубируют при 37° С. Процесс коагуляции плазмы в пробирке занимает около 2 часов, после чего можно определить наличие сгустка плазмы внутри пробирки.

Задание:

- ◆ Определить наличие (отсутствие) сгустка плазмы внутри пробирки.
- ◆ Сделать вывод о коагулазной активности стафилококка.
- ◆ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

С. Лецитиназная активность

На желточно-солевом агаре (ЖСА) большинство вирулентных штаммов стафилококков формируют колонии, окруженные «радужным венчиком» за счет разложения лецитина яичного желтка с помощью фермента лецитиназы

Задание:

- ♦ Оценить лецитиназную активность различных штаммов стафилококка при росте на ЖСА. Обратить внимание на наличие (отсутствие) «радужного венчика», характеризующей лецитиназную активность.
- ♦ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

D. Капсулы

Микроскопическое исследование окрашенных простым методом инкапсулированных бактерий позволяет выявить неокрашенные капсулы, которые содержат красные бактериальные клетки на розовом фоне (при окраске фуксином).

Задание:

- ♦ Изучить демонстрационные препараты
 1. *Streptococcus pneumoniae* в тканях (окрашивание фуксином). Бактерии располагаются попарно, имеют форму кокков, каждая пара которых окружена капсулой (бесцветным ореолом).
 2. *Klebsiella pneumoniae* в тканях (окрашивание фуксином). Бактерии расположены попарно или беспорядочно, представляют собой инкапсулированные палочки среднего размера.
 - ♦ Зарисовать демонстрационные препараты в рабочей тетради
- Фагоцитоз (завершенный фагоцитоз и незавершенный фагоцитоз).**

Задание:

- ♦ Изучить демонстрационные препараты:
 - *Staphylococcus aureus* в гное (окраска по Граму). Стафилококки расположены внутри цитоплазмы лейкоцитов и между лейкоцитами в мазке.
 - *Neisseria gonorrhoeae* в гное (окрашивание метиленовым синим; незавершенный фагоцитоз). Материал (гной) для микроскопического исследования взят из мочеиспускательного канала пациента с гонореей. *Neisseria gonorrhoeae* проявляется в виде бобовидных диплококков, расположенных в цитоплазме лейкоцитов.
- ♦ Зарисовать демонстрационные препараты в рабочей тетради

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

Среди бактерий, способных проникать и существовать внутри клетки хозяина, различают цитозольные и вакуолярные паразиты. Объясните различия между ними. Какие бактериальные системы принимают участие в формировании внутриклеточного бактериального паразитизма

ЗАДАЧА №2

Назовите, в чем заключается особенность строения белковых экзотоксинов. Объясните механизм защитного действия антитоксических сывороток, применяемых при лечении токсикоинфекций.

ЗАДАЧА №3

Для профилактики токсикоинфекций (дифтерия, столбняк) используют препараты анатоксинов. Объясните, что собой представляет анатоксин. Какой иммунитет он создает.

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Факторы патогенности бактерий:

1. Спора
2. Гиалуронидаза
3. Капсула
4. Нейраминидаза

2. Экзотоксины бактерий:

1. Синтезируются грамположительными и грамотрицательными бактериями
2. Выделяются в окружающую среду в процессе жизнедеятельности бактерий
3. Липополисахарид клеточной стенки
4. Обладают специфичностью действия

3. Размножение возбудителя в крови:

1. Бактеремия
2. Сепсис
3. Рецидив
4. Токсинемия

4. Периоды в развитии инфекционного заболевания:

1. Продромальный

2. Реконвалесценция

3. Инкубационный

4. Суперинфекция

5. Патогенность микроба

1. Видовой признак

2. Способность вызывать инфекционное заболевание

3. Индивидуальный, признак штамма

4. Обеспечивает неспецифическую защиту макроорганизма

ЗАНЯТИЕ-

Тема: «АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ. ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ: РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА, РЕАКЦИЯ КУМБСА И ДРУГИЕ); РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

АНТИГЕНЫ

Вещества, несущие признаки чужеродной генетической информации и способные при попадании во внутреннюю среду организма вызывать специфические иммунологические реакции направленные на удаление этих веществ из организма, получили название **АНТИГЕНОВ**.

Существует несколько признаков, которыми должно обладать вещество, чтобы выступать в качестве антигена: **чужеродность, иммуногенность, специфичность.**

ЧУЖЕРОДНОСТЬ заключается в том, что молекулы данного типа должны отсутствовать во внутренней среде организма. В тоже время требование чужеродности не является абсолютным – об этом свидетельствует возможность образования аутоантител, т.е. антител к собственным компонентам организма.

ИММУНОГЕННОСТЬ определяет способность антигена вызывать иммунный ответ. Иммуногенность зависит:

1) от пути и режима введения антигена в организм;

2) от структурно-химической природы антигена;

Антигены – это преимущественно белки и углеводы. Липиды и нуклеиновые кислоты слабоиммуногенны.

3) от молекулярной массы вещества;

С повышением молекулярной массы молекулы увеличивается иммуногенность антигена. Существует пороговый уровень размера молекулы определяющий появление иммуногенности, т.е. вещество может обладать специфичностью, но не вызывать иммунный ответ, если это низкомолекулярное соединение. Такие вещества называются **гаптенами**. Гаптены могут приобретать иммуногенные свойства только после конъюгирования с высокомолекулярными носителями, например, белками. К гаптенам относится широкий круг природных соединений:

пептидные и стероидные гормоны, различные лекарственные препараты, витамины и т.д.

4) **от генотипа реципиента**, т.е. от состава генов, контролирующих силу иммунного ответа.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ иммунного ответа обусловлена наличием в молекуле **антигенных детерминант** или **эпитопов** – небольших участков молекулы иммуногена, которые обладают четкой структурной индивидуальностью и которые комплементарны к активному центру антител или антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов. Для углеводов характерны повторяющиеся однотипные детерминанты. Для белков свойственны разнообразные детерминанты, против каждой из них может быть индуцирована выработка антител. Размер эпитопов небольшой: 5-20 аминокислотных остатков или около 6 моносахаридных остатков. Размер детерминанты (эпитопа) определяется размерами паратопа или активного центра антигенсвязывающих рецепторов. В формировании антигенной детерминанты существенную роль играют 1) линейная последовательность аминокислотных остатков и 2) пространственная структура молекулы.

На поверхности молекулы формируются несколько одинаковых эпитопов – их количество определяет **валентность** антигена.

Перекрестно-реагирующие антигены: если на двух различных молекулах антигенов имеются одинаковые или сходные антигенные детерминанты, то антитела вырабатываемые на один антиген будут реагировать и со вторым антигеном, такие антигены и называются перекрестно-реагирующие.

КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИГЕНОВ

По происхождению различают экзогенные (возникшие вне организма) и эндогенные (возникшие внутри организма) антигены.

По природе: биополимеры белковой и небелковой (полисахариды, липиды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты и др.) природы.

По молекулярной структуре: глобулярные (молекула имеет шаровидную форму) и фибриллярные (форма нити).

По степени иммуногенности: полные и неполные.

По степени чужеродности: ксено-, алло- и изоантигены.

По необходимости вовлечения Т-лимфоцитов в индукцию иммунного ответа, выделяют Т-зависимые и Т-независимые антигены.

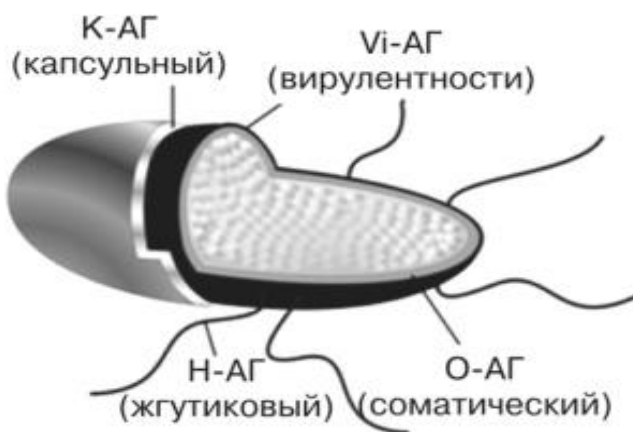
Суперантигены -антигены, которые вызывают поликлональную активацию лимфоцитов, а не клоноспецифическую, как обычные антигены.

Антигены гистосовместимости- это гликопротеиды цитоплазматических мембранах практически всех клеток макроорганизма. Большая часть из них относится к системе главного комплекса гистосовместимости, или МНС (от англ. Main Hystocompatibility Complex). Гены МНС локализованы в нескольких локусах короткого плеча 6 хромосомы и содержат гены 3 классов: I, II, III класса. Антигены гистосовместимости играют ключевую роль в осуществлении специфического распознавания «свой-чужой» и индукции приобретенного иммунного ответа, определяют совместимость органов и тканей при трансплантации в пределах одного вида и другие эффекты.

АНТИГЕНЫ БАКТЕРИИ

В структуре бактериальной клетки различают несколько видов антигенов: соматический О-антиген (LPS = липополисахарид), капсульный К-антиген (полисахаридом или белком) и флагеллярным Н-антиген (белок), Vi-антиген.

Жгутиковые, или Н-антигены, локализуются в их жгутиках и представляют собой эпитопы сократительного белка флагеллина. Соматический, или О-антиген, связан с клеточной стенкой бактерий. Его основу составляют липополисахариды. Капсульные, или К-антигены, встречаются у бактерий, образующих капсулу. Как правило, К-антигены состоят из кислых полисахаридов.



АНТИГЕНЫ ВИРУСОВ

В структуре вирусной частицы различают **ядерные, капсидные и суперкапсидные антигены**. Антигены вирусов различаются по происхождению, часть из них вирусоспецифические, кодируются в нуклеиновой кислоте вируса. Другие, являющиеся компонентами клетки хозяина (углеводы, липиды), формируют суперкапсид вируса при его выходе из клетки путем почкования. Антигены многих вирусов отличаются высокой степенью изменчивости, что связано с постоянными мутациями в генетическом материале вирусов. Примером могут служить вирус гриппа, ВИЧ и др

АНТИТЕЛА

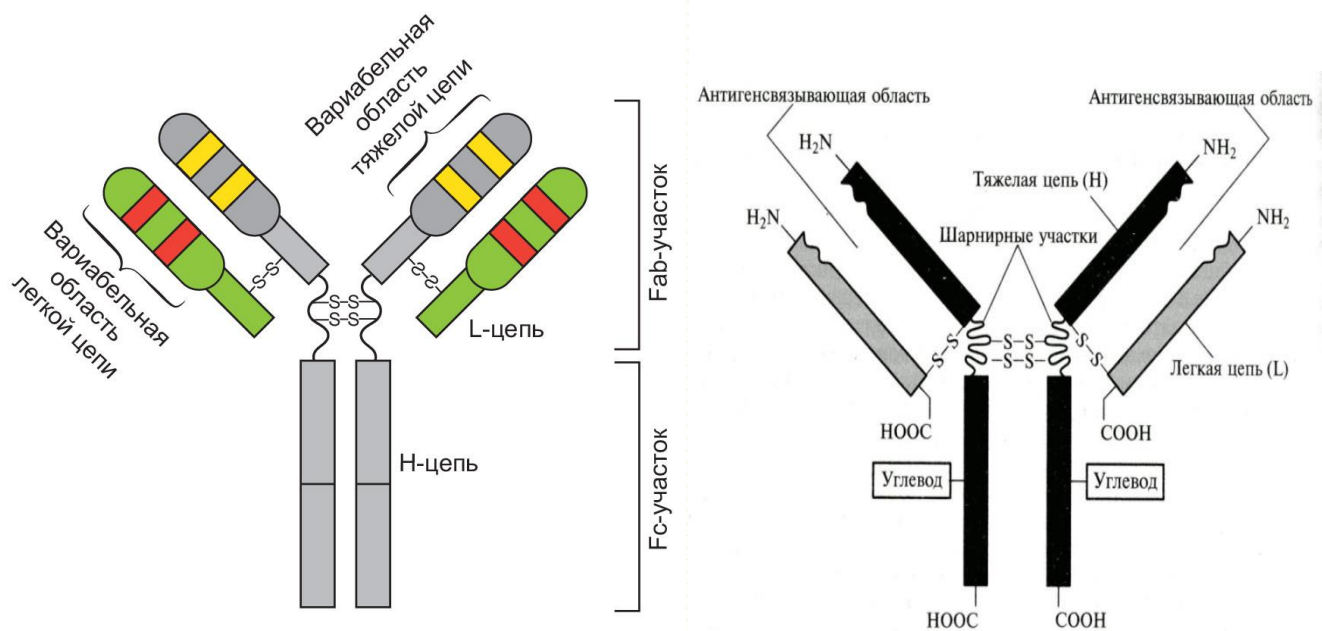
Генетически чужеродные вещества, попадая в организм человека, способны вызывать образование специфических белков крови – **антител (иммуноглобулинов)**.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от проникновения чужеродных веществ путем образования прочных специфических иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма.

В организме антитела вырабатываются В-лимфоцитами, каждый из которых имеет на своей поверхности до 100 000 рецепторов одинаковой специфичности, способных узнавать любой чужеродный антиген. Антиген, встречаясь в кровотоке с комплементарным ему рецептором, проводит отбор (селекцию) соответствующего В-лимфоцита, который затем пролиферирует и дифференцируется в плазматическую клетку, образуя клон клеток. Каждый клон плазматических клеток секретирует гомогенные по своей структуре антитела.

Структура антител. Хотя существуют некоторые структурные вариации среди антител, типичная молекула антитела состоит из четырех белковых цепей, связанных вместе дисульфидными связями в том, что обычно иллюстрируется как Y-образная структура. Две более короткие цепи, называемые легкими (L) цепями, ковалентно связаны с ветвями более длинных (H) цепей. Каждая цепь имеет переменные и постоянные области. Обе цепи H и L делятся на области константные (обозначенные CH и CL) и области переменные (обозначенные VH и VL) Специфичность объединяющих сайтов антитела для антигена

определяется аминокислотной последовательностью в переменных областях как H, так и L цепей.



Аминокислотная последовательность в константной области определяет другие характерные свойства антитела, такие как его способность проникать через тканевые барьеры цепи, активировать систему комплемента или активировать фагоциты

Паратоп- участок антигенсвязывающего центра молекулы антитела, который связывается с эпитопом. Паратоп находится на дистальной части переменной области антитела и сможет связываться с одним эпитопом.

По своим антигенным, эффекторным свойствам и структурным особенностям иммуноглобулины подразделяются на пять основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM.

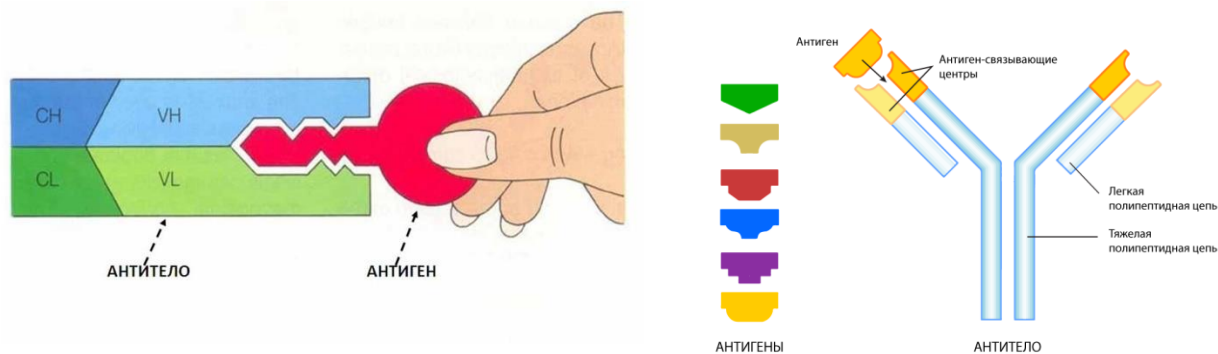
РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА

Иммунодиагностические или серологические (от лат. *Serum*- сыворотка) реакции - это реакции специфического взаимодействия между антителами и антигенами или между антителами и сенсibilизированными лимфоцитами, которые имеют визуальные или детектируемые проявления и могут быть учтены/оценены непосредственно или с использованием специальных приборов (спектрофотометр и пр).

Реакция антиген – антитело высокоспецифическая. В основе реакции антиген–антитело лежит взаимодействие между эпитопом антигена и активным центром антитела (паратопом), основанное на их пространственном соответствии (комплементарности или принцип «ключ - замок»). Образовавшийся комплекс носит название «иммунный комплекс» (ИК). Межмолекулярными силами, удерживающими антигены и антитела в составе иммунных комплексов, являются: электростатические; водородные; гидрофобные; силы Ван-дер-Ваальса.

Эти реакции происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в лабораторных условиях (*in vitro*) для идентификации одного компонента с помощью другого.

Принцип комплементарности или принцип «ключ - замок»



Цели постановки серологических реакций:

- 1) идентифицировать «неизвестный антиген» (бактерии, вирус, токсин и т.д. в образце) с помощью «известного антитела» (диагностическая иммунная сыворотка содержащая антитела), то есть для серологической идентификации (сероидентификация, серотипирование);
- 2) для определения «неизвестного антитела» (в сыворотке крови пациента) с помощью «известного антигена» (диагностикум), то есть для серологической диагностики (серодиагностики) инфекционного заболевания.

Таким образом, неизвестный компонент определяют по известному, то есть один компонент в серологических реакциях всегда должен быть известен.

Общие принципы постановки серологических реакций:

1. Постановка реакций происходит преимущественно *in vitro*
2. Проявляются при высокой специфичности (иммунологическом соответствии или комплементарности) и эквивалентом соотношении антигена и антитела в оптимальных температурных условиях и pH среды.
3. Протекают в две фазы: специфическая и неспецифическая

Специфическая фаза- происходит связывание антитела с антигеном в результате чего образуется иммунный комплекс (АГ+АТ), который стабилизирован нековалентными связями: водородные связи, вандерваальсовы силы, гидрофобные взаимодействия и пр. Эта фаза развивается быстро, но ее визуальная детекция невозможна.

Индикаторная фаза - происходит более медленно и проявляет результат реакции, который либо визуализируется непосредственно (видимый результат), либо считывается при помощи специальных устройств и приборов (спектрофотометр, цитометр и пр)

Серологические реакции характеризуются двумя важными параметрами:

Специфичность - способность антигенов или антител реагировать только с гомологичными (высокоспецифичными, комплементарными) антителами, содержащимися в сыворотке крови, либо с гомологичными антигенами соответственно. Чем выше специфичность, тем меньше ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Чувствительность - определяется минимальным количеством АГ (или АТ) в образце, которое возможно выявить с помощью данной реакции. Чем меньше это количество, тем более чувствительной считается реакция.

Хотя большинство серологических реакций построены на одном и том же теоретическом принципе, методы обнаружения специфических реакций между антителом и антигеном различаются:

1. Реакция агглютинации - склеивание и выпадение в осадок цельноклеточных (корпускулярных) антигенов под действием антител в присутствии электролита
2. Реакция преципитации - осаждение мелкодисперстных (молекулярных) антигенов эквивалентным количеством антител в присутствии электролита

3. Реакция связывания комплемента – активация и связывание комплемента образовавшимся иммунным комплексом АГ+АТ
4. Реакция нейтрализации – взаимодействие между АГ и АТ, приводящее к потере или снижению биологической активности антигена.
5. Реакции с использованием меченых антител и антигенов (реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ и радиоиммунный анализ)

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

В реакции агглютинации используют антигены в виде частиц. Антигены в виде частиц представляют собой относительно клеточные антигены, такие как бактерии, грибы и т.д., или некоторые растворимые антигены, адсорбированные на частицах (латекс, эритроциты, уголь и т.д.). Они могут быть связаны вместе специфическими антителами с образованием видимых агрегатов. Этот процесс называется агглютинацией. Реакции агглютинации очень чувствительны, относительно легко читаются и доступны в большом разнообразии.

Цели постановки РА:

1. Для идентификации видов и сероваров бактерий с помощью диагностических агглютинирующих сывороток (серотипирование)
2. Для обнаружения антител в сыворотке крови больного (серодиагностика)

Компоненты реакции агглютинации:

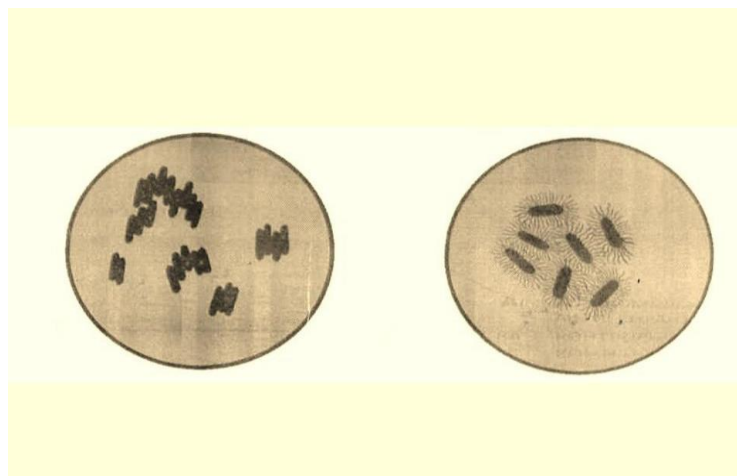
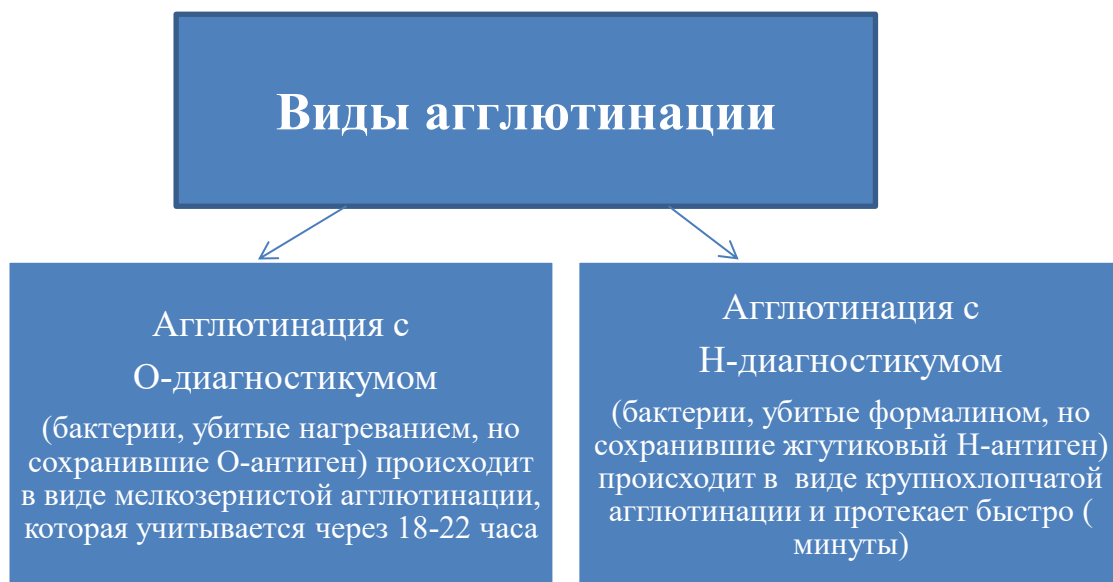
- 1) корпускулярный антиген (агглютиноген);
- 2) антитело (агглютинин);
- 3) электролит (изотонический раствор).

Агглютинирующие сыворотки содержат известные антитела (агглютинины). Они могут быть неадсорбированными (нативными) и адсорбированными.

Неадсорбированные сыворотки (нативные)- содержат групповые антитела к близкородственным видам антигенов.

Адсорбированные сыворотки - содержат антитела к одному (монорецепторная или моновалентная сыворотка) или нескольким (поливалентная сыворотка) антигенам одного вида микроба. Для получения адсорбированных сывороток используют метод адсорбции по Кастеллани.

Титр агглютинирующей сыворотки - это наибольшее разведение сыворотки, при котором еще обнаруживается визуальный результат/эффект реакции агглютинации (осадок, хлопья, агглютинаты).

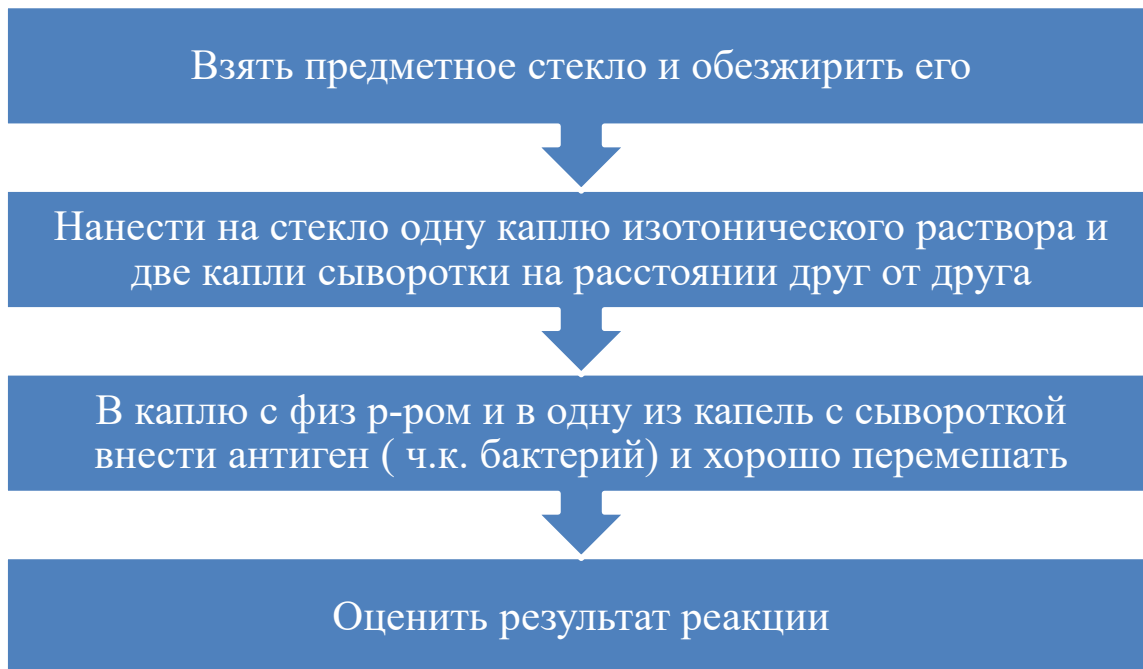


Методы постановки реакции агглютинации:

1. Реакция агглютинации на стекле (ориентировочная)
2. Развернутая реакция агглютинации (в пробирках)

Реакция агглютинации на стекле.

Последовательность действий



Контроль антигена - это капля физ р-ра+ антиген (ч.к. бактерий). Должен быть равномерно мутным

Контроль сыворотки - это капля сыворотки. Должен быть прозрачным.

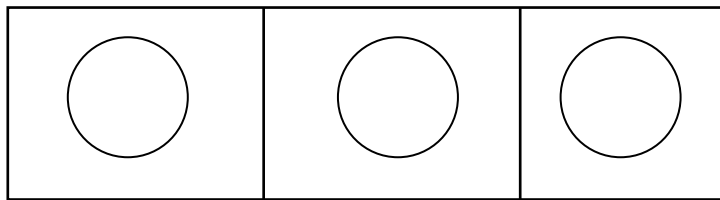
Опыт - капля сыворотки+ антиген (ч.к. бактерий)

Учет результата:

1. возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. Результат считают **положительным**, если в опытной капле (капля сыворотки+ антиген - ч.к. бактерий) появился осадок в виде хлопьев (агглютинат, состоящий из комплексов АТ+АГ).
3. Результат считают **отрицательным**, если в опытной капле имеется равномерное помутнение как и в контроле антигена.

Рисунок . Реакция агглютинации на стекле

1. С адсорбированными сыворотками



Опыт
ч.к. бактерий+
брюшнотифозная сыв.

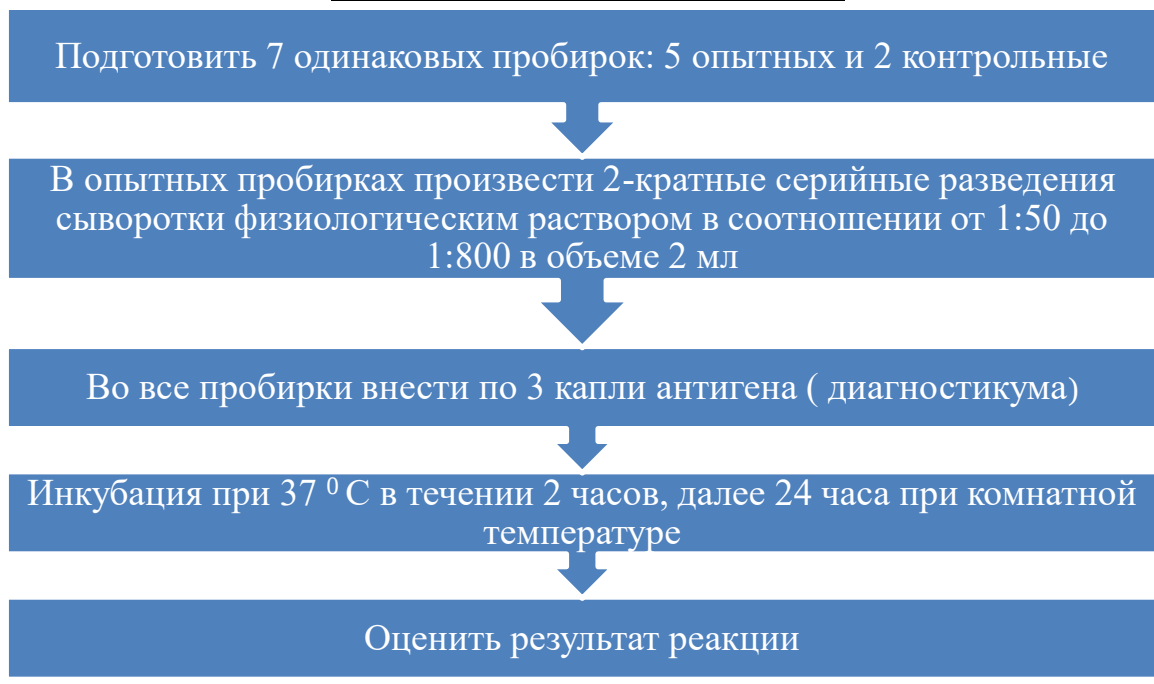
**Контроль
сыворотки**
(капля
сыворотки)

**Контроль
антигена**
(ч.к.+физ.р-р)

ВЫВОД:

Развернутая реакция агглютинации

Последовательность действий



Контроль сыворотки- исходное разведение сыворотки

Контроль антигена- диагностикум или взвесь живых бактерий

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.

Ингредиенты		пробирки						
		1	2	3	4	5	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Изотонический раствор, мл		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	--	1,0
Сыворотка больного в исходном разведении 1:25, мл		1,0	→	→	→	→ вылить	1,0	--
Разведения сыворотки		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:25	--
О-диагностикум (в каплях)		3	3	3	3	3	--	3
Н-диагностикум (в каплях)		3	3	3	3	3	--	3
Термостат при 37°C в течение 2 ч., затем при комнатной температуре 24 ч.								
Результат:	О-агглютинация							
	Н-агглютинация							
ВЫВОДЫ: реакция агглютинации положительная/отрицательная. Титр антител к О-антигену - _____. Титр антител к Н-антигену - _____.								

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА)

Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации - это реакция агглютинации, в которой либо антигены, либо антитела адсорбированы на эритроцитах, которые пассивно склеиваются при образовании иммунного комплекса АГ+АТ с образованием характерного осадка.

В качестве инертных корпускулярных носителей кроме эритроцитов могут использовать: частицы латекса, угля и т.д.

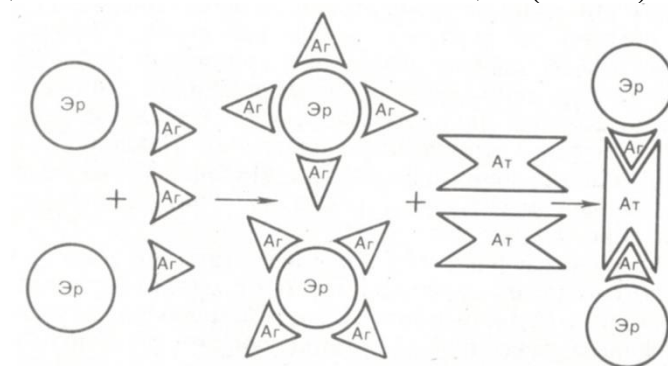
Если на поверхности носителя, например, эритроцита, адсорбированы антитела определенной специфичности, то получают **антительный эритроцитарный диагностикум** (используется для серотипирования)

Если на поверхности носителя, например, эритроцита, адсорбированы антигены, то получают **антигенный эритроцитарный диагностикум** (используется для серодиагностики).

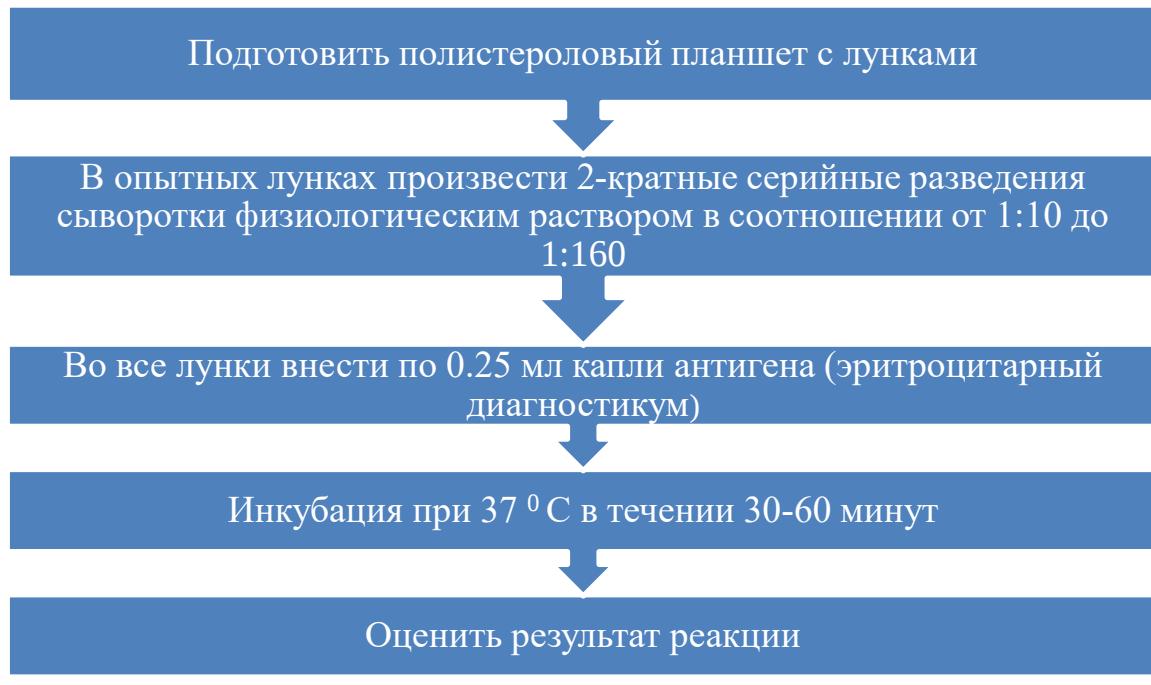
Цели постановки РПГА:

1. Для идентификации возбудителя по его антигенной структуре
2. Для индикации и идентификации бактериальных продуктов-токсинов в исследуемом патологическом материале.

Рисунок . Схема реакции пассивной гемагглютинации (РПГА)



Последовательность действий:



Контроль сыворотки- исходное разведение сыворотки+ физ раствор

Контроль антигена- эритроцитарный диагностикум+ физ раствор

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** - в лунке характерный кружевной осадок эритроцитов, тонкая пленка с фестончатыми краями в виде «зонтика»
3. Результат считают **отрицательным**, если в опытных лунках эритроциты оседают на дно и имеют вид « пуговики» с ровными краями.

Титр РНГА - максимальное разведение сыворотки, дающее положительную реакцию («зонтик»)

Реакция не прямой (пассивной) агглютинации

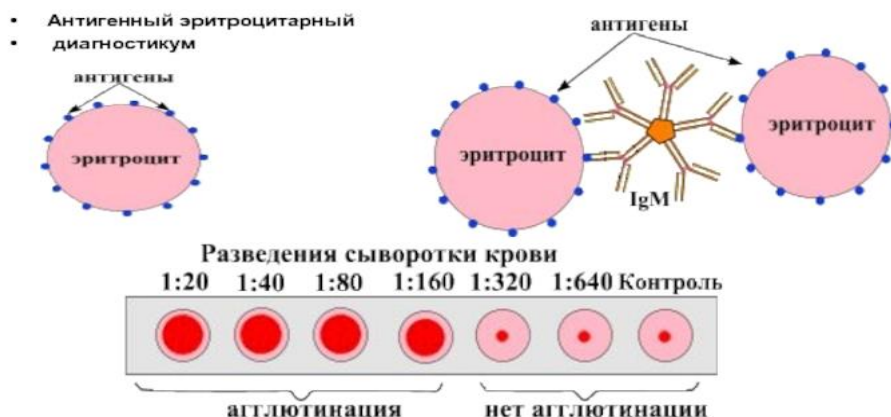


Таблица 16. Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА)

Ингредиенты	пробирки					Контроль антигена	Контроль сыворотки
	1	2	3	4	5		
Изотонический раствор, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сыворотка больного в исходном разведении 1:25, мл	0,25	→	→	→	→ вылить	--	--
Разведения сыворотки	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	--	1:10
Эритроцитарный диагностикум, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	--
<i>При комнатной температуре в течение 30-60 минут</i>							
Результат:							
<u>ВЫВОД:</u> реакция пассивной гемагглютинации положительная до титра _____.							

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

Реакция преципитации (РП)- это реакция осаждения специфических мелкодисперстных (молекулярных) антигенов эквивалентным количеством антител в присутствии электролита.

Цели постановки РП:

Для выявления или идентификации антигена (преципитиногена) по известной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела (преципитины), то есть для серотипирования.

Используется для диагностики ряда инфекций (туляремия, сибирская язва и пр); в санитарно-гигиенических исследованиях для установления фальсификации продуктов; в судебной медицине- для определения видовой принадлежности крови и других биологических жидкостей.

Компоненты реакции преципитации:

- 1) молекулярный антиген (прецитиноген) чаще белково-полисахаридной природы;
- 2) антитело (преципитин);
- 3) электролит (изотонический раствор).

Преципитирующие сыворотки получают путем гипериммунизации кроликов вводя им специфические преципитины-диагностикумы.

Титр преципитирующей сыворотки- это наибольшее разведение антигена, с которым эта сыворотка дает положительную реакцию.

Разновидности реакции преципитации



Реакция кольцепреципитации ставится в узких преципитационных пробирках, куда вносится иммунная сыворотка и на нее медленно наслаивается раствор антигена. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе раздела этих двух растворов образуется кольцо преципитата молочного цвета.

Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипячённые и профильтрованные водные экстракты органов и тканей, то реакция носит название реакции **термопреципитации по Асколи**, применяемая для обнаружения термостабильных антигенов возбудителей сибирской язвы и чумы.



Последовательность действий:

В узкую преципитационную пробирку внести 0.2-0.3 мл преципитирующей сыворотки

Наклонив пробирку почти горизонтально, осторожно по стенке пробирки наслоить антиген (преципитиноген)

Медленно вернуть пробирку в вертикальное положение и наблюдать реакцию

Оценить результат реакции

Положительный контроль:

Контроль сыворотки- преципитирующая сыворотка

Контроль антигена- стандартный антиген

Отрицательный контроль: - с нормальной (неиммунной сывороткой) и исследуемым антигеном.

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – на границе раздела раствора антигена и антитела образуется белое кольцо-преципитат, состоящий из комплексов АГ+АТ.
3. Результат считают **отрицательным**, если растворы в пробирке остаются прозрачными.

Таблица . Реакция кольцепреципитации для определения неизвестного белка

Ингредиенты	Неизвестный белок
Преципитирующая сыворотка против белка человека	
Преципитирующая сыворотка против белка курицы	
<u>ВЫВОД:</u> Неизвестный белок принадлежит _____.	

Таблица . Реакция кольцепреципитации для определения неизвестного гаптена

Ингредиенты	Неизвестный белок
Преципитирующая сыворотка против <i>B.cereus</i>	
Преципитирующая сыворотка против <i>E.coli</i>	
<u>ВЫВОД:</u> Неизвестный гаптен принадлежит _____.	

РЕАКЦИЯ КУМБСА

Реакция Кумбса- реакция для выявления неполных антител при помощи антиглобулиновой сыворотки.

Цель постановки: выявление неполных антител для определения совместимости при гемотрансфузиях, при резус- конфликте, в диагностике ряда аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний (например, выявление неполных антител к возбудителю бруцеллеза)

Неполные (моновалентные) антитела, связываясь с эпитопами антигена, не образуют структуру решетки и реакция между антигенами и антителами не выявляется ни агглютинацией, ни преципитацией, ни другими тестами.

Для обнаружения образовавшегося комплекса антиген-антитело используют дополнительную тест систему (например, антиглобулиновая сыворотка при обнаружении антирезусных антител).

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

В лабораторию от больного брюшным тифом поступила кровь. Необходимо поставить развернутую реакцию агглютинации. Какие ингредиенты будут использованы для её постановки? Какой показатель реакции будет использован в качестве диагностики?

ЗАДАЧА №2

Лаборанту требуется поставить реакцию пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА) с целью определения экзотоксинов возбудителя. В лаборатории имеются следующие ингредиенты: 3% взвесь эритроцитов, гемолитическая система, эритроцитарный антительный диагностикум, бактериальный диагностикум, эритроцитарный антигенный диагностикум, растворимый диагностикум из бактериального гаптена, антиглобулиновая сыворотка, комплемент.

1. Какова цель постановки РПГА
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции
3. Как должен выглядеть положительный результат реакции

ЗАДАЧА №3

В лабораторию поступил материал – образцы шкуры с кожзавода с целью выявления зараженности сырья возбудителем сибирской язвы. Какую серологическую реакцию следует применить для обнаружения термостабильного антигена возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале? Можно ли использовать этот тест для обнаружения возбудителей при других заболеваниях, если да – то при каких

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Реакция агглютинации

1. Определение неизвестных антител по известным антигенам
2. Определение неизвестных антигенов по известным антителам
3. Антиген в растворимом состоянии
4. Антиген в корпускулярном состоянии

2. Иммунодиагностика:

1. Применяется для определения антител к возбудителю в сыворотке больного
2. Применяется для идентификации микробов
3. Применяется для определения патогенности
4. Применяется для определения степени вирулентности

3. Химические вещества, являющиеся полноценными антигенами:

1. Белок
2. Минеральные соли
3. Полисахарид
4. Липид

4. Перечислите компоненты реакции преципитации:

1. Эритроциты
2. Молекулярный антиген
3. Корпускулярный антиген
4. Специфическая иммунная сыворотка

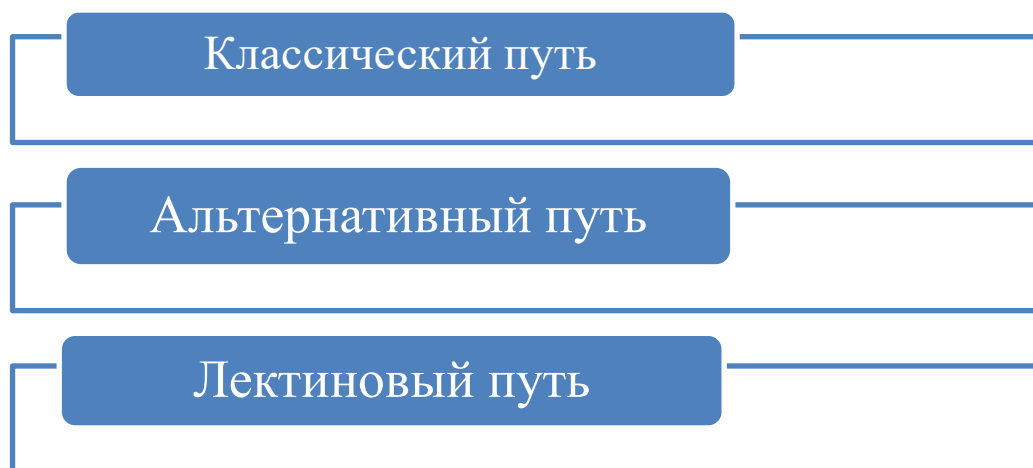
5. Антиген в реакции не прямой (пассивной) гемагглютинации

1. Содержит радиоактивные изотопы
2. Адсорбирован на эритроцитах
3. Содержит флюорохромом
4. Конъюгирован с ферментом

**Тема: «РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА:
РЕАКЦИЯ ИММУНОГО ГЕМОЛИЗА, РСК»**

В систему комплемента входит 9 основных белков (обозначаемых как C1, C2—C9), а также субкомпоненты — продукты расщепления этих белков (C1g, C3в, C3а и т.д.), ингибиторы.

Пути активации системы комплемента



Биологические эффекты продуктов активации комплемента:

- вне зависимости от пути активация комплемента завершается образованием мембраноатакующего комплекса (C5, 6, 7, 8, 9) и лизисом клеток (бактерий, эритроцитов и других клеток);
- образующиеся C3a- и C5a-компоненты являются анафилотоксинами, они связываются с рецепторами кровяных и тканевых базофилов, индуцируют их дегрануляцию — выброс гистамина, серотонина и других вазоактивных медиаторов (медиаторов воспалительного ответа). Кроме этого C3a и C5a является хемоаттрактантами для фагоцитов, он привлекает эти клетки в очаг воспаления;
- C3b, C4b являются опсонинами, повышают адгезию иммунных комплексов с мембранами макрофагов, нейтрофилов, эритроцитов и тем самым усиливают фагоцитоз.

Иммунный лизис - это разрушение клеток, несущих антигены, связанные антителами, в присутствии комплемента.

Из реакций лизиса чаще сего применяются реакция гемолиза и бактериолиза.

РЕАКЦИЯ ГЕМОЛИЗА (РГ)

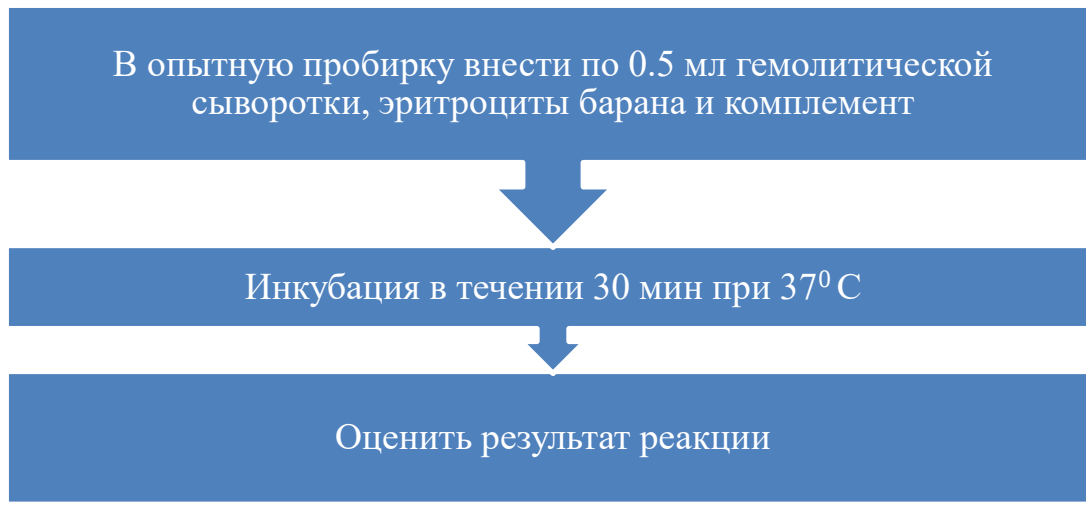
Реакция гемолиза (РГ)- лизис эритроцитов в присутствие специфических антител и комплемента

Цели постановки: Реакция гемолиза имеет прикладное значение. По феномену гемолиза учитывают результаты в реакции титрования комплемента и РСК.

Компоненты реакции иммунного лизиса:

- 1) антиген (корпускулярный)- 3% взвесь эритроцитов барана;
- 2) антитело (гемолитическая сыворотка) - антитела к эритроцитам барана, которые получают путем иммунизации кролика эритроцитами барана;
- 3) комплемент- коммерческий препарат, получают из сыворотки крови морских свинок путем лиофилизации

Последовательность действий:



Контроль 2- эритроциты барана + гемолитическая сыворотка+ физ р-р

Контроль 3- эритроциты собаки + комплемент+ физ р-р

Контроль 4- гемолитическая сыворотка+комплемента+ эритроциты собаки

Контроль 5- эритроциты барана+ физ р-р

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – изменение цвета раствора в пробирке из темно-красного в ярко красную прозрачную жидкость («лаковая кровь») за счет разрушения эритроцитов.
3. Результат считают **отрицательным**, если гемолиза в пробирке нет.

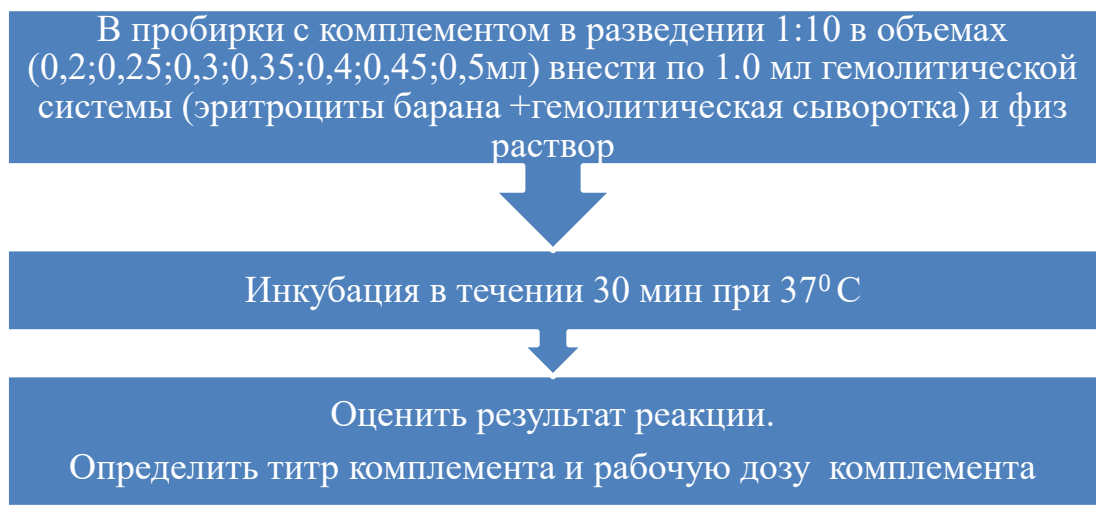
Таблица . Реакция иммунного гемолиза

Ингредиенты	Опыт 1	Контроль 2	Контроль 3	Контроль 4	Контроль 5
Гемолитическая сыворотка кролика, мл	0,5	0,5	--	0,5	--
Эритроциты барана, мл	0,5	0,5	0,5	--	0,5
Комплемент в разведении 1:10, мл	0,5	--	0,5	0,5	--
Эритроциты собаки, мл	--	--	--	0,5	--
Физиологический раствор, мл	--	0,5	0,5	--	1,0
Общий объем, мл	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>					
Результат: (гемолиз/отсутствие гемолиза):					
<u>ВЫВОД:</u> Реакция иммунного гемолиза положительная/отрицательная, т.к. 					

Титрование комплемента сыворотки крови

Для определения титра и рабочей дозы производят титрование комплемента с помощью реакции иммунного гемолиза

Последовательность действий



Титр комплемента - это наибольшее разведение комплемента, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки.

Рабочую дозу комплемента рассчитывают исходя из его титра. Рабочая доза должна быть выше титра комплемента на 25%.

Таблица . Реакция титрования комплемента

Ингредиенты	пробирки							Контроль комплем. 8	Контроль гем. сист 9
	1	2	3	4	5	6	7		
Комплемент в разведении 1:10, мл	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	--
Изотонический раствор, мл	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 30 минут</i>									
Результаты: (гемолиз/отсутствие гемолиза):									
<u>ВЫВОД:</u> титр комплемента _____ мл; рабочая доза комплемента _____ мл.									

РЕАКЦИЯ СВЫЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т.е. происходит связывание комплемента комплексом АГ+АТ. Если же комплекс антиген антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

Образовавшийся в реакции иммунный комплекс является мелкодисперсным и не определяется визуально. Поэтому для выявления связывания комплемента в реакции применяется индикаторная гемолитическая система: эритроциты барана и гемолитическая сыворотка с антителами к ним.

Если антиген не соответствует антителу, то иммунный комплекс не образуется и комплемент остается свободным. Поэтому при добавлении в опытную пробирку гемолитической системы, состоящей из уже готового комплекса АГ+АТ

(эритроциты барана и антитела к ним), происходит активация комплемента с последующим образованием мембраноатакующего комплекса (МАК) и гемолизом эритроцитов барана, что визуально проявляется феноменом «лаковой крови».

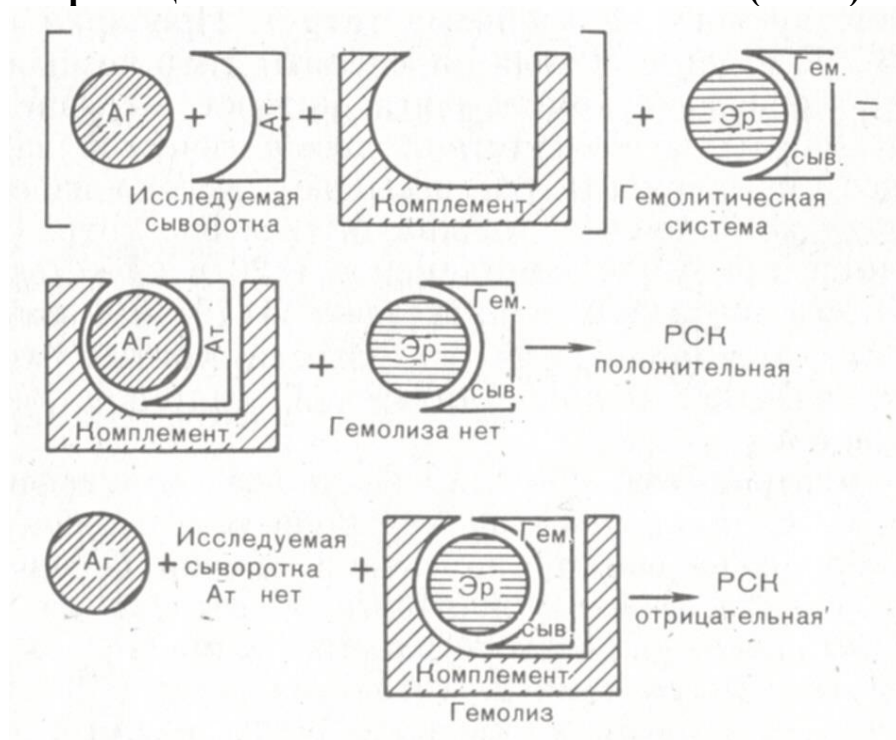
Цели постановки РСК:

1. для экспресс диагностики выявления микробных антигенов (обнаружения бактерий) в материале от больного (например при диагностике гонореи исследуется моча, секрет предстательной железы, гнойные выделения из шейки матки);
2. для выявления антител в сыворотке крови больного

Компоненты РСК с целью определения АТ:

1. исследуемая сыворотка
2. антиген
3. комплемент (сыворотка морской свинки)
4. гемолитическая система состоящая из :
 - а) гемолитической сыворотки (сыворотка кролика, иммунизированного эритроцитами барана)
 - б) эритроциты барана

Рисунок . Схема реакции связывания комплемента (РСК)



РСК проводят в две фазы:

1 фаза - **специфическая**: инкубация смеси антигена, испытуемой сыворотки и комплемента в термостате течении 30 минут.

2 фаза- **индикаторная**: в опытную пробирку и во все контрольные пробирки добавляют одинаковые количества гемолитической системы и учитывают результаты реакции после инкубации в термостате в течении 30 мин.

Последовательность действий



Контроль сыворотки- сыворотка+комплемент+ электролит+ гемолитическая система

Контроль антигена – антиген+комплемент+ электролит+ гемолитическая система

Учет результата:

1 Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.

2. **Положительный результат** –отсутствие гемолиза (жидкость в пробирке полностью бесцветная, а эритроциты оседают на дно).

3. Результат считают **отрицательным** при наличии гемолиза, который проявляется изменением цвета раствора в пробирке из темно-красного в ярко красную прозрачную жидкость («лаковая кровь») за счет разрушения эритроцитов.

Титр РСК- максимальное разведение исследуемой сыворотки, при котором наблюдается положительный результат в виде отсутствия гемолиза.

Таблица . Реакция связывания комплемента с исследуемой сывороткой

Ингредиенты		Опыт 1	Контроль сыворотки 2	Контроль антигена 3
Исследуемая сыворотка в разведении 1:25, мл		0,5	0,5	--
Антиген (диагностикум), мл		0,5	--	0,5
Комплемент в рабочей дозе, мл		0,5	0,5	0,5
Изотонический раствор, мл		--	0,5	0,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Гемолитическая система, мл		1,0	1,0	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Результаты: (гемолиз/отсутствие гемолиза):	Сыворотка больного			
	Сыворотка здорового			
<u>ВЫВОДЫ:</u> РСК положительная/отрицательная с сывороткой здорового, т.к. _____.				
РСК положительная/отрицательная с сывороткой больного, т.к. _____.				

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

Лаборанту требуется поставить реакцию связывания комплементы (РСК) с целью определения АТ к возбудителю. В лаборатории имеются следующие ингредиенты: 3% взвесь эритроцитов, эритроцитарные диагностикумы, бактериальный

диагностикум, растворимый диагностикум из бактериального гаптена, антиглобулиновая сыворотка, комплемент, гемолитическая система.

1. Какова цель постановки РСК
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции
3. Как должен выглядеть положительный результат реакции

ЗАДАЧА №2

Объясните, какой феномен лежит в основе РСК. Какова роль комплемента в защите организма человека?

ЗАДАЧА № 3.

В лабораторию поступила кровь больного с подозрением на гонорею. Для подтверждения диагноза необходимо поставить РСК с целью определения АТ к возбудителю. Какие ингредиенты необходимо подготовить для её постановки? По какому признаку оценивается положительный или отрицательный результат реакции?

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Комплемент:
 1. В норме находится в неактивном состоянии
 2. Компонент клеточной стенки бактерий
 3. Активируется комплексом «антиген-антитело»
 4. Обеспечивает противовирусную защиту
2. Компоненты реакции иммунного гемолиза:
 1. Эритроциты
 2. Комплемент
 3. Гемолитическая сыворотка
 4. Диагностикумы
3. Перечислите компоненты РСК с целью определения антител:
 1. Антигенный диагностикум
 2. Комплемент
 3. Гемолитическая система
 4. Исследуемая сыворотка
4. Пути активации комплемента:
 1. классический

2. интерфероновый
3. лектиновый
4. альтернативный

5. Результатом активации комплемента является:

1. лизис бактериальных клеток
2. агглютинация бактериальных клеток
3. опсонизация бактериальных клеток
4. образование хемоаттрактантов C3a и C5a

ЗАНЯТИЕ

ТЕМА: «РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА С «МЕЧЕННЫМИ» РЕАГЕНТАМИ: РИФ (прямой и непрямой варианты), ИФА»

В современной лабораторной диагностике все большее распространение получают серологические реакции с использованием меченых компонентов: антигенов или антител. В качестве меток могут использоваться различные химические вещества, позволяющие визуализировать результат реакции, а именно образование комплекса антиген- антитело. К таким веществам относятся флюорохромы- вещества, светящиеся в ультрафиолетовом свете; радиоизотопы, ферменты. Сами метки не влияют на способность компонентов реакции образовывать иммунные комплексы.

В зависимости от используемой метки выделяют следующие реакции:

1. Иммуноферментный анализ (ИФА)- в качестве метки используется фермент
2. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)- в качестве метки используется флюорохром
3. Радиоиммунный анализ (РИА)- в качестве метки используется радиоизотоп (радиоактивное вещество).

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА)- предназначен для выявления антигенов или антител с помощью соответствующих им антител/антигенов, конъюгированных с меткой - ферментом (пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и пр). Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Различают несколько десятков модификаций ИФА:

1. ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) - метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами;
2. EIA (enzyme immunoassay) - метод на основе фермент-иммуноопределения;
3. EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) - способ, основанный на связи с ферментами.

ELISA и EIA - это методы гетерогенного или твердофазного анализа (ТИФА), EMIT является гомогенным ИФА. Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.

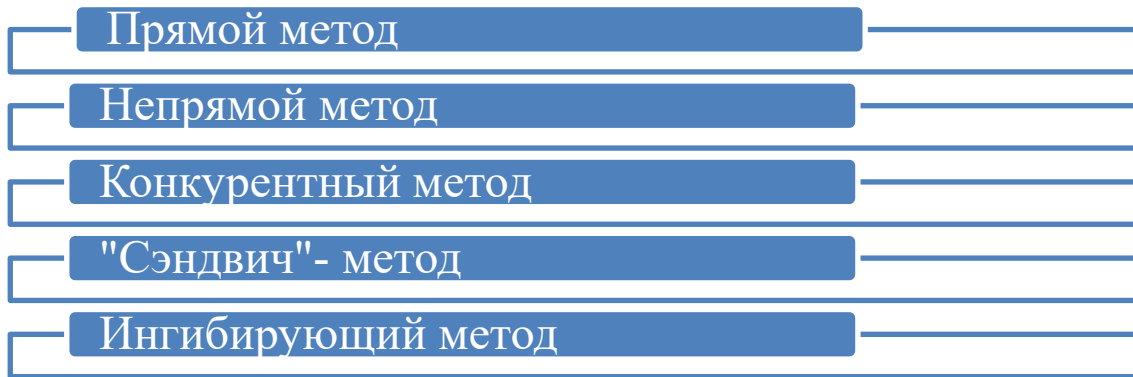
Цели постановки ИФА:

1. Обнаружение специфических антител в биологических материалах (сыворотка крови, слюна и пр)
2. Обнаружение искоемых антигенов в биоматериале

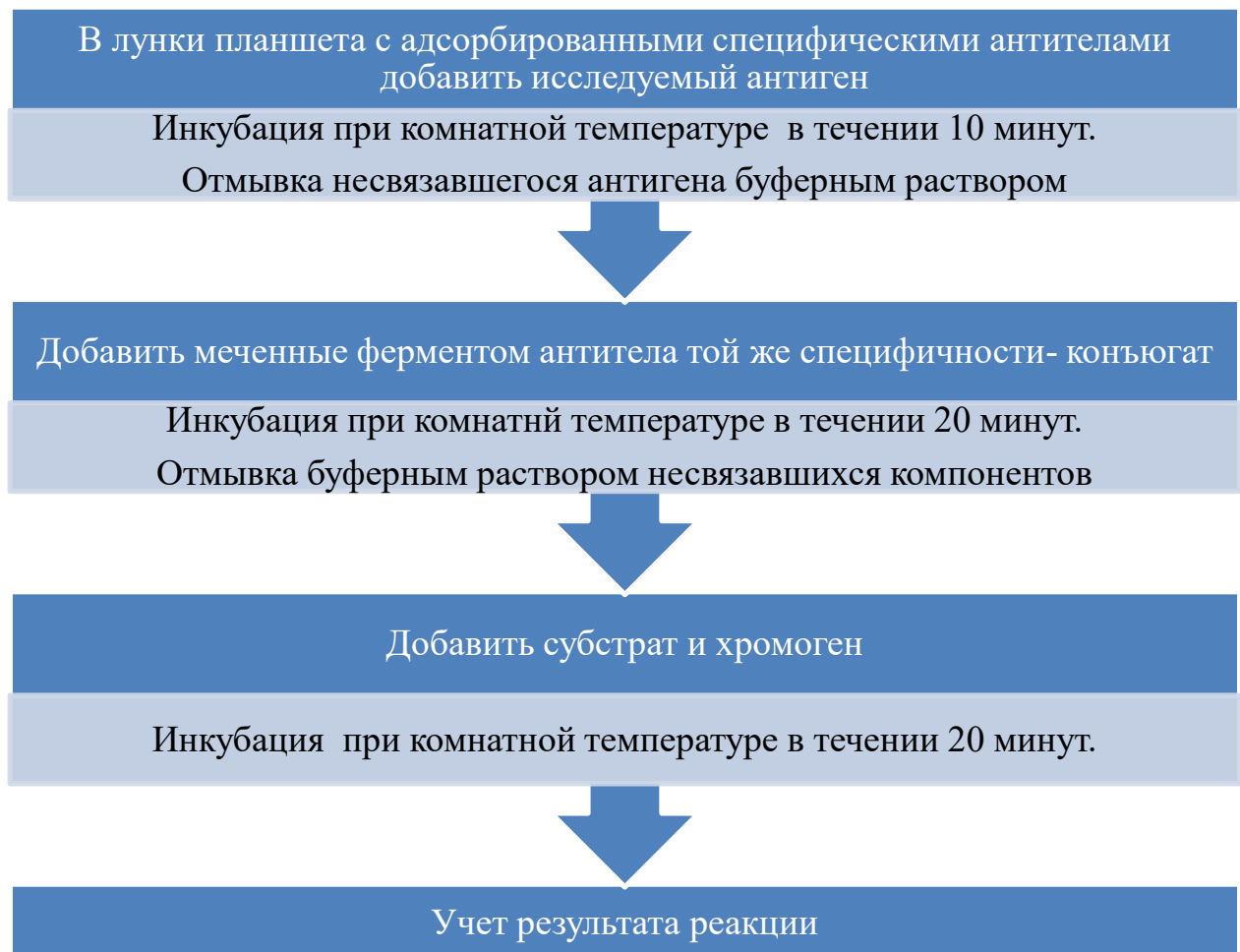
Компоненты ИФА с целью определения антигена:

1. Антитело
2. Антиген
3. Конъюгат – антитело, меченное ферментом
4. Субстрат – вещество, на которое специфически направлено действие фермента. В результате взаимодействия фермента с субстратом возникает продукт реакции.
5. Хромоген – это вещество, обычно бесцветное (лейкоформа), но способное давать окрашенное соединение (хромоформу) в результате взаимодействия с продуктом, возникающим при ферментативной реакции.

Виды твердофазного ИФА



Последовательность действий при прямом методе ИФА («сэндвич» - метод)



Положительные контрольный образец

Отрицательный контрольный образец

Контроль конъюгата

Контроль субстрат-хромогенного реактива

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – появление окраски или изменение оптической плотности в лунке (субстрат расщепляется ферментом, продукты реакции окисляют хромоген и появляется окраска или изменяется оптическая плотность среды в лунке))
3. Результат считают **отрицательным** если цвет раствора в лунках планшета не изменяется.

Данный метод называется «сэндвич»- метод, так как при постановке реакции антиген оказывается между иммобилизованными и мечеными антителами.

Рисунок . Схема проведения иммуноферментного анализа (ИФА, «метод сэндвича»)



Таблица . Схема постановки ИФА

Ингредиенты	Опыт	«Положительный контроль»						«Отриц. контроль»
	A ₁ A ₂	B ₁ B ₂	C ₁ C ₂	D ₁ D ₂	E ₁ E ₂	F ₁ F ₂	G ₁ G ₂	H ₁ H ₂
1. Буфер А (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 10 мин.</i>								
2. Сыворотка больного (мл)	0,1	--	--	--	--	--	--	--
3. Стандартный антиген 100 мкг/мл (мл)	--	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 вылить	--
4. Отрицательный контроль (мл)	--	--	--	--	--	--	--	0,1
<i>Инкубация при 37°С в течение 20 мин.</i>								
5. Конъюгат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при 37°С в течение 20 мин.</i>								
6. Субстрат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 20 мин.</i>								
7. 50%Н ₂ SO ₄ (мл)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Результаты:								
<u>ВЫВОДЫ:</u> ИФА _____ (положительная/отрицательная). Концентрация HBs антигена _____ мкг/мл								

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)- это реакция обнаружения специфических антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток). Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

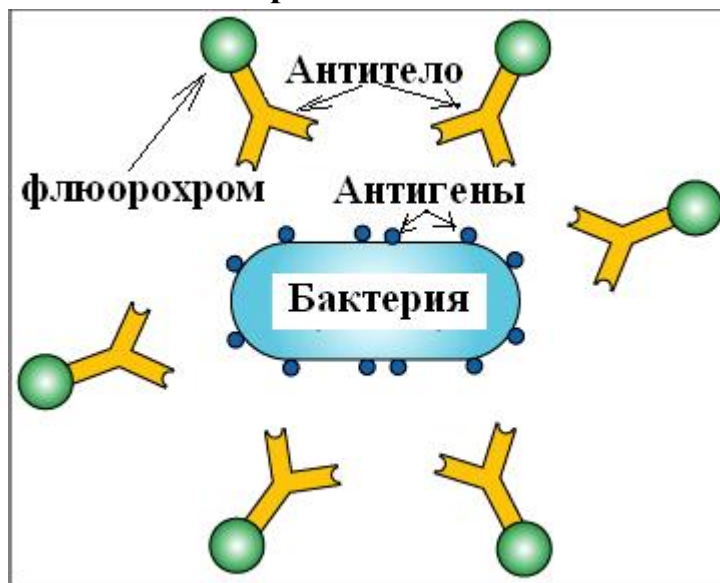
Цели постановки:

Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения АТ и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток.

Выделяют два метода РИФ по Кунсу: прямой и непрямой.

При прямом методе РИФ специфические флюоресцирующие антитела образуют комплексы с микробными антигенами, которые светятся ярко-зеленым светом по периферии при люминесцентной микроскопии.

Схема прямого метода РИФ

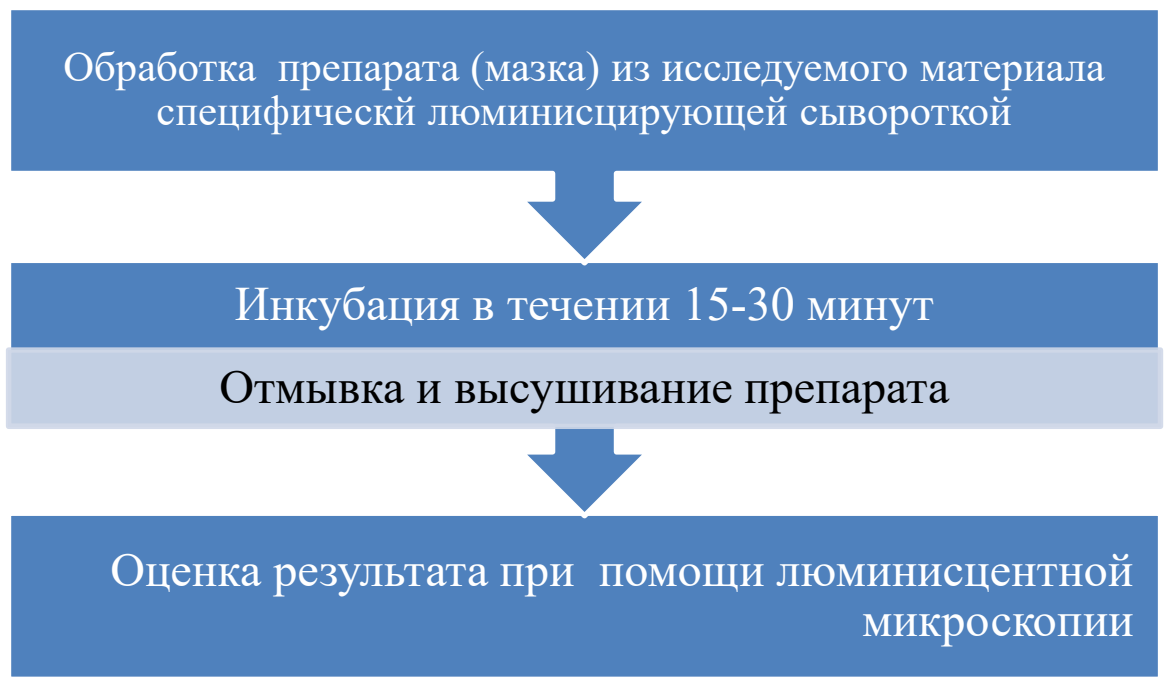


Компоненты прямой РИФ:

1) исследуемый материал (испражнение, отделяемое носоглотки и др.);

- 2) меченая флюорохромом специфическая иммунная сыворотка, содержащая АТ к искомому антигену;
- 3) изотонический раствор хлорида натрия.

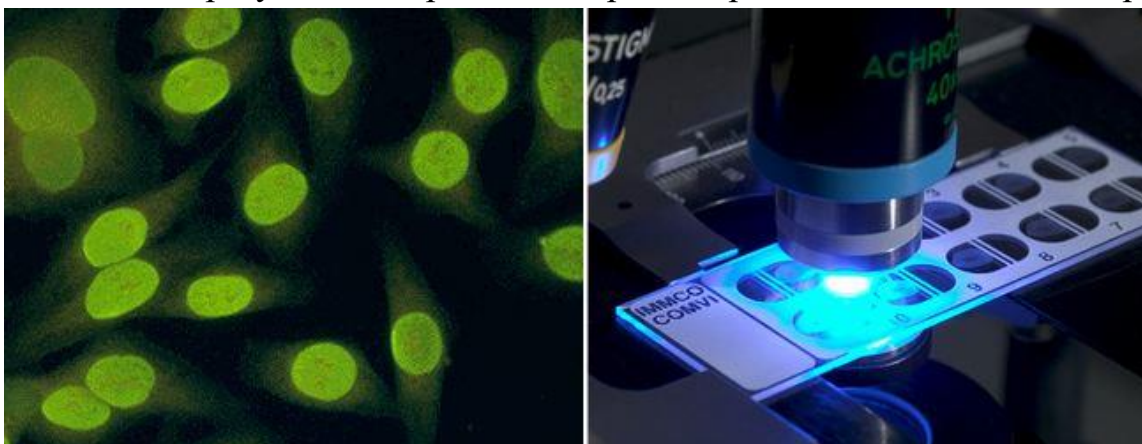
Последовательность действий:



Учет результатов реакции:

Положительный результат- обнаружение флюоресценции в виде ярко-зеленого свечения при люминисцентной микроскопии в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ.

Отрицательный результат- черное поле зрения при люминисцентной микроскопии.



Непрямой метод РИФ состоит из двух этапов:

- на первом этапе препарат из исследуемого материала обрабатывают нелюминесцирующей иммунной сывороткой к искомому антигену
- на втором этапе препарат обрабатывают люминесцирующей антиглобулиновой сывороткой, содержащей флюоресцирующие антиглобулиновые антитела.

Схема непрямого метода РИФ



Компоненты непрямого РИФ:

- 1) исследуемый материал;
- 2) специфическая иммунная сыворотка без флюорохрома;
- 3) антиглобулиновая сыворотка (АТ против иммуноглобулина), меченная флюорохромом;
- 4) изотонический раствор хлорида натрия.

Последовательность действий:

Обработка препарата (мазка) из исследуемого материала специфической иммунной сывороткой без флюорохрома с последующим образованием невидимого комплекса АГ-АТ



Инкубация в течении 15-30 минут.
Отмывка буфером несвязавшихся антител.



Обработка препарата люминесцирующей антиглобулиновой сывороткой.



Инкубация в течении 15-30 минут. Отмывка буфером и высушивание

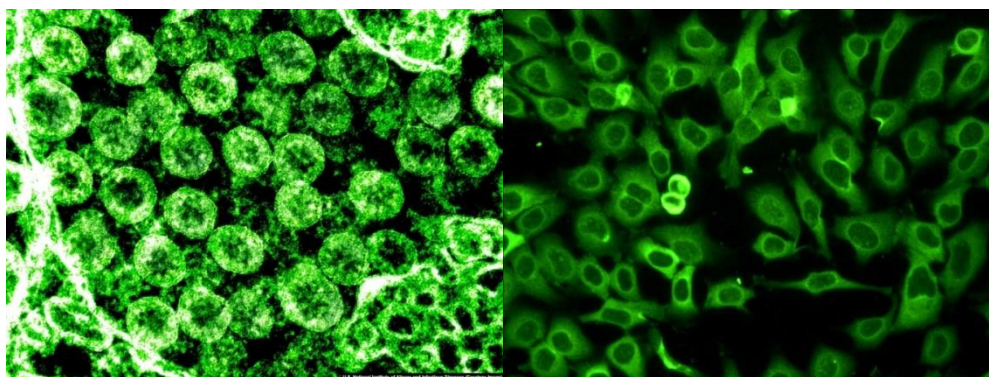


Оценка результата при помощи люминисцентной микроскопии

Учет результатов реакции:

Положительный результат- обнаружение флюоресценции в виде ярко-зеленого свечения при люминесцентной микроскопии в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ.

Отрицательный результат- черное поле зрения при люминесцентной микроскопии.



Примеры:

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

При постановки ИФА используют конъюгат. Объясните значение этого компонента. Предложите состав этого компонента для реакции ИФА, которая ставится с целью определить антитела в сыворотке больного.

ЗАДАЧА №2.

Лаборанту требуется поставить реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РИФ). В лаборатории имеются следующие ингредиенты: исследуемый материал; специфическая иммунная сыворотка без флюорохрома; конъюгат антиглобулиновой сыворотки с ферментом, антиглобулиновая сыворотка, меченная флюорохромом, флюорохром, комплемент.

1. Какова цель постановки непрямой реакции иммунофлюоресценции
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции

ЗАДАЧА №3

В диагностических целях при ряде инфекций проводится постановка ИФА

1. Каковы цели постановки этой реакции
2. Объясните механизм этой реакции и перечислите необходимые компоненты для ее постановки
3. Каким образом производится учет результатов реакции

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. РИФ используется для:

1. Микробиологической экспресс-диагностики
2. Определения специфических антител
3. Идентификации микробов
4. Титрования комплемента

2. Иммуноферментный анализ (ИФА) применяется для:

1. Определение неизвестных антител по известному антигену
2. Определение количества эритроцитов
3. Определение неизвестного антигена по известным антителам

4. Определение титра комплемента

3. Антитела в РИФ метят

1. Радиоактивным изотопом
2. Супероксидным анионом
3. Флюорохромом
4. Ферментом

4. Достоинства РИФ:

1. Высокая чувствительность
2. Возможность использования для экспресс-диагностики
3. Быстрота получения результатов
4. Специфичность

5. В каких реакциях используют меченные АТ:

1. ИФА
2. РИФ
3. РСК
4. РИА

ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Занятие № 8

- ***Цель:*** Знать таксономическое положение и биологические свойства возбудителей внутрибольничных инфекций;
- ***Уметь*** подобрать материал и методы исследования;
- ***Владеть*** оценкой результатов микробиологических исследований.

Клиническая микробиология

- - изучает взаимоотношения между организмом и микробами в норме, при патологии, в динамике воспалительного процесса с учетом проводимого лечения.
- - исследует условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), вызывающие оппортунистические инфекции.

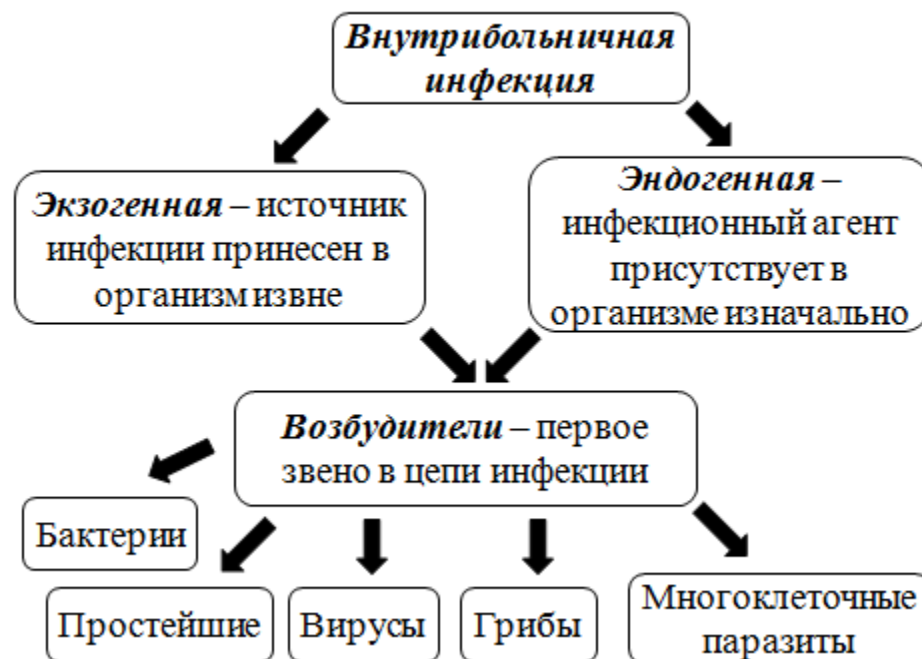
Задачи клинической микробиологии:

- 1.Изучение **роли УПМ** в **этиологии и патогенезе** гнойно-воспалительных заболеваний человека.
- 2.Разработка **методов микробиологической диагностики, специфической терапии и профилактики** заболеваний, вызванных УПМ.
- 3.Исследование **лекарственной устойчивости УПМ** и ее преодоление.
- 4.**Микробиологический контроль** за антимикробными мероприятиями в больничных стационарах.

Внутрибольничная (госпитальная) инфекция:

- - это инфекция, заражение которой происходит в больничных учреждениях;
- - наслаиваясь на основное заболевание, она утяжеляет клиническое течение, затрудняет диагностику и лечение, ухудшает исход заболевания;
- - часто связана с медицинскими вмешательствами.

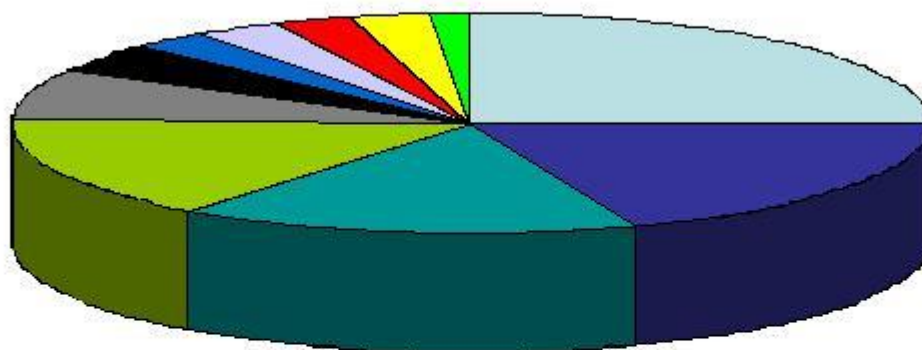
- **Для возникновения ВБИ необходимо наличие следующих звеньев инфекционного процесса:**
- **источник инфекции (пациент, медработник);**
- **возбудитель (микроорганизм);**
- **факторы передачи;**
- **восприимчивый организм.**



Госпитальный штамм

- — это микроорганизм, изменившийся в результате циркуляции в отделении по своим генетическим свойствам, в результате мутаций или переноса генов и имеющий несвойственные «дикому» штамму характерные черты, позволяющие ему выживать в условиях стационара.
- Основные черты приспособления — это устойчивость к одному или нескольким антибиотикам широкого спектра действия, устойчивость в условиях внешней среды, снижение чувствительности к антисептикам. Госпитальные штаммы очень разнообразны, в каждой больнице или отделении возможно появление своего характерного штамма со свойственным только ему набором биологических свойств.

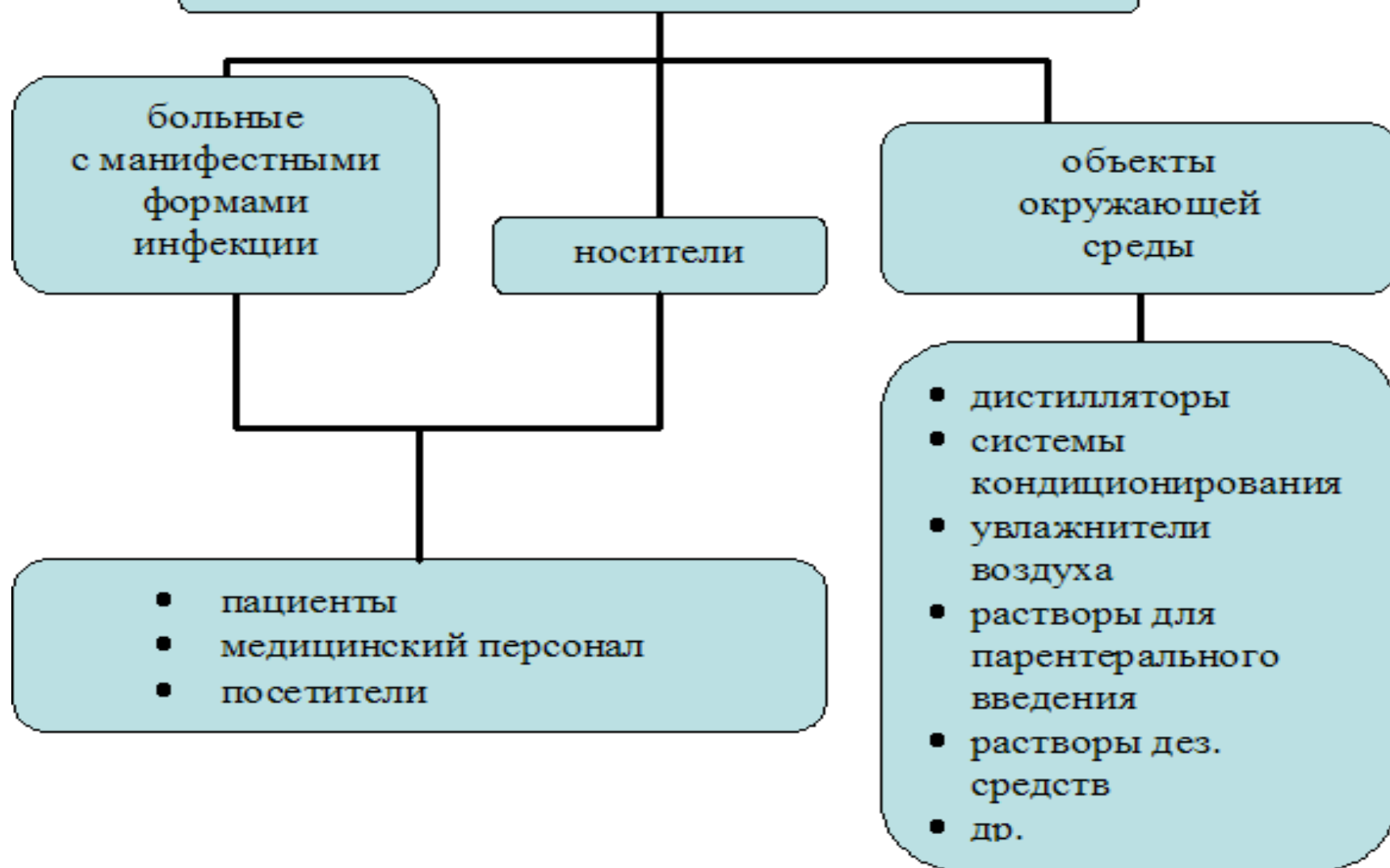
Спектр возбудителей госпитальных инфекций



 P.aeruginosa	 E.coli
 Proteus spp.	 S.aureus
 Staphylococcus spp.	 E.faecium
 K.pneumoniae	 C.fruendi
 A.lwoffii	 E.aerogenus
 K.oxitoca	

- В этиологии внутрибольничных инфекций велика роль **вирусов**:
- простого герпеса, аденовирусов, вируса гриппа, энтеровирусов и др.
- Также внутрибольничные инфекции могут быть вызваны условно-патогенными и патогенными **грибами** (дрожжеподобными, плесневыми, лучистыми).

Категории источников ВБИ



Классификация внутрибольничных инфекций

- По длительности течения ВБИ делятся на острые, подострые и хронические.
- По тяжести клинических проявлений: легкие, среднетяжелые и тяжелые формы.
- В зависимости от степени распространенности инфекционного процесса различают: генерализованные и локализованные формы внутрибольничной инфекции.

Среди локализованных форм выделяют:

- 1. Инфекции кожи, слизистых и подкожной клетчатки, в т. ч. послеоперационных, ожоговых, травматических ран.
- 2. Инфекции полости рта и ЛОР-органов.
- 3. Инфекции пищеварительной системы.
- 4. Инфекции урогенитального тракта.
- 5. Инфекции костно-суставной системы.
- и другие

ЯТРОГЕННЫЕ ИНФЕКЦИИ

- Являются разновидностью госпитальной инфекции, вызванной непосредственно при диагностических манипуляциях.
- Чаще всего заражение происходит при использовании не стерильного инструментария.

Оппортунистические инфекции

- - вызываются УПМ: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, грибы рода *Candida*.
- Одни из них могут обитать в пищевых продуктах, воде, почве.
- Другие – входят в состав нормальной микрофлоры организма человека и животных.

У П М

- Условно-патогенные микробы, обладая низкой степенью патогенности для человека, проявляют свои патогенные свойства только при определенных условиях, например при снижении иммунного статуса организма.

У П М

- УПМ повреждают клетки и ткани организма хозяина эндотоксинами и ферментами агрессии (продуцируют гиалуронидазу, эластазу, коагулазу, фибринолизин, нейраминидазу, лецитиназу, нуклеазы).
- токсическим действием обладают продукты ферментативного распада -мочевина, сероводород.

У П М

- - характеризуются устойчивостью к антибиотикам, антисептикам, физическим факторам, бактериофагам.
- - обладают гетерогенностью антигенной структуры, которая создает сложности в
- идентификации выделенных культур.

Эпидемиология оппортунистических инфекций

- Источник инфекции - больной человек или носитель, животные, объекты внешней среды.
- Наибольшую опасность в эпидемиологическом плане представляет медперсонал больничных учреждений, который может быть носителем госпитальных штаммов УПМ, например стафилококков.
- Пути передачи – аэрогенный, контактный, трансмиссивный, алиментарный.

Оппортунистические инфекции:

- - развиваются на фоне снижения иммунного статуса организма: у онкологических больных, больных хроническими заболеваниями, лиц преклонного возраста, недоношенных младенцев, больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, при сахарном диабете.
- - протекают в форме гнойно-воспалительных процессов различной локализации и степени
- тяжести.

- Так как УПМ являются преобладающими представителями нормальной микрофлоры организма человека, то подавляющее большинство оппортунистических инфекций носит **эндогенный характер**.
- УПМ приобретают способность преодолевать тканевые барьеры, в норме для них непреодолимые, и транслоцироваться во внутреннюю среду организма. Попадание УПМ во внутреннюю среду организма влечет колонизацию ими различных органов и систем организма, что клинически проявляется в виде гнойно-септического процесса различной локализации и степени тяжести.

Особенности оппортунистических инфекций:

- 1. Возбудители не имеют органного тропизма: один и тот же микроорганизм может вызвать различные заболевания.
- 2. Полиэтиологичность - заболевание
- может быть вызвано любым УПМ.
- 3. Клиническая картина определяется пораженным органом.

Особенности оппортунистических инфекций:

- 4. Часто протекают как смешанные инфекции.
- 5. Болезнь протекает медленно, имеет хроническое течение, развивается вторичный иммунодефицит.
- 6. Имеют тенденцию к генерализации процесса, развитию септикопиемии.
- 7. Трудности лечения обусловлены множественной антибиотикорезистентностью.

Микробиологическая диагностика

- 1. *Микроскопический метод* позволяет выявлять в мазках патологического материала бактерии только в случае их массивного содержания (10^5 КОЕ/мл и более).
- 2. *Бактериологический метод* – основной.

Бактериологический метод

- Материал для исследования:
 1. Материал берут из очага инфекции. Вид материала определяется клинической картиной заболевания.
 2. Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования.
 3. Материал берут в начальном периоде болезни до начала антибактериальной терапии.

Этапы бактериологического исследования:

- 1. Готовят разведения патологического материала в растворе хлорида натрия и делают высев 0,1 мл материала из разведений на чашки Петри с питательной средой-газоном (на 3 чашки из каждого разведения).

В стандартный набор питательных сред включают: желточно-солевой агар (для стафилококков), среду Эндо (для энтеробактерий), кровяной агар (для стрептококков), среду Сабуро (для грибов), среду Китта-Тароцци (для анаэробов).

Этапы бактериологического исследования:

- 2. Описывают характер роста на питательных средах. Изучают морфологические, тинкториальные, культуральные признаки.
- Подсчитывают количество колоний каждого типа на чашках с посевом. Для расчета обсемененности материала используют формулу: (А) $KOE = N \times ПД \times СР$, где N —
- число колоний, ПД — посевная доза, СР — степень разведения.

Этапы бактериологического исследования:

- 3. Выделяют чистые культуры и проводят идентификацию по биохимическим и антигенным признакам.
- Определяют факторы патогенности и эпидемиологические маркеры (фаговары)
- Определяют антибиотикограмму.

Лечение

- Комплексное лечение включает адекватное хирургическое вмешательство, рациональную антимикробную терапию, иммунотерапию.
- Учитывая широкое распространение среди УПМ множественной лекарственной устойчивости к антибиотикам, назначать эти
- препараты больным необходимо с учетом результатов определения антибиотикограммы.

Профилактика

- Профилактика оппортунистических инфекций проводится в трех направлениях:
- 1. выявление источника инфекции;
- 2. разрыв механизмов, путей и факторов передачи, соблюдение санитарно-гигиенического режима, правил асептики, антисептики, дезинфекции и стерилизации;
- 3. воздействие на восприимчивый коллектив.

Профилактика

- Так как распространение госпитальных штаммов часто связано с носителями из числа медперсонала, необходимо выявлять и санировать этих носителей.

Синегнойная инфекция

- Семейство: **Pseudomonaceae**
- Род: **Pseudomonas**
- Вид: **Ps.aeruginosa**
- Описан А. Люкке в 1862г.
- Выделен в чистой культуре С. Жессаром в 1882г.

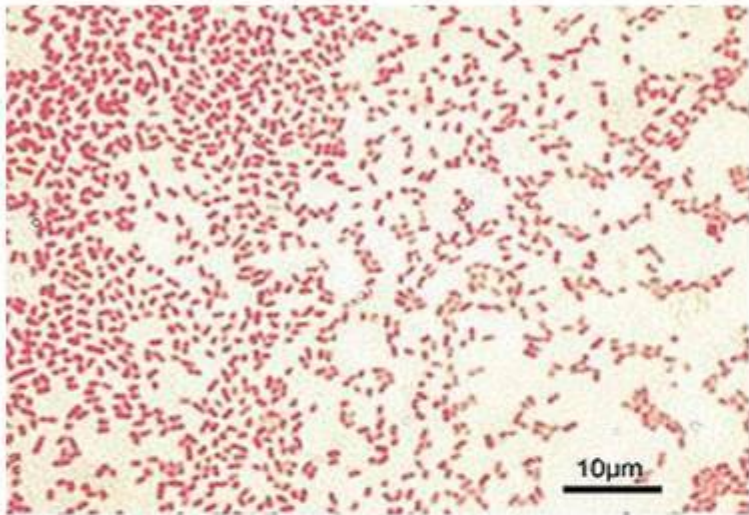


CENTER FOR DISEASE CONTROL

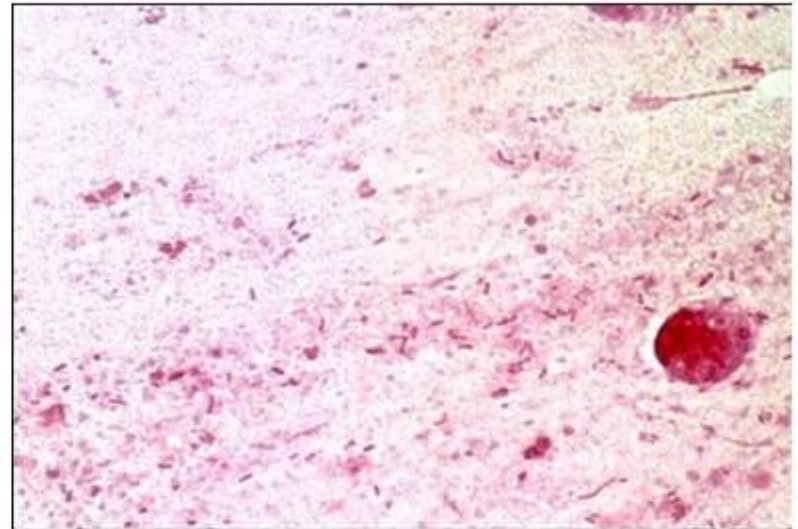
Ps.aeruginosa

- Грам «-» палочки, расположены попарно или короткими цепочками.
- Подвижны. Спор не образуют.
- Имеют пили IV типа.
- Образуют полисахаридную капсулу.

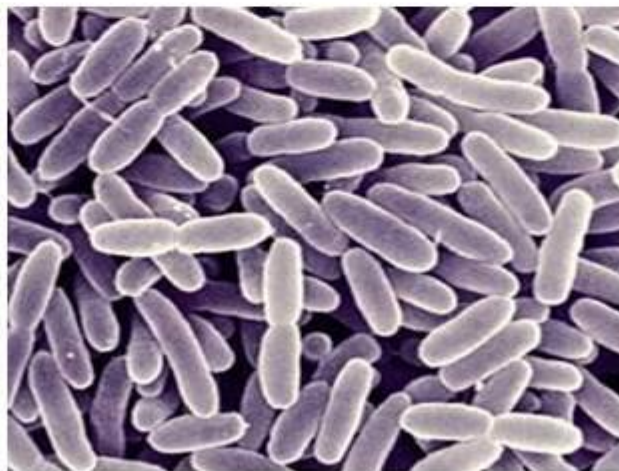
Синегнойная палочка



Pseudomonas aeruginosa, чистая культура, окраска по Граму.



Pseudomonas aeruginosa в гное, окраска по Граму.

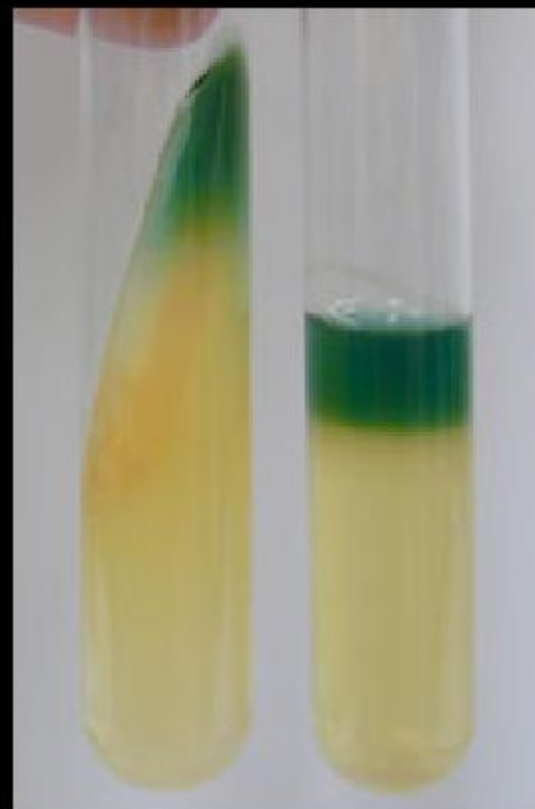


Pseudomonas aeruginosa, электронная фотография.

Ps.aeruginosa

- Облигатные аэробы.
- Хорошо размножаются на простых питательных средах, образуя гладкие слизистые колонии сине-зеленого цвета, с окрашиванием среды (пигмент пиоцианин)
- и запахом жасмина.
- На жидкой питательной среде образуют серебристого цвета пленку.
- Температура роста от 37 до 42 С.

Пигмент *Pseudomonas aeruginosa*



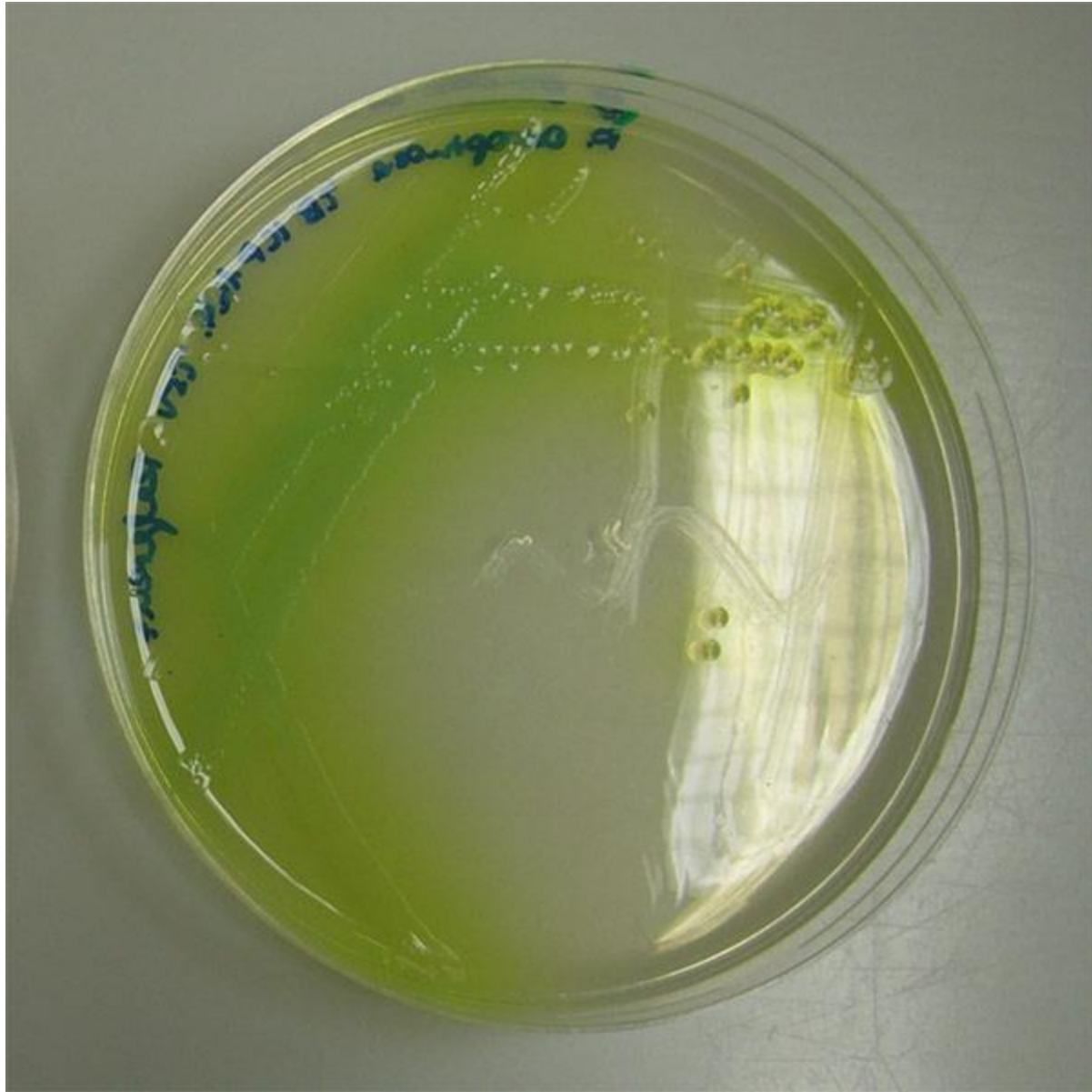
Культуральные свойства *P. Aeruginosa*



Рост колоний синегнойной палочки.



Pseudomonas aeruginosa, чистая культура.



Ps.aeruginosa

- **Не ферментирует углеводы.**
- **Ps.aeruginosa обладает способностью окислять глюкозу в аэробных условиях.**
- **Разжижает желатину.**
- **Имеет каталазу.**
- **Гидролизует казеин.**
- **Продуцирует бактериоцины.**

Антигены *Ps.aeruginosa*

- ЛПС клеточной стенки является типоспецифическим **термостабильным О-антигеном**.
- Термолабильный **жгутиковый Н-антиген**.
- На поверхности клеток синегнойной палочки обнаружены **антигены пилей**.

Ps.aeruginosa

Факторы патогенности:

- **1. Пили IV типа (адгезия и колонизация)**
- **2. Экзотоксин А – цитотоксические свойства, подавляет синтез белка в клетках и тканях, подавляет синтез иммуноглобулинов.**
- **3. Экзотоксин S- подавляет фагоцитоз.**
- **4. Лейкоцидин – цитотоксин.**

Ps.aeruginosa

Факторы патогенности

- **5. Энтеротоксин.**
- **6. Нейраминидаза.**
- **7. Эластаза и экзотоксин А вызывают кровоизлияния, деструкцию тканей и некроз в очагах поражения.**
- **8. Фосфолипаза - разрушает фосфолипиды.**

Ps.aeruginosa

Резистентность

- Сохраняет жизнеспособность при полном отсутствии источников питания.
- Устойчива к дезинфицирующим растворам.
- Устойчива к антибиотикам.
- Хорошо сохраняется в морской, речной, дистиллированной воде.
- Чувствительна к высушиванию, высоким температурам, хлорсодержащим веществам.

Ps.aeruginosa

Эпидемиология и патогенез

- Источники инфекции: больные люди, носители, объекты внешней среды.
- Пути заражения: контактный, аэрогенный, кровяной, алиментарный.
- Является возбудителем внутрибольничных инфекций.
- Вызывает гнойно-воспалительные заболевания различных органов и систем с летальностью до 50%.

Ps.aeruginosa

- Проникает в организм через поврежденные ткани.
- Вызывает локальную и генерализованную (сепсис) инфекции.
- Раневые инфекции, ожоговая болезнь, менингиты, пневмония, инфекции мочевыводящих путей.

Ps.aeruginosa

- Синегнойная палочка является возбудителем внутрибольничных (госпитальных) инфекций.
- Заражение синегнойной инфекцией в клинике связано с медицинскими манипуляциями (катетеризация мочевого пузыря, эндоскопическое исследование).

Ps.aeruginosa

- Синегнойные палочки проникают в организм через поврежденные ткани.
- Прикрепляясь, они заселяют раневую или ожоговую поверхность, слизистые оболочки, кожу и размножаются.
- Бактериемия приводит к распространению возбудителя и развитию сепсиса, формированию вторичных гнойных очагов инфекции.
- Происходит нарушение функционирования органов и систем.

Ps.aeruginosa

Микробиологическая диагностика

- Материал для исследования: кровь, раневое отделяемое, мокрота, моча.
- Основной метод – **Бактериологический.**
- Серологический метод направлен на обнаружение специфических антител.

Ps.aeruginosa

Лечение

- 1. Комбинация антибиотиков
- 2. Гипериммунная плазма
- 3. Антисинегнойный иммуноглобулин
- 4. Синегнойный бактериофаг
- **ПРОФИЛАКТИКА:**
- Поливалентная синегнойная корпускулярная вакцина

Внутрибольничный (нозокомиальный) сальмонеллез

- **Этиология:** Возбудителями внутрибольничного сальмонеллеза являются антибиотикорезистентные штаммы различных сероваров *S. enterica*:
- ***S.typhimutium*, *S.enteritidis*, *S.infants*.**
- Для них характерны наличие особой плазмиды и изменение биохимических свойств.

- Источником инфекции и основным резервуаром являются дети и взрослые, находящиеся в стационаре.
- В процесс вовлекаются дети в возрасте до 1 года, а также взрослые пациенты хирургических и реанимационных отделений, лица пожилого возраста.

- Передача сальмонелл при внутрибольничном сальмонеллезе осуществляется контактно-бытовым и алиментарным путями.

Клиническое течение

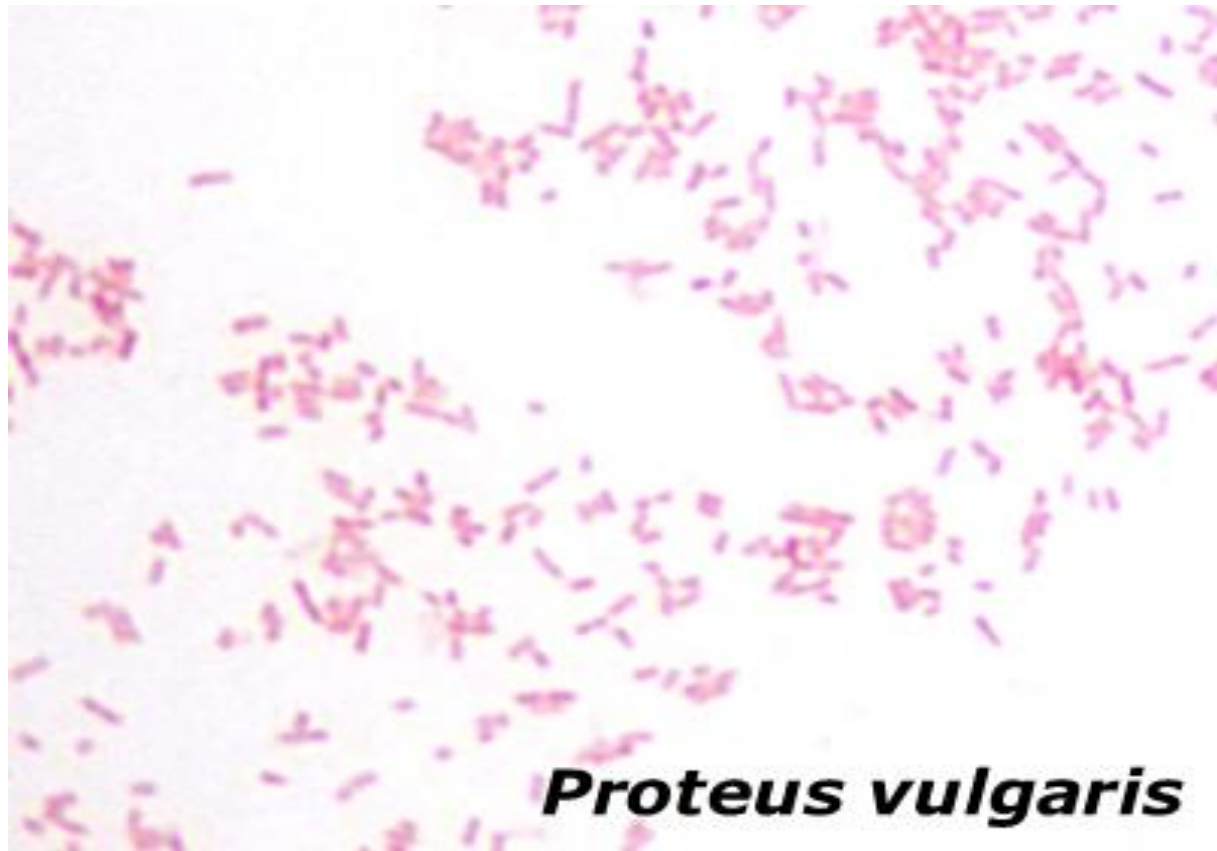
- Характеризуется длительным инкубационным периодом — от 8 до 30 сут.
- Проявление болезни варьирует от бессимптомного носительства до выраженных кишечных расстройств с развитием системной инфекции, осложненной септикопиемией.
- **Иммунитет** не формируется.
- **Профилактика** осуществляется бактериофагом.
- **Лечение:** антибиотики.

Род Proteus

- Название род получил в честь греческого бога Протея, способного принимать
- различные обличия.
- **Виды: *P. vulgaris***
- ***P. mirabili***

Род Proteus

- **Морфология.**
- Грам «-» палочки располагаются попарно или цепочками, не образуют капсулу, подвижны.
- **Культуральные свойства.**
- Хорошо растут на обычных питательных средах. Образуют два типа колоний: отросчатые и крупные с ровными краями.

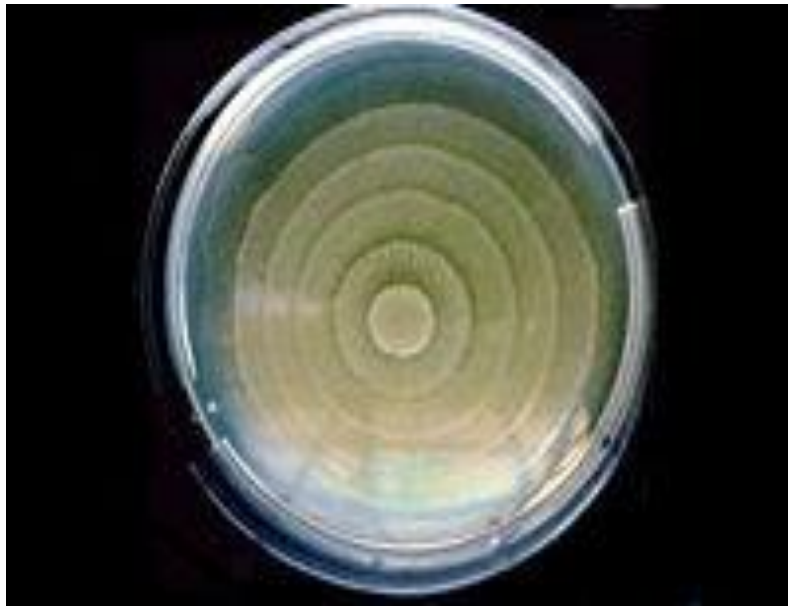


Proteus vulgaris

Proteus
рост на питательной среде



Proteus
рост на питательной среде



Род Proteus

- Обладают выраженной биохимической активностью. Являются **гнилостными микроорганизмами**, способными
- окислять белки до α -кетокислот и аммиака.
- Основными биохимическими признаками являются:
 - **расщепление мочевины;**
 - **продукция сероводорода;**
 - **отсутствие расщепления лактозы;**
 - **разжижение желатины.**

Род Proteus

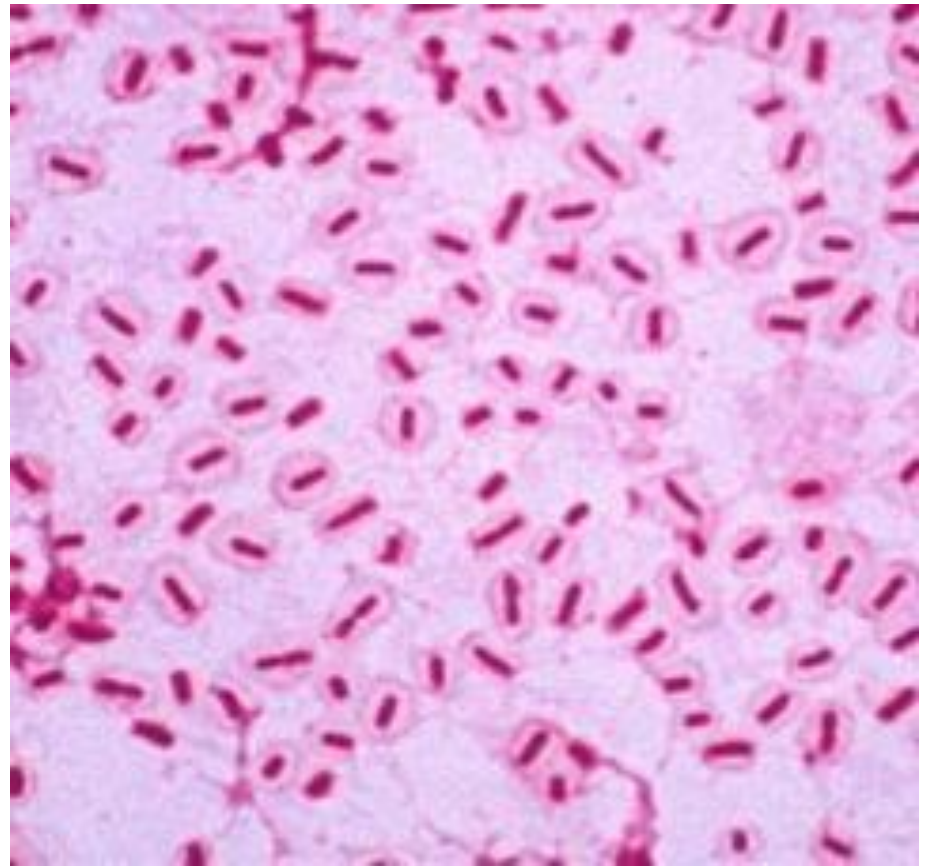
- **Антигенная структура:** О- и Н-антигены.
- **Резистентность:**
- Устойчивы к воздействию факторов окружающей среды.
- Переносят нагревание до 60 °С - 1 ч.
- Длительно сохраняются в растворах фенола и дезинфицирующих веществ.

Род Proteus

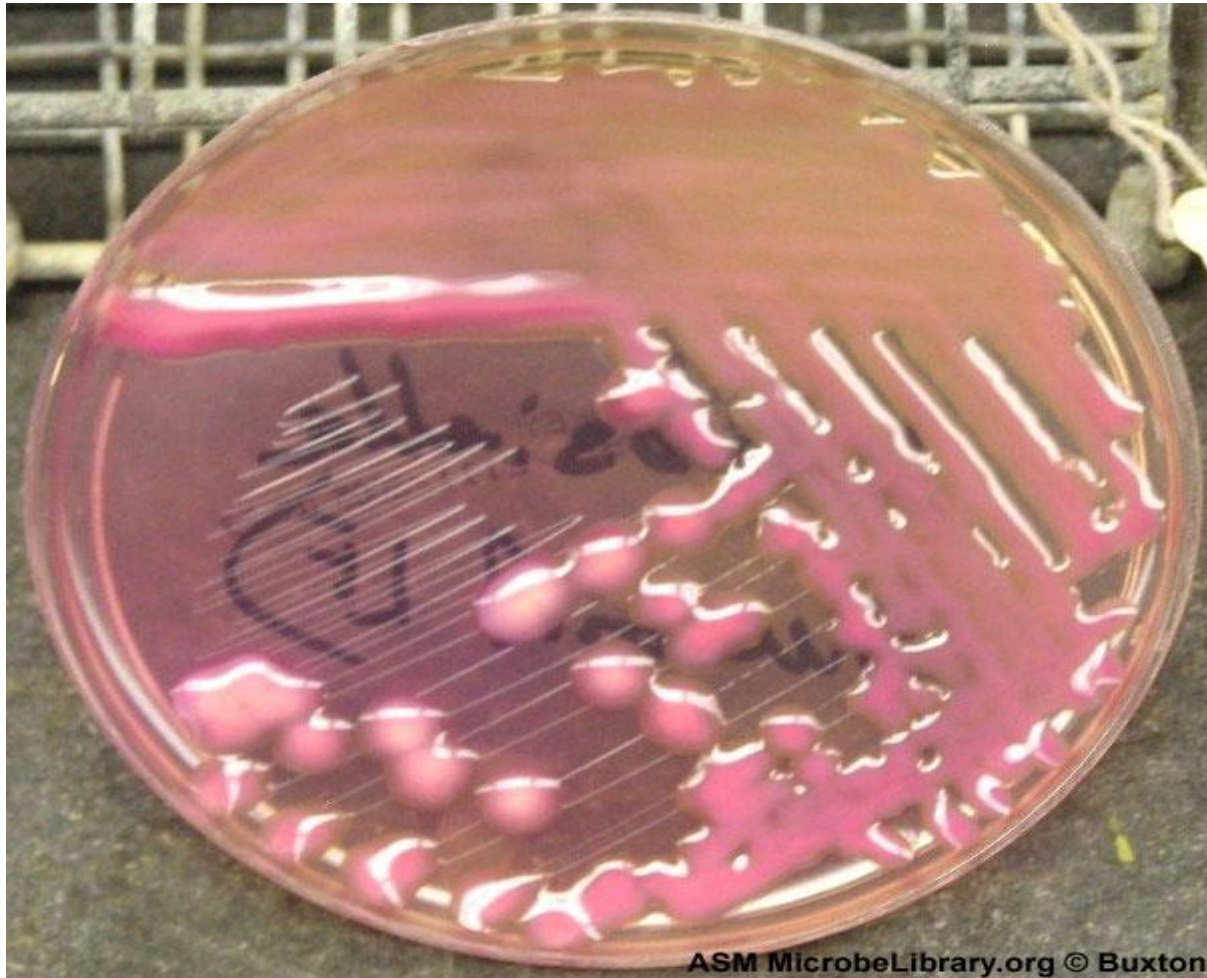
- Вызывают **гнойно-септическую инфекцию, внутрибольничную инфекцию.**
- Наиболее часто протей вызывает **инфекцию мочевыводящей системы.**
- **Микробиологическая диагностика.**
Используют бактериологический метод.
- **Лечение:** протейный бактериофаг и антибиотики.

Род Klebsiella

- Виды:
- *K. pneumoniae*,
- *K. oxytica*,
- *K. granulomatis*.
- Грам «-» палочки,
- неподвижны,
- имеют капсулу.



Klebsiella, рост на питательной
среде.



Klebsiella

- Ферментируют лактозу Расщепляют мочевины
- **Антигены:** O, K.
- **Факторы патогенности:**
- Капсула- обеспечивает устойчивость к фагоцитозу.
- Пили IV типа – адгезия.
- Энтеротоксин.
- Ферменты «агрессии»: нейраминидаза, ДНКаза, фосфатаза.

Клебсиеллы

- Являются одними из ведущих возбудителей внутрибольничных инфекций, которые протекают с поражением **дыхательных и мочевыводящих путей**, вызывают **гнойные послеродовые осложнения** и **неонатальную инфекцию** новорожденных, которая
- протекает в виде **пневмонии, кишечных расстройств и токсикосептических состояний**, заканчивающихся летально.

- *K. oxytoca* является возбудителем внутри-
- больничных инфекций в урологических клиниках.
- **Микробиологическая диагностика:** бактериологический метод.
- **Серологическая диагностика:**
- РСК с О-антигенами.
- **Лечение:** клебсиеллезный бактериофаг,
- антибиотики.

СОСТАВИТЕЛИ:

Коллектив кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени
академика А.А. Воробьева ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана
ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Под редакцией академика РАН, профессора В.В. Зверева

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ КАРТА УЧЁТА РЕЙТИНГА УСПЕВАЕМОСТИ СТУДЕНТА В 202__ - 202__ Г.

КИДЗ № группы _____ ФИО _____

МОРФОЛОГИЯ МИКРОБОВ			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРОБОВ. ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. ИММУНОЛОГИЯ. МЕДИЦИНСКИЕ ИБП			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
Доп. баллы	Тема		Дата
Итог за 1 семестр	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя

ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ; БАКТЕРИИ - ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
ПАТОГЕННЫЕ КОККИ; ВОЗБУДИТЕЛИ АНАЭРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ; ИСМП			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
ПАТОГЕННЫЕ СПИРОХЕТЫ, ХЛАМИДИИ, МИКОПЛАЗМЫ; ПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
ЧАСТНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ			
Сведения об отработках:			
Зачет:	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
Доп. баллы	Тема		Дата
			Подпись преподавателя
Итог за 2 семестр	Дата сдачи	Кол-во баллов	Подпись преподавателя
ЭКЗАМЕН			
Сумма баллов за год	Дата	Оценка	Подпись экзаменатора

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работа в микробиологической лаборатории проводится с заразным материалом, что требует особой дисциплинированности и тщательности в работе. Поэтому студенты обязаны ознакомиться с правилами техники безопасности и строго их соблюдать:

НЕОБХОДИМО:

- верхнюю одежду оставлять в гардеробе; в лаборатории находиться в медицинских халатах и медицинских шапочках; при желании вы можете носить маску и перчатки;
- содержать лаборатории в чистоте и порядке; столы – свободными от материалов, не относящихся непосредственно к работе;
- материал для работы принимается дежурным по группе у лаборанта кафедры и раздаётся студентам только с разрешения преподавателя;
- каждый вид деятельности осуществляется в определенной зоне: работа с микроорганизмами – на специально оборудованном лабораторном столе, заполнение протоколов – на рабочем столе;
- при попадании исследуемого материала на стол, пол и другие предметы немедленно сообщить преподавателю и произвести дезинфекцию;
- инфицированные материалы должны быть помещены в прочные непромокаемые контейнеры или контейнеры с дезинфицирующим раствором;
- во время проведения работы двери и окна лаборатории должны держаться закрытыми.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ:

- принимать пищу в лаборатории;
- касаться руками исследуемого материала;
- зажигать одну спиртовку от другой; передавать, переносить или двигать по столу зажженную спиртовую горелку; оставлять спиртовку горячей после окончания использования по назначению;
- оставлять на рабочем месте нефиксированные препараты, открытые чашки Петри с посевами и другую посуду с инфекционным материалом.

ПО ОКОНЧАНИИ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ СТУДЕНТЫ ОБЯЗАНЫ:

- привести в порядок своё рабочее место;
- сдать дежурному материалы, привести в порядок содержимое лотка с материалами к занятию;
- протереть салфеткой со спиртом объектив микроскопа от иммерсионного масла и сдать микроскоп дежурному;
- вымыть руки с мылом, а при необходимости обработать антисептиком;
- подписать у преподавателя рабочую тетрадь с оформленной работой.

С правилами работы ознакомлен(а). Обязуюсь выполнять.

Дата _____

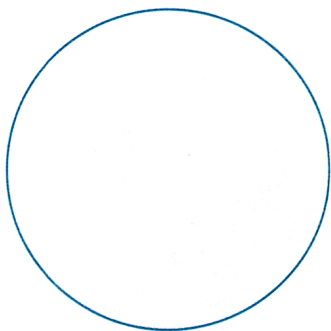
Подпись студента _____

КУРС «ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

РАЗДЕЛ: «МОРФОЛОГИЯ МИКРОБОВ»

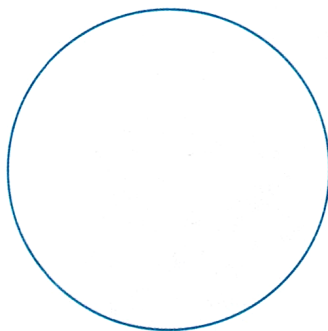
МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Staphylococcus aureus
(чистая культура)



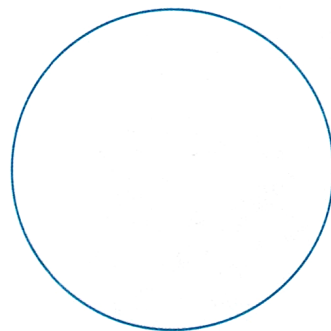
Окраска:

Streptococcus pyogenes
(чистая культура)



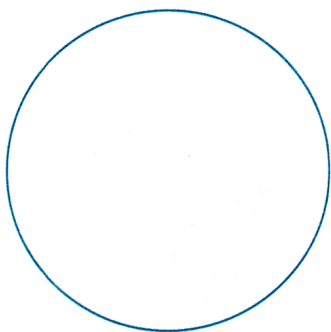
Окраска:

Micrococcus luteus
(чистая культура)



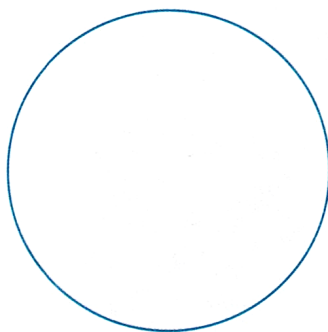
Окраска:

Actinomyces bovis
(чистая культура)



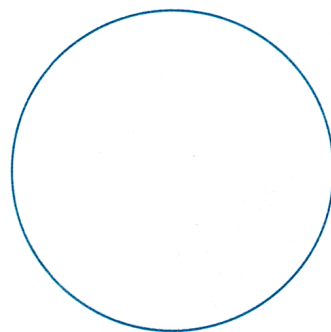
Окраска:

Escherichia coli
(чистая культура)



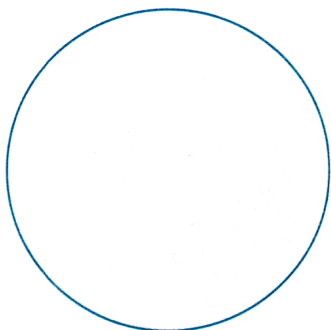
Окраска:

Bifidobacterium bifidum
(чистая культура)



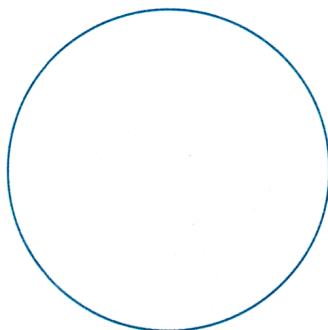
Окраска:

Bacillus cereus
(чистая культура)



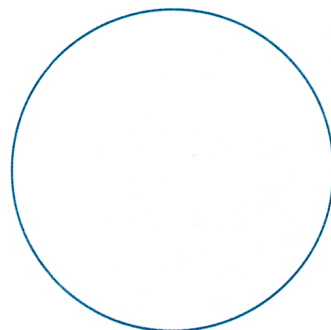
Окраска:

Vibrio cholerae
(чистая культура)



Окраска:

Borrelia recurrentis
(в крови)



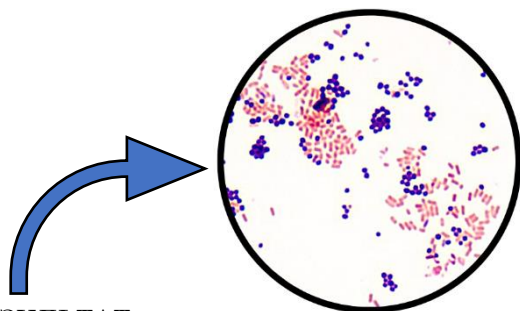
Окраска:

(Подпись преподавателя)

МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Окраска по Граму (для дифференцировки клеточной стенки)

1. На фиксированный мазок положить сухую полоску фильтровальной бумаги, ранее пропитанной анилиновым красителем **генциан-фиолетовым** (по Синеву), нанести на нее 2-3 капли воды и выдержать **2 минуты**.
2. Снять бумажку пинцетом и, не промывая водой, нанести на мазок **раствор Люголя** (содержит йод) на **1 минуту**. Мазок при этом чернеет.
3. Слить раствор Люголя и обесцвечивать **95% этиловым спиртом**, погружая стекло в стаканчик со спиртом в течение **30-40 секунд** до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
4. Тщательно промыть мазок водой для удаления спирта.
5. Для окраски грамотрицательных бактерий нанести на мазок **водный фуксин** на **1-2 минуты**.
6. Слить краску, промыть мазок водой и высушить фильтровальной бумагой.

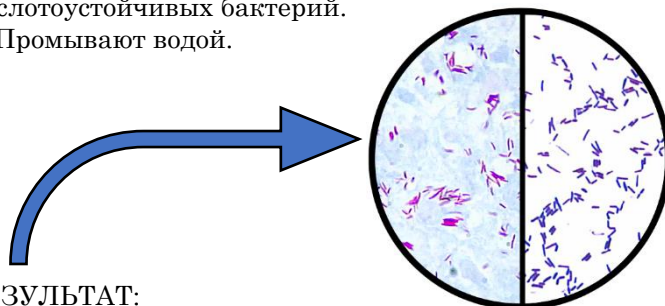


РЕЗУЛЬТАТ:

грамположительные бактерии окрашиваются в **фиолетовый** цвет, грамотрицательные - в **красный**.

Окраска по Цилю-Нильсену (для определения кислотоустойчивости)

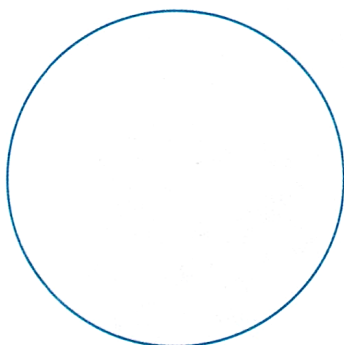
1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги (по размеру мазка), наливают **карболовый фуксин Циля** и, держа стекло пинцетом, подогревают над пламенем спиртовки (но не в пламени!) до появления паров. При подсыхании красителя вследствие его испарения осторожно доливают карболовый фуксин на полоску фильтровальной бумаги. Так **повторяют 2-3 раза**, каждый раз отставляя стекло в сторону для охлаждения (наблюдать за появлением паров лучше, глядя на мазок сбоку).
 2. Снимают бумажку пинцетом. Дают препарату остыть и промывают водой.
- Внимание!** Горячее предметное стекло не промывают водой, т.к. оно может разбиться.
3. Обесцвечивают мазок **5% серной кислотой**, погружая в стаканчик с кислотой **3-5 раз**, не задерживая в кислоте. Обесцвечивание кислотой должно быть полное, т.е. мазок становится бесцветным, почти таким, каким был до окрашивания карболовым фуксином.
 4. Мазок тщательно промывают водой, чтобы прекратилось обесцвечивание.
 5. Окрашивают препарат **метиленовым синим 5-7 минут**. Мазок становится интенсивно голубым. При микроскопии голубой фон облегчает обнаружение кислотоустойчивых бактерий.
 6. Промывают водой.



РЕЗУЛЬТАТ:

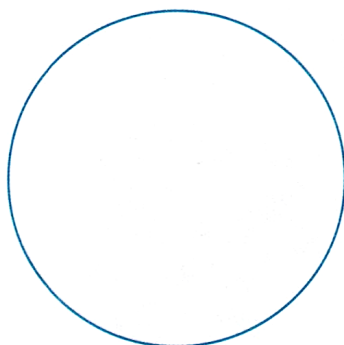
кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в **красный** цвет, **некислотоустойчивые** - в **синий**.

S. aureus и *E. coli*



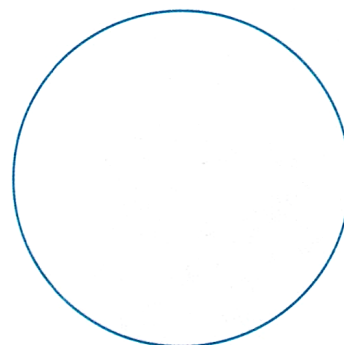
Окраска:

B. cereus и *E. coli*



Окраска:

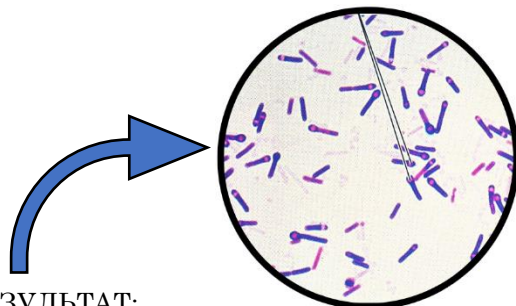
Mycobacterium tuberculosis
(в срезе легкого)



Окраска:

**Окраска по методу Ауески
(для выявления спор бактерий)**

1. На нефиксированный мазок нанести **0,5% раствор соляной кислоты** и подогреть над пламенем **2-3 минуты**.
2. Кислоту слить, препарат промыть водой, просушить и фиксировать в пламени спиртовки.
3. Далее **окрасить по Цилю-Нильсену**.

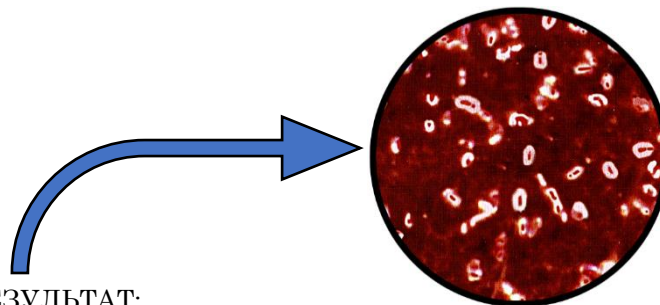


РЕЗУЛЬТАТ:

споры бактерий окрашиваются в **красный** цвет, **вегетативные клетки** – в **синий**.

**Окраска по Бурри-Гинсу
(для выявления капсул бактерий)**

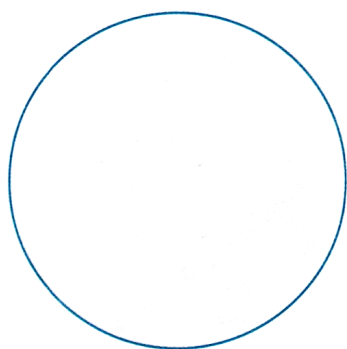
1. Смешать каплю взвеси чистой культуры бактерий с **каплей туши** и при помощи другого предметного стекла сделать мазок, высушить и фиксировать над пламенем.
2. Нанести **карболовый раствор фуксина (1:3)** на **1-2 минуты**.
3. Промыть водой, высушить, микроскопировать.



РЕЗУЛЬТАТ:

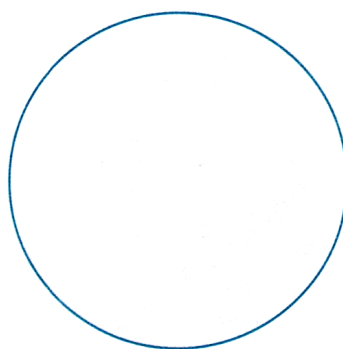
бактерии окрашиваются в **красный** цвет, фон – в темный, а клетки бактерий окружены бесцветным «ореолом» - капсулой.

Klebsiella pneumoniae
(чистая культура)



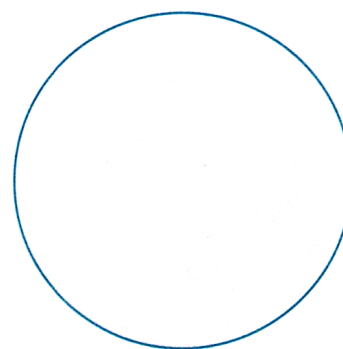
Окраска:

Streptococcus pneumoniae
(в органах)



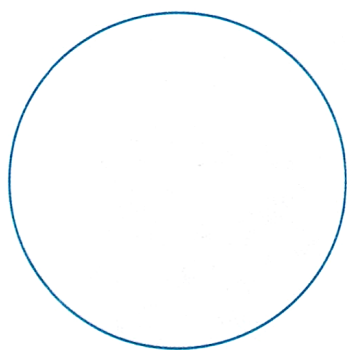
Окраска:

B. cereus
(чистая культура)



Окраска:

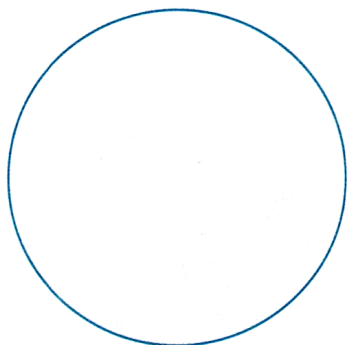
Corynebacterium diphtheriae
(чистая культура)



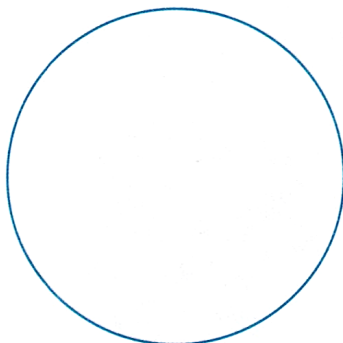
Окраска:

(Подпись преподавателя)

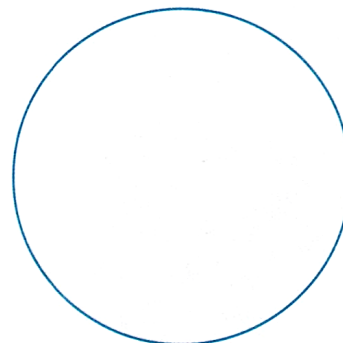
Mucor mucedo
(нативный препарат)



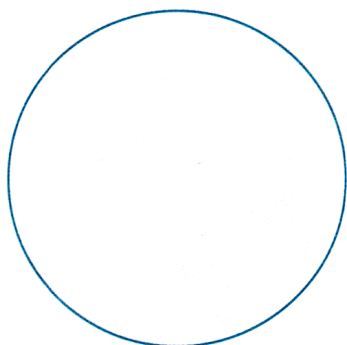
Aspergillus niger
(нативный препарат)



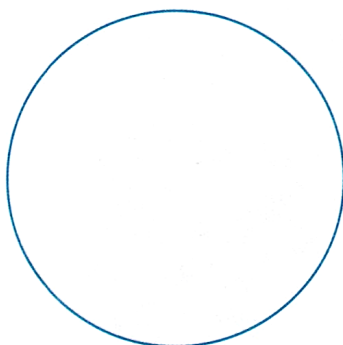
Penicillium notatum
(нативный препарат)



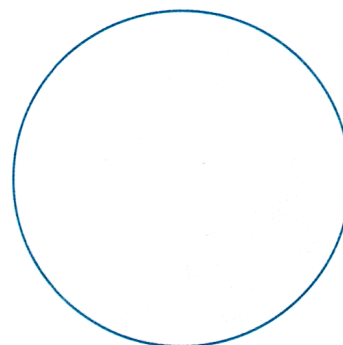
Candida albicans
(чистая культура)



Toxoplasma gondii
(в патологическом
материале)



Plasmodium vivax
(в крови)



Окраска:

Окраска:

Окраска:

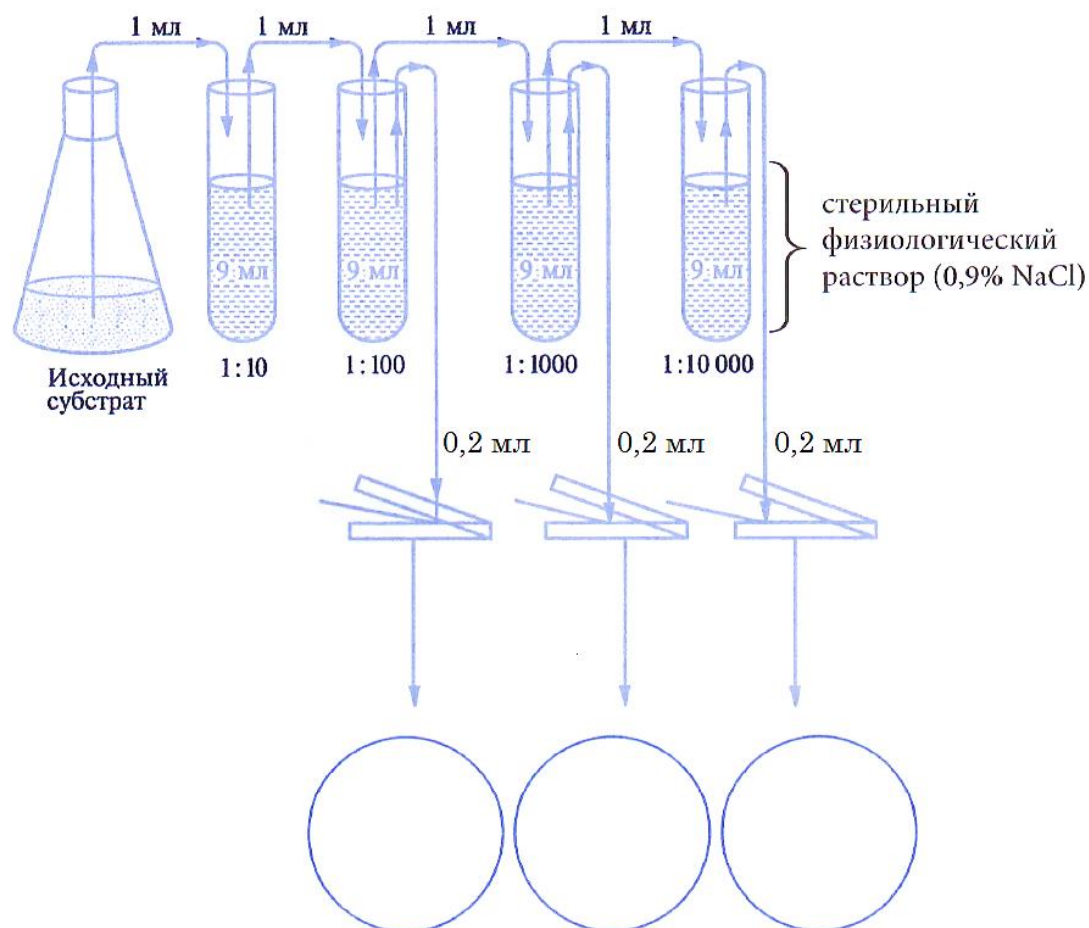
Примечание: нативный препарат – неокрашенный препарат (от англ. «native» - родной)

(Подпись преподавателя)

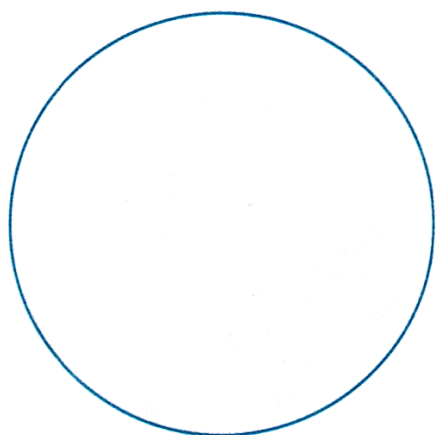
РАЗДЕЛ: «ФИЗИОЛОГИЯ МИКРОБОВ»

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ (НАЧАЛО). ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ. АНТИСЕПТИКА

ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ В ИССЛЕДУЕМОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ ПО КОХУ



Разведение	Количество колоний на чашке
10^{-1}	
10^{-2}	
10^{-3}	
Расчет:	
Вывод:	
Количество микроорганизмов в исследуемом материале:	
x = _____ КОЕ/мл	



МЕТОД ФОРТНЕРА (СДЕЛАЙТЕ ВЫВОД):

ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СПОРООБРАЗУЮЩИЕ И
НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

	КИПЯЧЕНИЕ 5 МИН (100°C)	АВТОКЛАВИРОВАНИЕ (120°C 15 МИН)
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
Вывод: _____ _____		

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ДЕЗИНФЕКЦИИ/АНТИСЕПТИКЕ:

	СПИРТ ЭТИЛОВЫЙ 70 ⁰	АВАНСЕПТ	10% ХЛОРАМИН
Поверхность стола			
Руки			
Вывод: _____ _____			

ДЕЙСТВИЕ АНТИСЕПТИКОВ НА БАКТЕРИИ

АНТИСЕПТИК	ХЛОРГЕКСИДИН	ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА 3%	
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
Вывод: _____ _____			

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ (бактериологический метод исследования).

1 ЭТАП: Посев исследуемого материала на чашки Петри с плотной питательной средой (МПА) методом штриха.

Инкубация при 37°C в течение 24 часов.

Примечание 1: в том случае, если в исследуемом материале содержится незначительное количество возбудителя (например, в крови), то его предварительно накапливают путем посева материала в среду обогащения, а затем после инкубации (как правило, при 37°C в течение 18-24 часов) производят пересев на плотную среду.

Примечание 2: выделение и идентификация чистой культуры анаэробов производится в анаэробных условиях.

2 ЭТАП: Идентификация выделенной чистой культуры (чистых культур) **по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам.** Для этого проводят:

а) макро- и микроскопическое исследование колоний, выросших на плотной питательной среде (**культуральные свойства**);

б) приготовление мазка из половины колонии каждого вида и окраску препарата по Граму (**морфологические и тинкториальные свойства**);

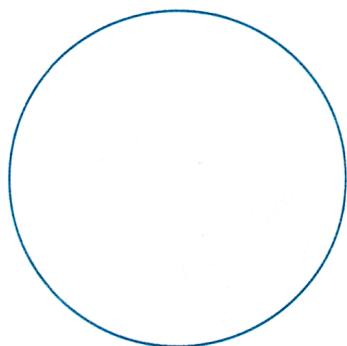
Примечание: микроскопия материала из колоний производится также с целью проверки чистоты культуры.

в) пересев оставшейся части колонии на скошенный агар для накопления выделенной чистой культуры. **Инкубация** при 37°C в течение 24 часов.

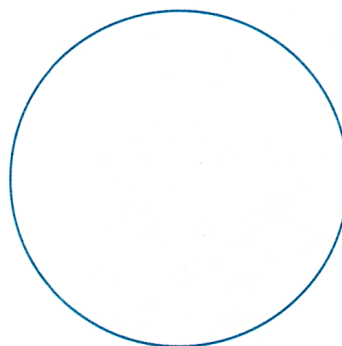
СХЕМА ОПИСАНИЯ КОЛОНИЙ

№	Рисунок	Размер	Форма	Цвет	Поверхность	Края	Консистенция	Структура
1								
2								

Окраска по Граму мазка из колонии №1 Окраска по Граму мазка из колонии №2



Предполагаемый возбудитель:



Предполагаемый возбудитель:

3 ЭТАП:

А. Идентификация выделенной чистой культуры бактерий по биохимическим, антигенным и др. свойствам.

Для этого производят следующие исследования:

- а) изучение однородности роста на скошенном МПА;
- б) приготовление, окраска мазка по Граму (или фуксином) и микроскопия для проверки чистоты выделенной на скошенном МПА культуры;
- в) изучение **биохимической активности** бактерий: посев выделенной чистой культуры на **среды Гисса** (для *определения сахаролитической активности*), желатин и МПБ с индикаторными бумажками на **индол, аммиак и сероводород** (для *выявления протеолитической активности*).

Инкубация при 37°C в течение 24 часов.

Примечание 1: изучение биохимических свойств проводят только при работе с чистой культурой бактерий. При этом определяют свойства каждого выделенного микроорганизма в отдельности. Если при микроскопии мазка из материала со скошенного МПА обнаруживается смесь бактерий, то процедуру выделения чистой культуры бактерий необходимо повторить.

Примечание 2: для адекватной оценки биохимической активности бактерий необходимо исследовать не менее 15-20 тестов!

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Предполагаемый возбудитель	САХАРОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА					ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	
	Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Индол	Сероводород

- г) изучение **антигенных свойств** выделенных бактерий (будет проводиться в разделе: "ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ").

Б. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков.
Инкубация при 37°C в течение 24ч.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ ДИСКОВ

Вид бактерий	Антибиотик, диаметр зоны задержки роста, мм					

В. Внутривидовая идентификация выделенной чистой культуры бактерий (эпидемиологическое маркирование).

Проводится часто с целью определения источника инфекции. С этой целью применяют фаготипирование, рестрикционный анализ, определение плазмидного профиля бактерий и др.

4 ЭТАП: Учет результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: на основании изучения морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств бактерий, выделенных из исследуемого материала, можно сделать вывод об их принадлежности к виду _____ и виду _____.

Выделенные бактерии вида _____ чувствительны к _____; _____, устойчивы к _____;

выделенные бактерии вида _____ чувствительны к _____; _____, устойчивы к _____.

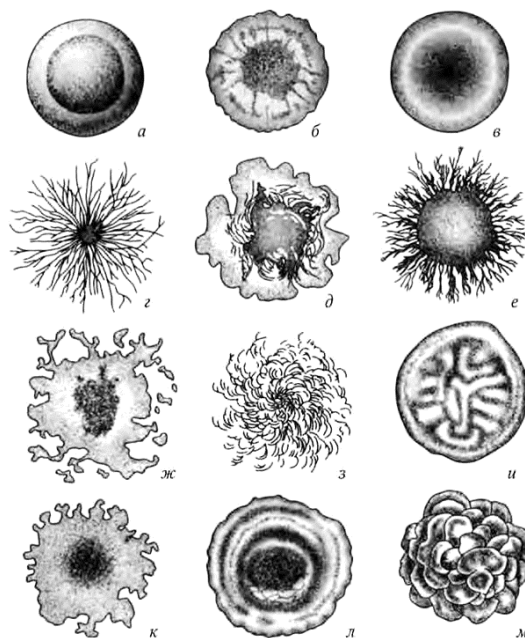
(Подпись преподавателя)

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО КУЛЬТУРАЛЬНЫМ, МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И ТИНКТОРИАЛЬНЫМ СВОЙСТВАМ. МИКРОБИОТА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ И ВОЗДУХА



ФОРМЫ КОЛОНИЙ:

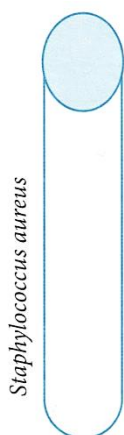
- а** – круглая;
- б** – круглая с фестончатым краем;
- в** – круглая с валиком по краю;
- г** и **д** – ризоидные;
- е** – с ризоидным краем;
- ж** – амёбовидная;
- з** – нитевидная;
- и** – складчатая;
- к** – неправильная;
- л** – концентрическая;
- м** – сложная



ХАРАКТЕРИСТИКА РОСТА БАКТЕРИЙ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ



ПИГМЕНТЫ БАКТЕРИЙ



Staphylococcus aureus



S. epidermidis



Micrococcus luteus



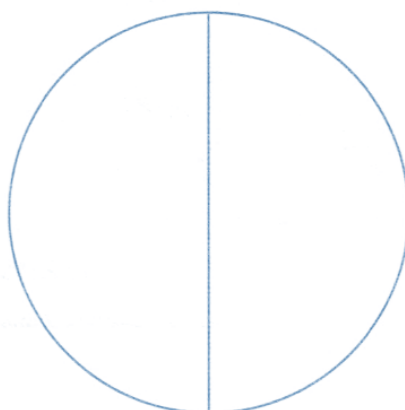
Pseudomonas aeruginosa



Serratia marcescens

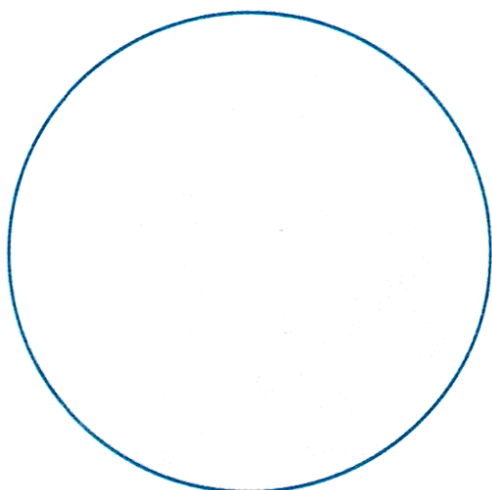
РОСТ БАКТЕРИЙ НА СРЕДЕ ЭНДО

Лактозопозитивные
бактерии



Лактозонегативные
бактерии

В мазке обнаружены:



Окраска:

- _____
1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____
11. _____
12. _____

В мазке могут быть обнаружены:



1. Вейлонеллы
2. Фузиформные бактерии
3. Кандиды
4. Микрококки
5. Стрептококки
6. Стафилококки
7. Вибрионы
8. Спириллы
9. Спирохеты
10. Лактобактерии
11. Бактероиды
12. Лептотрихии

СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОГО ЧИСЛА ВОДЫ

Разведение воды	1:10	1:100	1:1000
Засеваемый объём, мл			
МПА, мл			
Результат (количество колоний)			
Расчёт:			
Заключение: микробное число исследуемой воды _____ КОЕ/мл.			

СХЕМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДУХА

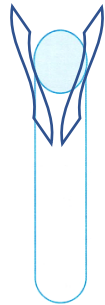
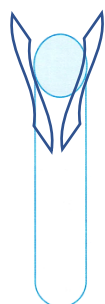
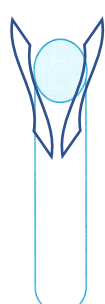
Метод исследования	Место отбора проб	Время экспозиции	Объём исследуемой пробы воздуха	Описание колоний
Седиментационный (по Коху) Посев на МПА		5 мин	10 л	
		5 мин	10 л	
Аспирационный (аппарат Кротова или ПУ-2) Посев на МПА, кровяной агар		Устанавливается автоматически	100 л	
Расчёт: количество бактерий (определено методом Коха) - количество бактерий (определено аспирационным методом) - количество грибов (определено обоими методами) -				
Заключение*: микробное число исследуемого воздуха _____ КОЕ/м ³ , где количество бактерий - _____ КОЕ/м ³ ; количество грибов - _____ КОЕ/м ³				

*Допустимо: ОМЧ для бактерий менее 1500 КОЕ/м³, для грибов - не более 20 КОЕ/м³.

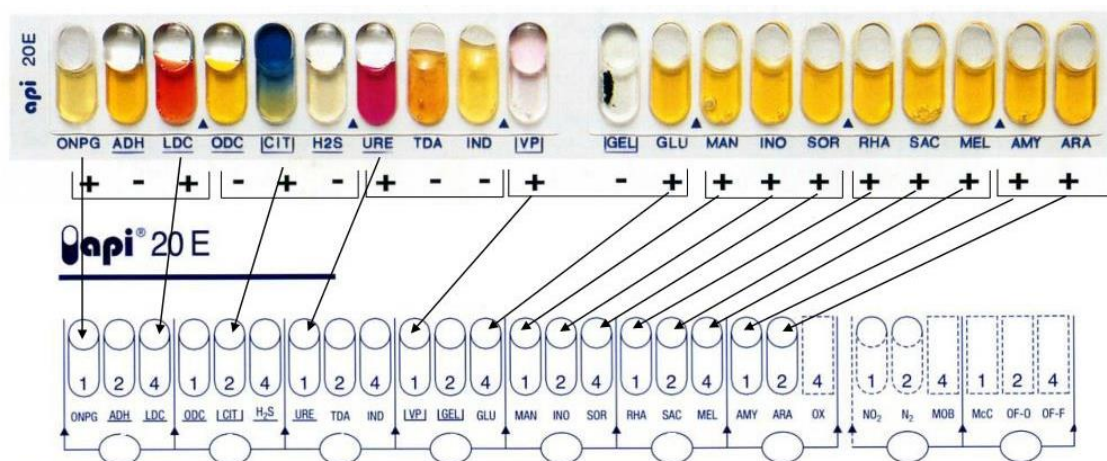
(Подпись преподавателя)

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ (ОКОНЧАНИЕ). ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО БИОХИМИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К ПРОТИВОМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

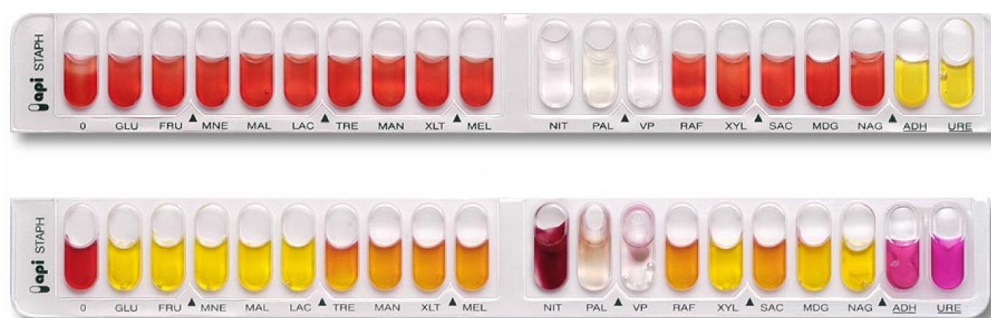
БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

	САХАРОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, РОСТ НА СРЕДАХ ГИССА С:				ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	
	глюкозой	лактозой	маннитом	сахарозой	индол	сероводород
Незасеянные пробирки						
Чистая культура 1						
Чистая культура 2						

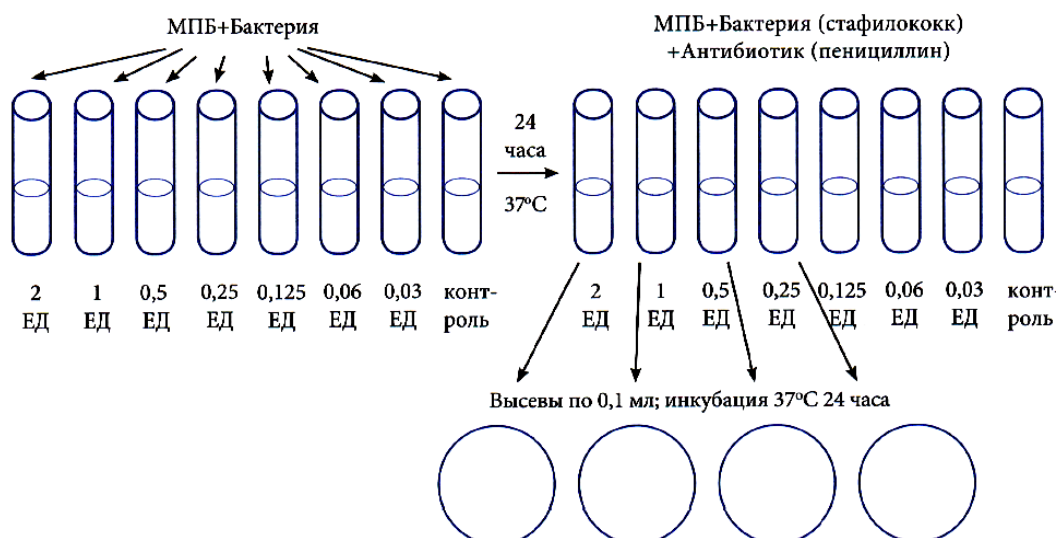
API 20 E - НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ENTEROBACTERIACEAE И ДРУГИХ НЕПРИХОТЛИВЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАЛОЧЕК



API STAPH - НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СТАФИЛОКОККОВ, МИКРОКОККОВ И РОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ



МЕТОД СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

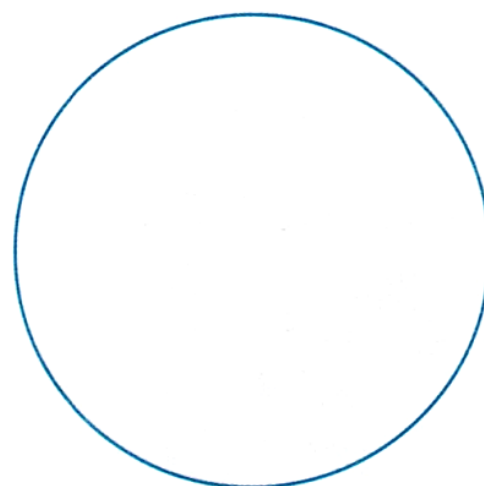
Ингредиенты	1	2	3	4	5	6	7	8 контроль
МПБ, в мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Пенициллин, ЕД/мл	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	—
Стафилококк	по одной "петле"							
Результаты (рост/отсутствие роста):								
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: минимальная ингибирующая концентрация (МИК) пенициллина _____ ЕД/мл								

ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ ДИСКОВ

Нарисуйте результаты демонстрации по определению чувствительности бактерий к антибиотикам методом дисков:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

выделенные бактерии вида _____
чувствительны к _____,
устойчивы к _____;
выделенные бактерии вида _____
чувствительны к _____,
устойчивы к _____.



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ МЕТОДОМ ДИСКОВ

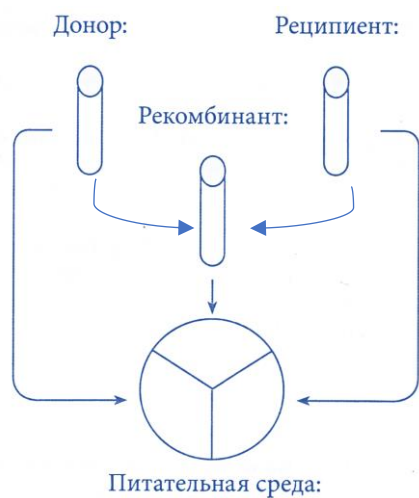
АНТИБИОТИК	Диаметр зоны задержки роста, мм			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	S	R	S	R
Азитромицин	чувствительность оценивается по эритромицину		—	—
Амоксициллин	—	—	чувствительность оценивается по ампициллину	
Ампициллин	—	—	≥ 14	< 14
Бензилпенициллин	≥ 26*	< 26*	—	—
Ванкомицин	используют другие методы для определения чувствительности		—	—
Гентамицин	≥ 18	< 18	≥ 17	< 14
Доксициклин	чувствительность оценивается по тетрациклину		≥ 14	< 11
Имипенем	чувствительность к карбапенемам оценивается по цефокситину		≥ 22	< 16
Карбелициллин	—	—	≥ 19	< 15
Левифлоксацин	≥ 22	< 22	≥ 23	< 19
Меропенем	чувствительность к карбапенемам оценивается по цефокситину		≥ 22	< 16
Оксациллин	—	—	—	—
Рифампицин	≥ 26	< 23	—	—
Тетрациклин	≥ 22	< 19	≥ 15	< 12
Хлорамфеникол (левомецетин)	≥ 18	< 18	≥ 17	< 17
Цефалексин	чувствительность оценивается по цефокситину		≥ 14	< 14
Цефтриаксон			≥ 25	< 22
Цефокситин	≥ 22	< 22	≥ 19	< 19
Ципрофлоксацин	≥ 21	< 21	≥ 26	< 24
Эритромицин	≥ 21	< 18	—	—

* Большинство стафилококков продуцируют пенициллиназу, тест используется для определения ее наличия.

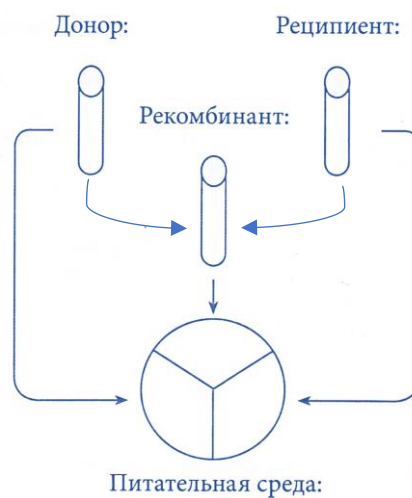
S (susceptible, чувствительный);
I (intermediate, мало устойчивый);
R (resistant, устойчивый).

(Подпись преподавателя)

ОПЫТ ПО ТРАНСДУКЦИИ



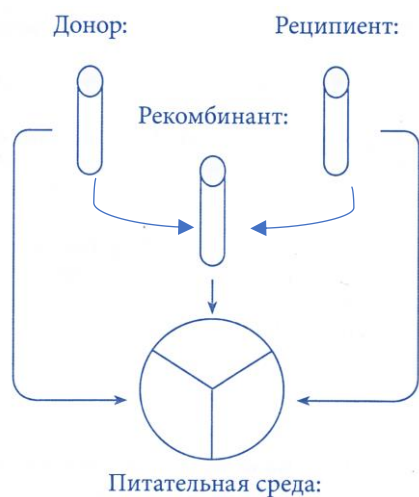
ОПЫТ ПО ТРАНСФОРМАЦИИ



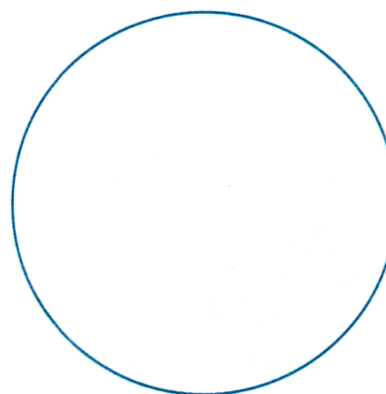
ВЫВОД: _____

ВЫВОД: _____

ОПЫТ ПО КОНЪЮГАЦИИ



ФАГОТИПИРОВАНИЕ СТАФИЛОКОККОВ

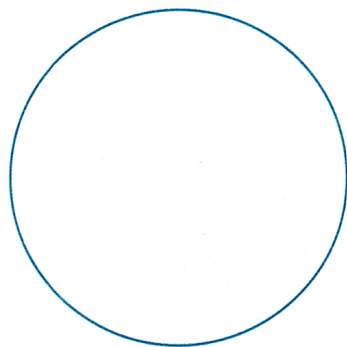


ВЫВОД: _____

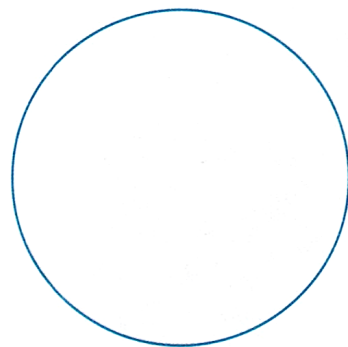
ВЫВОД: _____

(Подпись преподавателя)

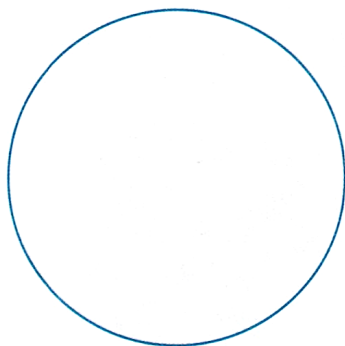
Культура клеток типа HeLa



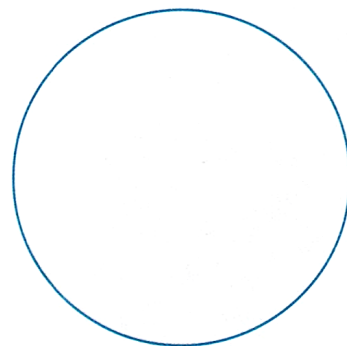
***Культура клеток
куриных фибробластов***



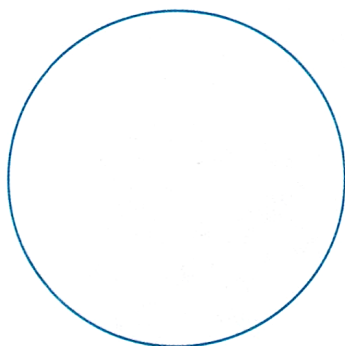
***ЦПД вирусов: гибель и деструкция
монослоя***



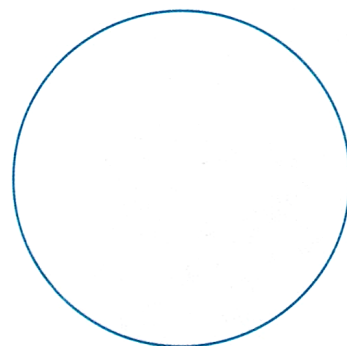
***ЦПД вирусов: цитоплазматические
включения***



***ЦПД вирусов: внутриядерные
включения***

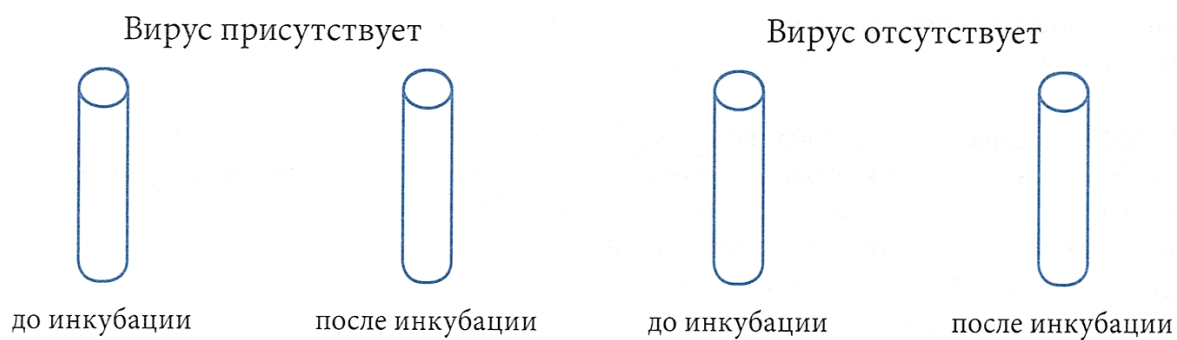


***Тельца Бабеша-Негри в культуре
клеток***



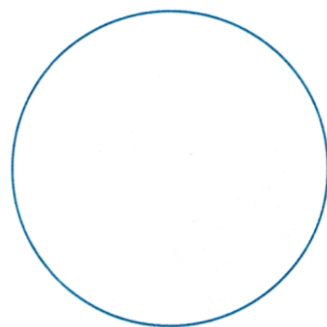
Перечислите другие виды ЦПД:

ЦВЕТНАЯ ПРОБА:



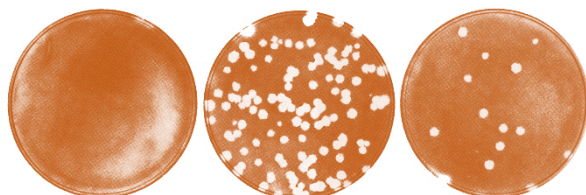
ФЕНОМЕН ГЕМАДСОРБЦИИ:

Принцип метода:



ОБРАЗОВАНИЕ БЛЯШЕК ПОД АГАРОМ:

Принцип метода:



РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РГА) ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВИРУСА В АЛЛАНТОИСНОЙ ЖИДКОСТИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

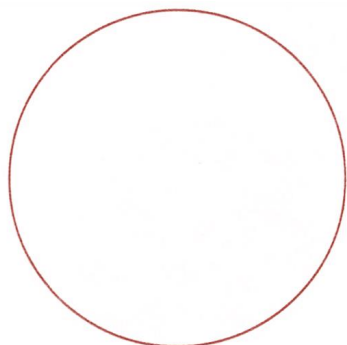
Ингредиенты	Разведения вирусосодержащего материала					Контроль эритроцитов
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Изотонический р-р хлорида натрия, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Аллантоисная жидкость (вирусосодержащий материал), мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
1% суспензия эритроцитов, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Перемешать, инкубировать при комнатной температуре в течение 30- 60 мин.						
Результаты:						
ВЫВОДЫ: РГА <i>положительная/отрицательная</i> . В аллантоисной жидкости обнаружен/не обнаружен вирус, обладающий гемагглютинирующей способностью. Титр вируса _____.						

(Подпись преподавателя)

РАЗДЕЛ: «УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ»

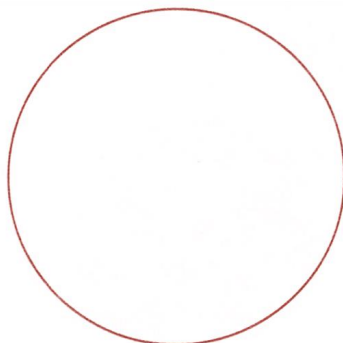
ИНФЕКЦИЯ. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

Streptococcus pneumoniae
(в органах)



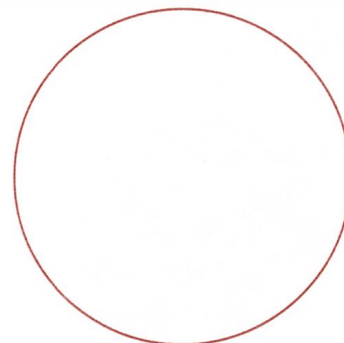
Окраска:

Фагоцитоз
Staphylococcus aureus

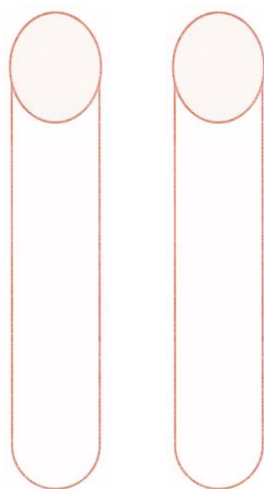


Окраска:

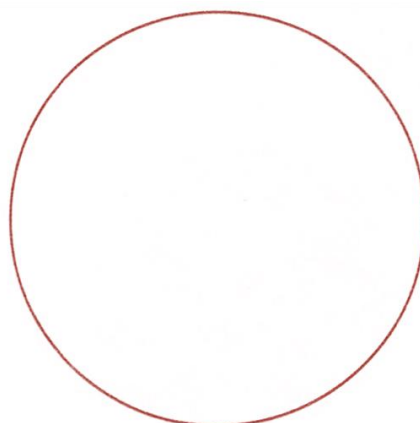
Neisseria gonorrhoeae
в гное
(незавершенный фагоцитоз)



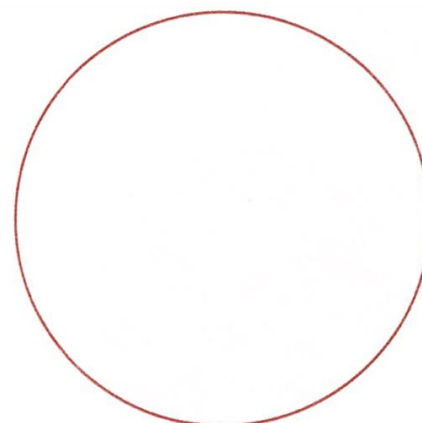
Окраска:



Плазмокоагулаза



Рост на 5% кровяном
агаре



Рост на ЖСА
(лецитовителлаза)

α -гемолиз – _____

β -гемолиз – _____

γ -гемолиз – _____

(Подпись преподавателя)

МЕХАНИЗМЫ И ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

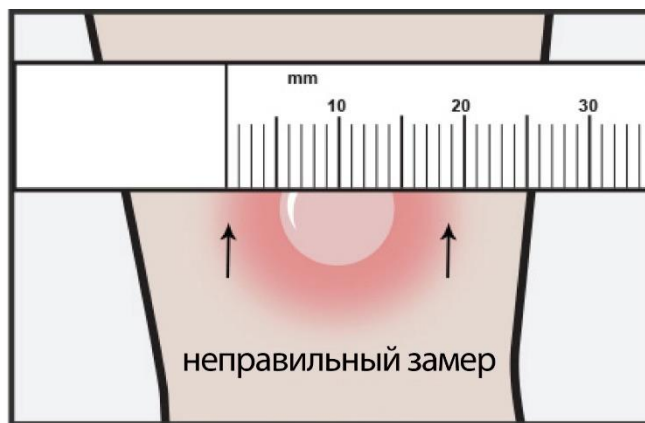
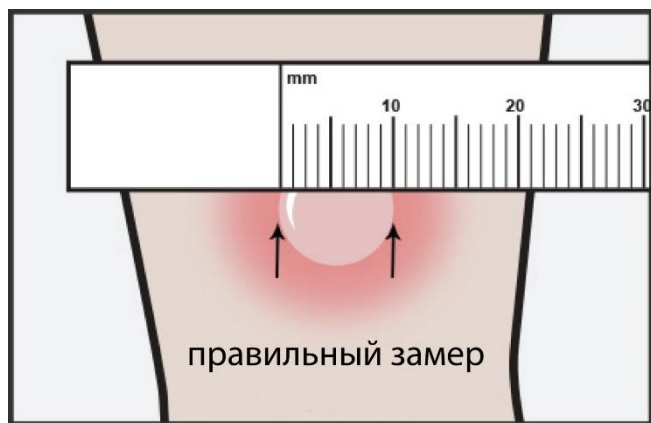
Механизмы заражения	Пути передачи инфекции	Факторы передачи инфекции	"Входные ворота" инфекции	Группа инфекционных заболеваний
Фекально-оральный	<i>Пищевой (алиментарный)</i>	Контаминированные пищевые продукты	Рот, желудочно-кишечный тракт	Кишечные инфекции
	<i>Водный</i>	Инфицированная вода		
	<i>Контактно-бытовой</i>	Грязные руки, контаминированная посуда, насекомые-переносчики (мухи, тараканы)		
Аэрогенный	<i>Воздушно-капельный</i> (диаметр частиц от 10 до 100 мкм)	Капли слюны из зева при кашле, чихании, разговоре, шепоте, дыхании, пении, поцелуе	Слизистые оболочки дыхательных путей	Респираторные инфекции (инфекции дыхательных путей)
	<i>Воздушно-пылевой</i>	Частицы пыли, несущие на себе микробы		
	<i>Аэрозольный</i> (диаметр частиц до 10 мкм)	Пылевой или водный аэрозоль		
Кровяной	<i>Трансфузионный</i>	Переливание зараженной крови, плазмы	Кровь	Кровяные инфекции
	<i>Трансплацентарный*</i>	Через плаценту от матери к плоду		
	<i>Половой</i>	При микроповреждениях с выделением крови		
	<i>Трансмиссивный</i>	Через укусы кровососущих насекомых		
	<i>Артифициальный</i>	Через нестерильные медицинские инструменты (иглы, шприцы и пр.) и средства личной гигиены (зубная щетка, "опасная" бритва) с остатками крови на них		
Контактный	<i>Контактный раневой</i>	Укус животного, травма, все виды оружия, контаминированные медицинская аппаратура, шовный и перевязочный материал	Кожа, слизистые оболочки мочевого пузыря и половой систем, конъюнктивы глаз, волосы, ногти	Контактные (раневые) инфекции
	<i>Половой</i>	Половой контакт		Сексуально-трансмиссивные инфекции
	<i>Контактно-бытовой</i>	Контаминированные руки (при рукопожатии, дотрагивании и т.п.), поцелуи, контаминированные предметы (посуда, мочалка, предметы личной гигиены)		Контактные инфекции
Вертикальный	<i>Трансплацентарный</i>	Через плаценту от матери к плоду (антенатальное инфицирование)	Кровь	Кровяные («врожденные») инфекции
	<i>Контактный</i>	При прохождении через инфицированные родовые пути матери, грудное вскармливание (интранатальное и постнатальное инфицирование)		Контактные инфекции

*См. также «вертикальный механизм заражения»

НАКОЖНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИИ НА АЛЛЕРГЕНЫ



ПРОБА МАНТУ



ЗАКЛЮЧЕНИЕ: _____

(Подпись преподавателя)

МИБП ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

ДИАГНОСТИКУМЫ (АГ):

I. Бактериальные

Пример: Бактериальный диагностикум сальмонелл брюшного тифа.

II. Эритроцитарный

Пример: Эритроцитарный Vi-диагностикум.

III. Вирусный

Пример: Диагностикум гриппозный сухой.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АТ-ПРЕПАРАТЫ:

I. Диагностические иммунные сыворотки

Агглютинирующие адсорбированные и неадсорбированные; Преципитирующие; Гемолитические и др.

Пример: Адсорбированная поливалентная агглютинирующая сальмонеллезная сыворотка групп АВСДЕ.

II. Эритроцитарные АТ-диагностикумы

Примеры: Дизентерийные эритроцитарные диагностикумы; Эритроцитарный брюшнотифозный диагностикум.

III. Моноклональные АТ

IV. АТ, меченые флюорохромами, ферментами, изотопами

Примеры: Антитела, меченные флуоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ), или другим флюорохромом для прямого метода Кунса (РИФ); Препараты пероксидазных конъюгатов антител для выявления антигенов стафилококков, пневмококков, возбудителей чумы, туберкулеза, легионеллеза, гриппа, парагриппа, аденовирусной инфекции и др.; Сыворотки меченые радиоизотопами для постановки РИА.

V. Антиглобулиновые сыворотки

Пример: Антиглобулиновая сыворотка для реакции Кумбса.

ДРУГИЕ КОМПОНЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ:

I. Комплемент

II. Эритроциты

III. Гемолитическая система и др.

БАКТЕРИОФАГИ

Примеры: Стафилококковые типовые, Брюшнотифозные типовые, Холерные типовые;

АЛЛЕРГЕНЫ

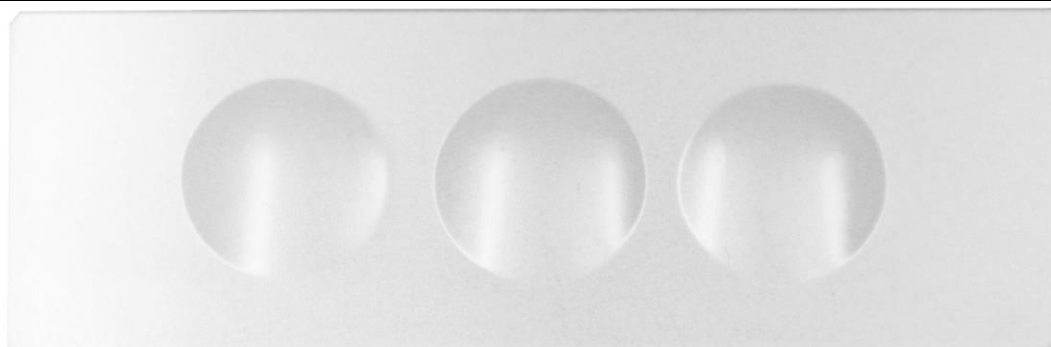
Примеры: Туберкулин, Бруцеллин, Тулярин, Антраксин.

**РАЗВЕРНУТАЯ РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ
С СЫВОРОТКОЙ БОЛЬНОГО ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ**

Ингредиенты	Пробирки						
	1	2	3	4	5	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Изотонический р-р, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	1,0
Сыворотка больного в исходном разведении 1:25, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0 слить	1,0	—
Разведения сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:25	—
Первый ряд пробирок: О-диагностикум (в каплях)	3	3	3	3	3	—	3
Второй ряд пробирок: Н-диагностикум (в каплях)	3	3	3	3	3	—	3
<i>Термостат при 37°C в течение 2 ч., затем при комнатной температуре 24 ч.</i>							
Результат: О-агглютинация							
Результат: Н-агглютинация							
ВЫВОДЫ: Реакция агглютинации положительная/отрицательная. Титр антител к О-антигену - _____. Титр антител к Н-антигену - _____.							

**РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ НА СТЕКЛЕ
С АДсорбированными сыворотками**

Сыворотка 1	Сыворотка 2	Контроль:
_____	_____	ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА
+	+	+
ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА	ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА	физ. р-р



ВЫВОД: _____

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ (НЕПРЯМОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Ингредиенты	Пробирки						
	1	2	3	4	5	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Изотонический р-р, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сыворотка больного в исходном разведении 1:25, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 слить	0,25	—
Разведения сыворотки	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	—
Эритроцитарный диагностикум, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	0,25
Инкубация при комнатной температуре в течение 30-60 минут							
Результат (рисунок):							
Результат (+/-)							
ВЫВОДЫ: Реакция пассивной гемагглютинации положительная/отрицательная. Титр антител в исследуемой сыворотке против данного антигена _____.							

РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГАПТЕНОМ

Ингредиенты	Неизвестный гаптен
Преципитирующая сыворотка против <i>B.cereus</i>	
Преципитирующая сыворотка против <i>E.coli</i>	
ВЫВОД: Неизвестный гаптен выделен из _____.	



РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕИЗВЕСТНОГО БЕЛКА

Ингредиенты	Неизвестный белок
Преципитирующая сыворотка против белка человека	
Преципитирующая сыворотка против белка курицы	
ВЫВОД: Неизвестный белок принадлежит _____.	

(Подпись преподавателя)

РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ГЕМОЛИЗА

Ингредиенты	Опыт 1	Контроль			
		2	3	4	5
Гемолитическая сыворотка кролика, содержащая антитела к эритроцитам барана, мл	0,5	0,5	—	0,5	—
Эритроциты барана, мл	0,5	0,5	0,5	—	0,5
Комплемент в разведении 1:10, мл	0,5	—	0,5	0,5	—
Эритроциты собаки, мл	—	—	—	0,5	—
Физиологический раствор, мл	—	0,5	0,5	—	1,0
Общий объём, мл	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>					
Результат (гемолиз / отсутствие гемолиза):					
ВЫВОДЫ: Реакция иммунного гемолиза положительная/отрицательная, т.к. 					

РЕАКЦИЯ ТИТРОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Ингредиенты	Пробирки								Контроль гем. сист.
	1	2	3	4	5	6	7	Контроль компл. 8	
Комплемент разведения 1:10, мл	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	—
Изотоническая раствор, мл	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 30 минут</i>									
Результат (гемолиз +/-):									
ВЫВОДЫ: титр комплемента _____; рабочая доза комплемента _____ мл.									

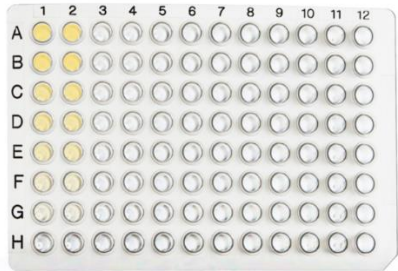
РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА С ИССЛЕДУЕМОЙ СЫВОРОТКОЙ

Ингредиенты		Опыт 1	Контроль сыворотки 2	Контроль антигена 3
Исследуемая сыворотка в разведении 1:25, мл		0,5	0,5	—
Антиген (диагностикум), мл		0,5	—	0,5
Комплемент в рабочей дозе, мл		0,5	0,5	0,5
Изотонический раствор, мл		—	0,5	0,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Гемолитическая система, мл		1,0	1,0	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Результат (гемолиз +/-):	Сыворотка больного			
	Сыворотка здорового			
ВЫВОДЫ: РСК положительная/отрицательная с сывороткой здорового, т.к. РСК положительная/отрицательная с сывороткой больного, т.к. 				

Условные обозначения:

«+» – наличие гемолиза (РСК «-»), «-» – отсутствие гемолиза (РСК «+»)

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА

Ингредиенты	Опыт	«Положительный контроль»						«Отриц. контроль»
	A1 A2	B1 B2	C1 C2	D1 D2	E1 E2	F1 F2	G1 G2	H1 H2
1. Буфер А (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Инкубация при комнатной температуре 10 мин.								
2. Исследуемый антиген (мл)	0,1*	—	—	—	—	—	—	—
3. Стандартный антиген 100 мкг/мл (мл)	—							—
4. Отрицательный контроль (мл)	—	—	—	—	—	—	—	0,1
Инкубация при 37°C в течение 20 мин., отмывка *Добавить 0,1 мл, аккуратно перемешать и слить 0,1 мл (во всех лунках должен быть одинаковый объем жидкостей)								
5. Конъюгат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Инкубация при 37°C в течение 20 мин., отмывка								
6. Субстрат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Инкубация при комнатной температуре 20 мин.								
7. «Стоп-реагент» (50% H ₂ SO ₄) (мл)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
  Фотометр вертикального сканирования измеряет оптическую плотность содержимого лунок планшета.								
Результаты (+/—):								
ВЫВОДЫ: ИФА положительная/отрицательная Концентрация исследуемого антигена _____ мкг/мл								

(Подпись преподавателя)

МИБП ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

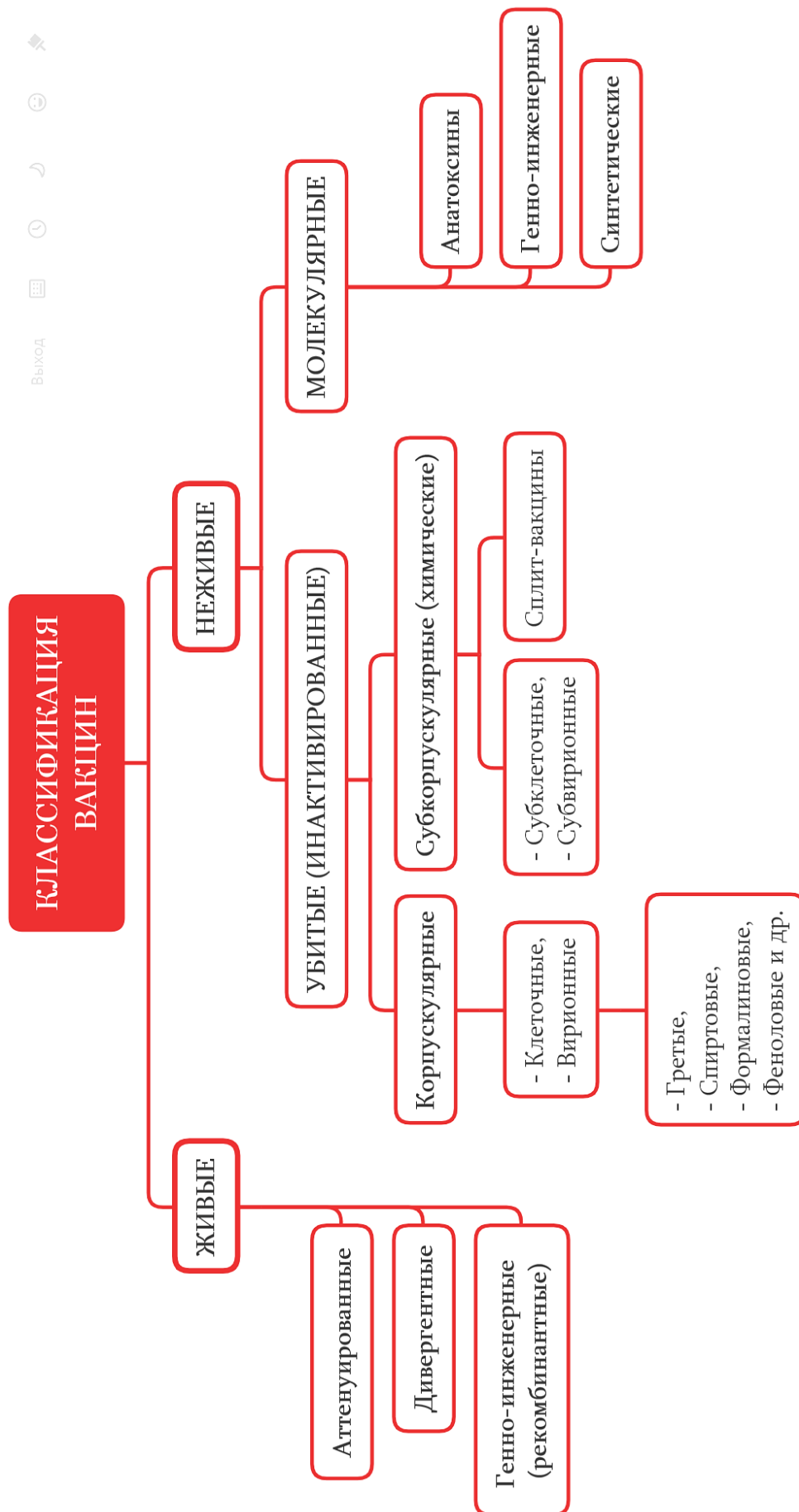
СХЕМА РЕАКЦИИ ФЛОККУЛЯЦИИ ДЛЯ ТИТРОВАНИЯ АНАТОКСИНА

Ингредиенты	1	2	3	4	5
Дифтерийный анатоксин, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Противодифтерийная анитоксическая сыворотка, мл (400 МЕ/мл)	0,16	0,18	0,2	0,22	0,24
Водяная баня 40-45°C в течение 45 минут					
Результаты (инициальная флоккуляция):					
Расчёт:					
ВЫВОДЫ: Реакция флоккуляции положительная/отрицательная (нужное подчеркнуть). Титр дифтерийного анатоксина_____Lf/мл.					

СХЕМА КОНТРОЛЯ ДИФТЕРИЙНОГО АНАТОКСИНА

Название анатоксина	Тип вакцины	Внешний вид (цвет, прозрачность)	Стерильность	Титр (из таблицы выше)
ВЫВОД: Дифтерийный анатоксин соответствует / не соответствует стандарту (нужное подчеркнуть) по показателям _____.				

(Подпись преподавателя)



ВАКЦИНЫ

Живые

I. Живые дивергентные

Пример: Вакцина оспенная живая.

II. Живые аттенуированные

Примеры: БЦЖ, БЦЖ-м; Вакцина бруцеллёзная живая; Сибиреязвенная вакцина живая; Вакцина чумная живая; Туляремиальная вакцина живая; Вакцина желтой лихорадки живая сухая; Вакцина живая Ку-лихорадки; Полиомиелитная пероральная живая вакцина (ОПВ); Вакцина против краснухи культуральная живая; Живая коревая вакцина; Вакцина против ветряной оспы живая аттенуированная.

Ассоциированная: Вакцина с живым вакцинным штаммом – Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая (ЖКСВ-Е).

III. Рекомбинантные (векторные) вакцины

Пример: Комбинированная векторная вакцина для профилактики новой коронавирусной инфекции.

Инактивированные

I. Корпускулярные:

- **Цельноклеточные**

Пример: Холерная инактивированная вакцина; лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая вакцина; полиомиелитная пероральная инактивированная вакцина (ИПВ).

- **Цельновирионные**

Пример: Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная; Вакцина клещевого энцефалита; Герпетическая вакцина инактивированная.

II. Химические

- **Субклеточные**

Примеры: Вакцина брюшнотифозная Vi-полисахаридная; Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная; Вакцина менингококковая полисахаридная; Вакцина конъюгированная для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae*.

- **Субвирионные**

Пример: Вакцина гриппозная полимер-субъединичная.

Молекулярные

I. Биосинтетические природные (анатоксины)

Примеры: АД-м, АС, АДС, АДС-м, Тетраанатоксин, Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный.

Комбинированные (с анатоксином): АКДС.

Ассоциированные (с анатоксином): Вакцина холерная бивалентная химическая.

II. Генно-инженерные

Пример: Вакцина против ВГВ рекомбинантная дрожжевая жидкая.

III. Синтетические

Пример: Вакцина на основе пептидных АГ для профилактики COVID-19.

Противогриппозные:

- **I поколение:** Гриппозная вакцина живая аллантоисная для интраназального применения; убитая цельновирионная гриппозная вакцина.
- **II поколение:** Вакцина полимер-субъединичная гриппозная.
- **III поколение:** Инактивированная сплит-вакцина гриппозная.
- **IV поколение:** Рекомбинантная противогриппозная вакцина (в РФ не используется).
- **V поколение:** Поливалентная виросомальная инактивированная вакцина против гриппа.

КОМБИНИРОВАННЫЕ

Примеры: Вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекций, вызываемых *Haemophilus influenza* тип b, конъюгированная («Пентаксим»); Адсорбированная бесклеточная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина, инактивированная полиомиелитная вакцина, рекомбинантная вакцина против вируса гепатита В, вакцина для профилактики *Haemophilus influenzae* тип b («Инфанрикс»).

БАКТЕРИОФАГИ

Примеры: Поливалентный брюшнотифозный бактериофаг; Бактериофаг сальмонеллёзный групп А, В, С, D, Е; Бактериофаг дизентерийный поливалентный.

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

Экзогенные – сочетают в себе свойства вакцинных и иммуномодулирующих средств.

Примеры: Рибомунил; ИРС-19; Бронхомунал.

Эндогенные

I. Колонистимулирующие факторы

Пример: Молграмостин.

II. Интерфероны

Пример: Интерферон Альфа-2b лейкоцитарный или рекомбинантный.

III. Интерлейкины

Пример: Интерлейкин-2.

IV. Другие системные иммуномодуляторы

- **Препараты тимуса**

Примеры: Тактивин; Тимопозтин; Миелопид (В-активин).

ВАКЦИНЫ

Инактивированные

Примеры: Гонококковая инактивированная вакцина; Стафилококковая инактивированная вакцина лечебная; Бруцеллёзная лечебная вакцина жидкая.

ИМУННЫЕ СЫВОРОТОЧНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

I. Гетерологические:

- **Иммуноглобулины и сыворотки:**

А. Противобактериальные

Пример: Противочумная сыворотка.

Б. Противовирусные

Пример: Иммуноглобулин антирабический лошадиный.

В. Антитоксические

Примеры: Противогангренозная поливалентная; Противоботулиническая А, В, Е; Противостолбнячная; Противодифтерийная.

II. Гомологические:

- **Иммуноглобулины:**

А. Ненаправленного действия:

Пример: Иммуноглобулин человека нормальный.

Б. Направленного действия

Примеры: Противостафилококковый иммуноглобулин; Противогриппозный иммуноглобулин; Иммуноглобулин против клещевого энцефалита.

- **Сыворотки**

Примеры: Сыворотка против клещевого энцефалита; Противогриппозная сыворотка;

- **Гипериммунная плазма**

Примеры: Противокоронавирусная плазма; Противогриппозная плазма; Антистафилококковая плазма; Антисинегнойная плазма.

БАКТЕРИОФАГИ

Примеры: Стафилококковый, Стрептококковый, Синегнойный, Клебсиеллёзный, Колибактериофаг, Протейный, Пиобактериофаг, Бактериофаг интести.

ПРОБИОТИКИ

Примеры: Лактобактерин; Ацилакт; Бифидумбактерин; Колибактерин; Бификол.

КУРС «ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

РАЗДЕЛ: «ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ»

БАКТЕРИИ – ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

КЛАССИФИКАЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ (СХЕМА КАУФМАНА-УАЙТА)

Серогруппа, серовар, вид	О-антиген	Н-антиген	
		Фаза 1	Фаза 2
Серогруппа 2 (A) • S. Paratyphi A	<u>1</u> , 2, 12	a	(1, 5)
Серогруппа 4 (B) • S. Paratyphi B (S. Schottmuelleri) • S. Derby • S. Agona • S. Typhimurium	<u>1</u> , 4(5), 12 1, 4(5), 12 1, 4(5), 12 <u>1</u> , 4(5), 12	b f, g f, g, s i	1, 2 1, 2 (1, 2) 1, 2
Серогруппа 6,7 (C1) • S. Paratyphi C • S. Choleraesuis • S. Infantis	6, 7, (Vi) 6, 7 6, 7, <u>14</u>	c c r	1, 5 1, 5 1,5
Серогруппа 9 (D1) • S. Typhi • S. Enteritidis • S. Dublin • S. Moscow • S. Panama	9, 12 (Vi) <u>1</u> , 9, 12 <u>1</u> , 9, 12 (Vi) 9, 12 <u>1</u> , 9, 12	d g, m g, p g, q l, v	– – – – 1,5
Серогруппа 3, 10 (E1) • S. London	3, 10 (<u>15</u>)	l, v	1, 6

Антигены в скобках - антигены, которые редко экспрессируются данным сероваром.

О-РПГА С ПАРНЫМИ СЫВОРОТКАМИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БРЮШНОГО ТИФА

Результаты	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль
Сыворотка 1								
Сыворотка 2								
ВЫВОДЫ: РПГА положительная /отрицательная. Титр антител к О-антигену в первой сыворотке _____. Титр антител к О-антигену во второй сыворотке _____. _____ -кратное увеличение титра антител во второй сыворотке подтверждает/не подтверждает диагноз _____.								

Vi-РПГА С ПАРНЫМИ СЫВОРОТКАМИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО БРЮШНОТИФОЗНОГО НОСИТЕЛЬСТВА

Результаты	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль
Сыворотка пациента								
ВЫВОДЫ: РПГА положительная /отрицательная. Титр антител к Vi-антигену _____. подтверждает/не подтверждает диагноз _____.								

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ БОЛЬНОГО ПРИ БРЮШНОМ ТИФЕ (ПАРАТИФАХ)

Материал для исследования – кровь больного.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – брюшной тиф (?).

День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1	Посев крови больного в соотношении 1:10 на 10% желчный бульон для накопления.	
2		
3		
4		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: _____ _____ _____ _____		

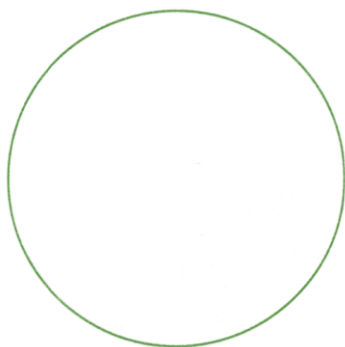
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РВОТНЫХ МАСС БОЛЬНОГО ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЕ

Материал для исследования – рвотные массы больного.

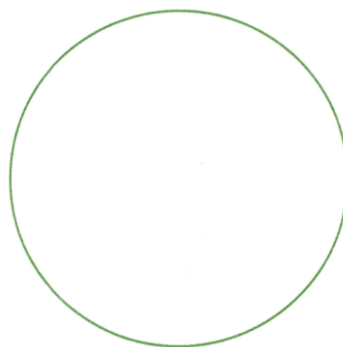
Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – сальмонеллез (?)

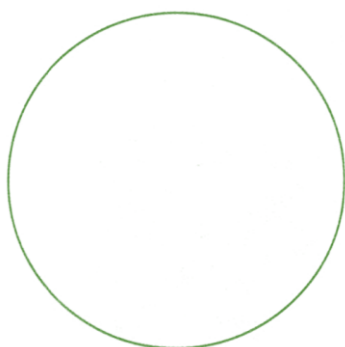
День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1		
2		
3		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: _____ _____ _____ _____		



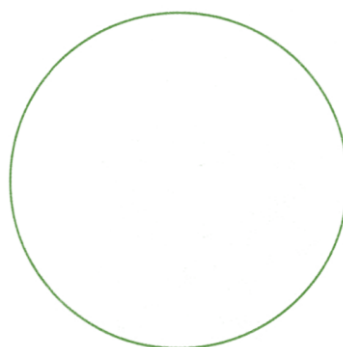
Окраска: _____



Окраска: _____



Окраска: _____



Окраска: _____

(Подпись преподавателя)

БАКТЕРИИ – ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕКАЛИЙ (КОПРОКУЛЬТУРЫ) БОЛЬНОГО ПРИ КОЛИЭНТЕРИТЕ

Материал для исследования – фекалии больного.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – колиэнтерит (?)

День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1		
2		
3		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: _____

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕКАЛИЙ (КОПРОКУЛЬТУРЫ)
БОЛЬНОГО ПРИ ШИГЕЛЛЕЗЕ
(БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДИЗЕНТЕРИИ)

Материал для исследования – фекалии больного.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – дизентерия (?)

День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1		
2		
3		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: _____

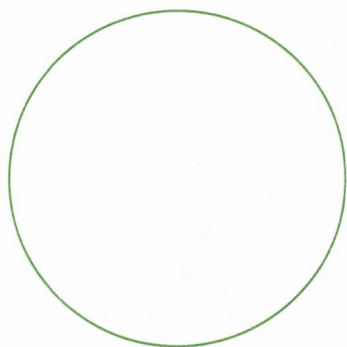
БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Название бактерий	Среда Клиглера	Цитрат Симмонса	Среда с лизином
Незасеянные пробирки			
<i>Salmonella sp.</i>			
<i>Shigella sp.</i>			
<i>Escherichia sp.</i>			

(Подпись преподавателя)

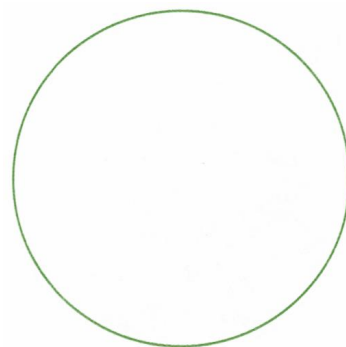
БАКТЕРИИ – ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Mycobacterium tuberculosis
(в мокроте)



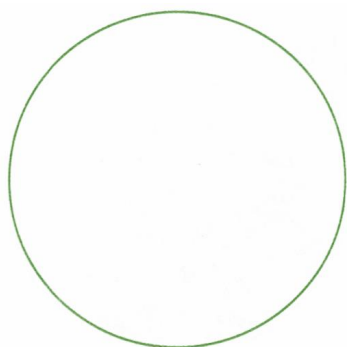
Окраска: _____

Mycobacterium bovis
(чистая культура)



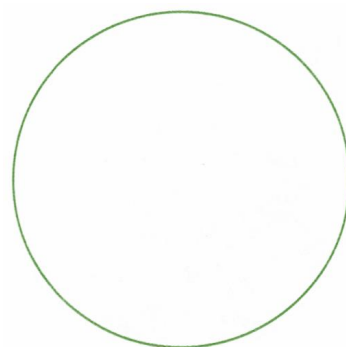
Окраска: _____

Mycobacterium tuberculosis
(cord-фактор)



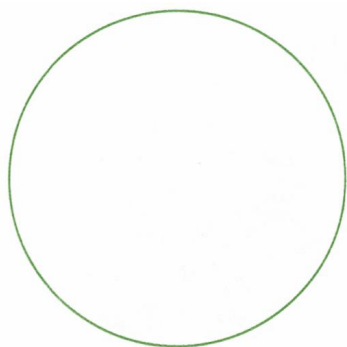
Окраска: _____

Bordetella pertussis
(чистая культура)



Окраска: _____

Corynebacterium diphtheriae
(чистая культура)

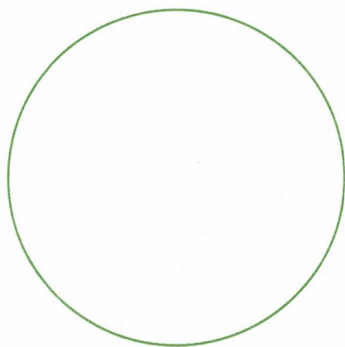


Окраска: _____

(Подпись преподавателя)

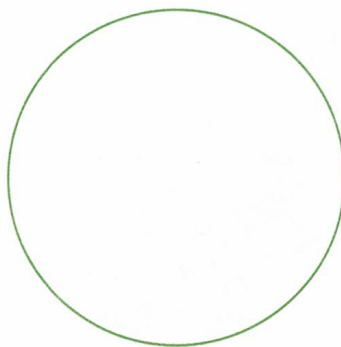
ПАТОГЕННЫЕ КОККИ (СТАФИЛОКОККИ, СТРЕПТОКОККИ, НЕЙССЕРИИ)

Streptococcus pneumoniae
(в органах)



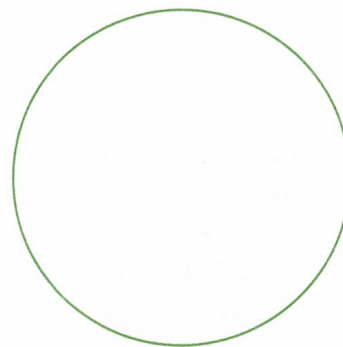
Окраска: _____

Streptococcus pyogenes
(чистая культура)



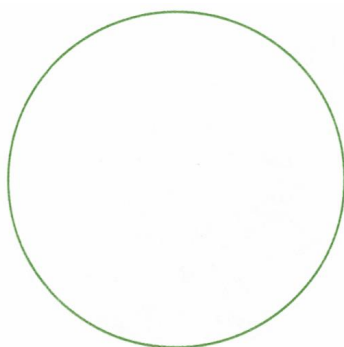
Окраска: _____

Staphylococcus aureus
(в гное)



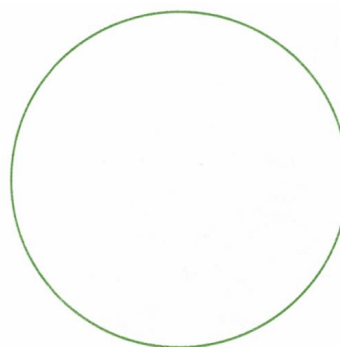
Окраска: _____

Neisseria gonorrhoeae
(в гное)



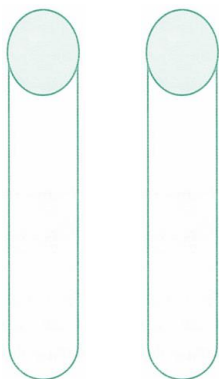
Окраска: _____

Neisseria meningitidis
(чистая культура)

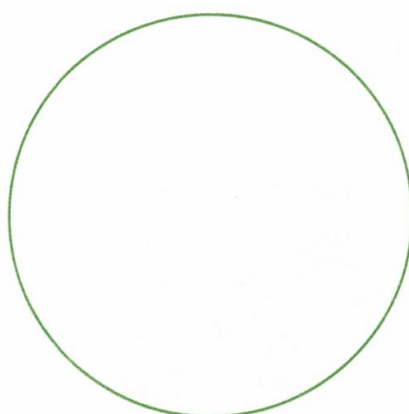


Окраска: _____

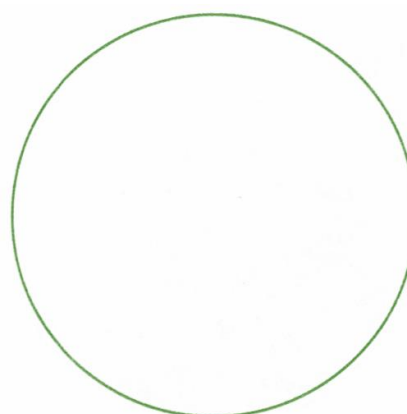
ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ СТАФИЛОКОККОВ



Плазмокоагулаза



**Рост на
5% кровяном агаре**



**Рост на ЖСА
(лецитовителлаза)**

ИССЛЕДОВАНИЯ ГНОЯ

Материал для исследования – отделяемое по дренажу.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – послеоперационное нагноение.

День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1	1) Приготовление мазка из исследуемого материала и окраска по Граму (бактериоскопическое исследование). 2) Посев исследуемого материала на желточно-солевой и 5% кровяной агар.	
2	1) Микроскопия колоний (окраска по Граму). 2) Пересев на скошенный МПА для накопления чистой культуры.	
3	1) Приготовление мазка и окраска фуксином (для определения степени чистоты выделенной культуры). 2) Посев на цитратную кроличью плазму и среду Гисса с маннитом (под вазелиновым маслом для создания анаэробных условий). 3) Фаготипирование культуры типовыми стафилококковыми бактериофагами _____ 4) Определение чувствительности бактерий к антибиотикам.	• Доксициклин _____ мм • _____ мм • _____ мм • _____ мм • _____ мм
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: _____ _____ _____ _____		

(Подпись преподавателя)

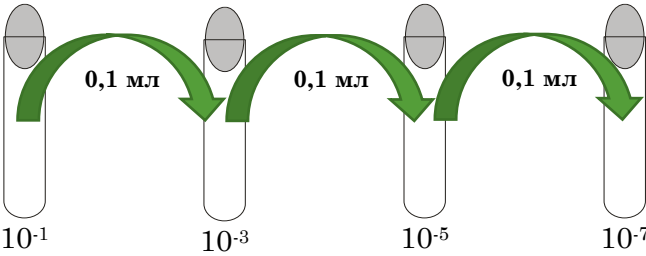
РАЗДЕЛ: «КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОКРОТЫ

Материал для исследования – мокрота.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – пневмония (?).

День	Ход исследования	Результат исследования										
1	1) Приготовление серийных разведений мокроты в стерильном физ. растворе:	<table><tr><td>Физ. р-р, мл</td><td>9,0</td><td>9,9</td><td>9,9</td><td>9,9</td></tr><tr><td>Материал, мл</td><td>1,0</td><td>0,1</td><td>0,1</td><td>0,1</td></tr></table> 	Физ. р-р, мл	9,0	9,9	9,9	9,9	Материал, мл	1,0	0,1	0,1	0,1
	Физ. р-р, мл	9,0	9,9	9,9	9,9							
	Материал, мл	1,0	0,1	0,1	0,1							
2) Посев газом по 0,1 мл мокроты из разведения 10 ⁻⁵ на ЖСА и 5% кровяной агар, из разведения 10 ⁻⁷ на 5% кровяной агар.												
2	1) Микроскопия колоний (окраска по Граму). 2) Пересев на скошенный МПА.											
3	Определение чувствительности бактерий к антибиотикам	• _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм										

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Из мокроты больного выделены бактерии вида _____

в количестве _____ КОЕ/мл, что **подтверждает/не подтверждает** этиологическую роль выделенных бактерий в развитии заболевания.

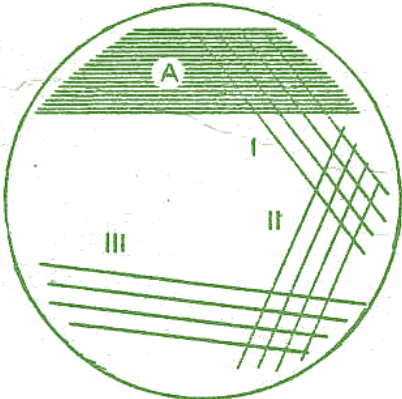
Выделенные бактерии чувствительны к _____, устойчивы к _____.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

Материал для исследования – моча.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – острый пиелонефрит (?)

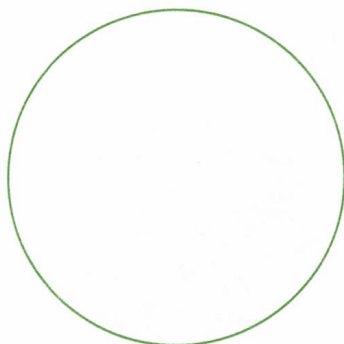
День	Ход исследования	Результат исследования
1	Посев мочи по Голду. 	
2	1) Микроскопия колоний (окраска по Граму). 2) Пересев на скошенный МПА.	
3	Определение чувствительности бактерий к антибиотикам.	• _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм • _____ - ____ мм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Из мочи больного выделены _____ бактерии. Степень бактериурии - _____ КОЕ/мл, что **подтверждает/не подтверждает** этиологическую роль выделенных бактерий в развитии заболевания. Выделенные бактерии чувствительны к _____, устойчивы к _____.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ БАКТЕРИУРИИ

Количество колоний в секторах на МПА				Среднее кол-во бактерий, КОЕ/мл мочи
Сектор А	Сектор 1	Сектор 2	Сектор 3	
1-6	—	—	—	<1000
8-20	—	—	—	3 000
20-30	—	—	—	5 000
30-60	—	—	—	10 000
70-80	—	—	—	50 000
100-150	6-10	—	—	100 000
>200	20-30	—	—	500 000
>200	40-60	—	—	1 000 000 (10 ⁶)
>200	100-140	10-20	—	5 000 000 (5x10 ⁶)
>200	>200	30-40	—	10 000 000 (10 ⁷)
>200	>200	60-80	1-8	более 100 000 000 (10 ⁸)

Pseudomonas aeruginosa
(чистая культура)



Окраска: _____

(Подпись преподавателя)

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ДОСТАВКА ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА АНАЭРОБНУЮ ИНФЕКЦИЮ

1) Исследуемый материал:

- Исследуют перитонеальную и синовиальную жидкости, гной из абсцессов и закрытых полостей, материал из глубоких отделов свища, фрагменты костной и мышечной тканей и т.д.
- При наличии клинических признаков анаэробной инфекции **бактериологическое исследование крови проводят обязательно!**
- Не стоит исследовать на анаэробы: мокроту, полученную при откашливании или аспирации через назотрахеальный катетер, материал, полученный при бронхоскопии, мазки с поверхности ран, мочу, полученную при естественном мочеиспускании.

2) Взятие материала:

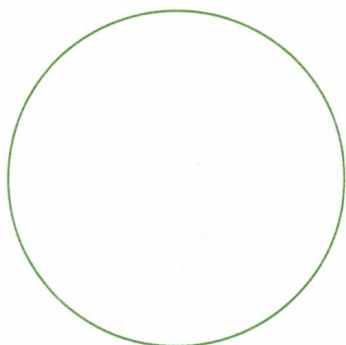
- Должно проводиться при наличии признаков анаэробной инфекции до начала антибиотикотерапии до или во время вскрытия/дренирования очага.
- Необходимо минимизировать контакт образца с кислородом.
- Исследуемый материал необходимо забирать непосредственно из гнойного очага инфекции (не с поверхности кожи!), соблюдая при этом правила асептики, стараясь не контаминировать биоматериал посторонней микрофлорой.
- Кровь для посева берут асептически из области локтевой вены на высоте лихорадки, трехкратно, с интервалом 30 минут. Первичный посев крови производят в коммерческие флаконы для гемокультивирования (для анаэробов).
- Взятие большого количества биоматериала повышает вероятность обнаружения облигатных анаэробов.
- Одновременно со взятием биоматериала для бактериологического исследования необходимо проведение микроскопии для ориентировочного диагноза.

3) Хранение и доставка материала:

- Хранить и транспортировать взятый биоматериал следует **при комнатной температуре**.
- Исследуемый материал **помещают в анаэробную транспортную среду** (например, тиогликолевую, из которой предварительно удален кислород, а на поверхность среды наложен стерильный глицерин, или в коммерческие среды для транспортировки).
- В отдельных случаях при отсутствии специальных транспортных сред допускается экстренная транспортировка биоматериала для исследования на анаэробную инфекцию отделяемого, набранного в стерильный шприц, игла которого воткнута в резиновую пробку.
- Максимальное время для транспортировки, от взятия биоматериала до посева на питательные среды и создания бескислородной атмосферы, **не должно превышать 2 часа**. Часто инфекция носит смешанный аэробно-анаэробный характер. Задержка доставки биоматериала более, чем на 2 часа, может привести к вытеснению облигатных анаэробов факультативно-анаэробными бактериями, что приведет к ложноотрицательному результату исследования.
- В случае невозможности доставки в микробиологическую лабораторию **флаконы с посевами крови хранятся при комнатной температуре не более 24 часов!**

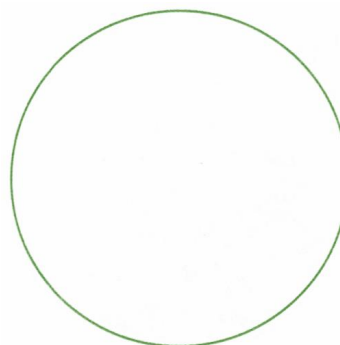
ВОЗБУДИТЕЛИ АНАЭРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Clostridium botulinum
(чистая культура)



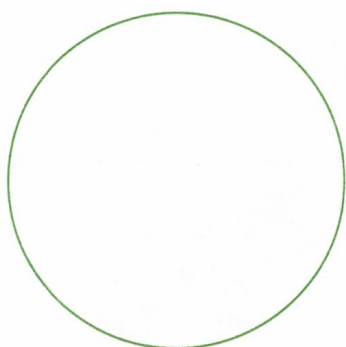
Окраска: _____

Clostridium tetani
(чистая культура)



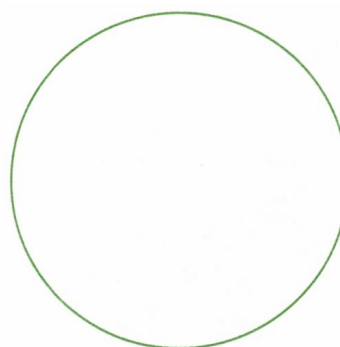
Окраска: _____

Peptostreptococcus anaerobius
(чистая культура)



Окраска: _____

Clostridium perfringens
(в органах)



Окраска: _____

Тесты для идентификации *Clostridium perfringens*

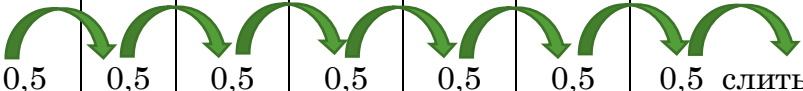


**Рост на среде
Вильсона-Блера**



**Створаживание
молока**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА С ПОМОЩЬЮ РПГА (РОНГА)

Ингредиенты	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль антигена
Изотонический р-р, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемый материал (промывные воды желудка, разведение 1:5), мл								—
Антителный эритроцитарный диагностикум соответствующего серотипа, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубация при комнатной температуре								
Результат (+/-):								
С поливалентным диагностикумом АВЕ								
С диагностикумом А								
С диагностикумом В								
С диагностикумом Е								
ВЫВОДЫ: Реакция пассивной гемагглютинации положительная с _____.								

(Подпись преподавателя)

РАЗДЕЛ: «ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ (продолжение)»

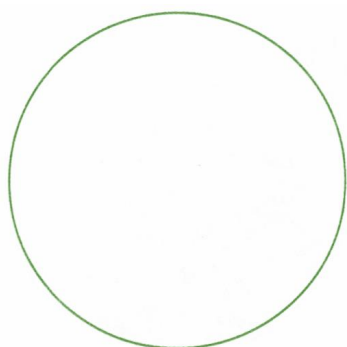
ПАТОГЕННЫЕ СПИРОХЕТЫ

Leptospira interrogans

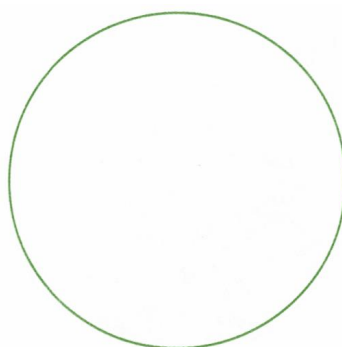
Treponema pallidum

Borrelia recurrentis

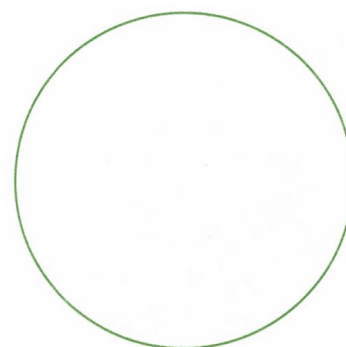
(в крови)



Окраска:

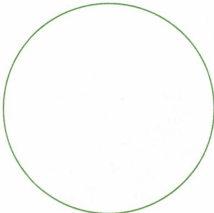
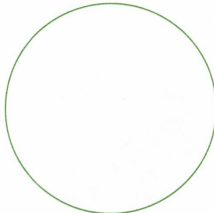


Окраска:



Окраска:

РЕАКЦИЯ МИКРОПРЕЦИПИТАЦИИ С КАРДИОЛИПИИНОВЫМ АНТИГЕНОМ

	
Кардиолипиновый антиген + исследуемая сыворотка	Физ. раствор + исследуемая сыворотка

ВЫВОДЫ: Реакция положительная/отрицательная.

РПГА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

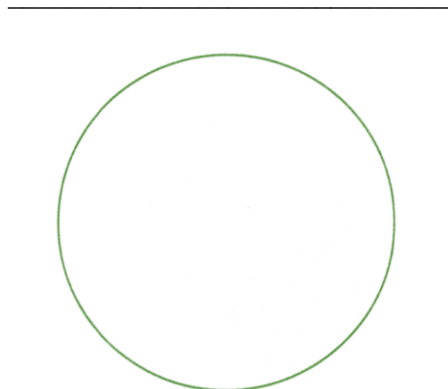
Ингредиенты	1	2	3	4	5	6	Контроль антигена
Сыворотка пациента в разведении	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	—
Эритроцитарный трепонемный диагностикум, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0
Результаты:							

ВЫВОДЫ: РПГА положительная/отрицательная.

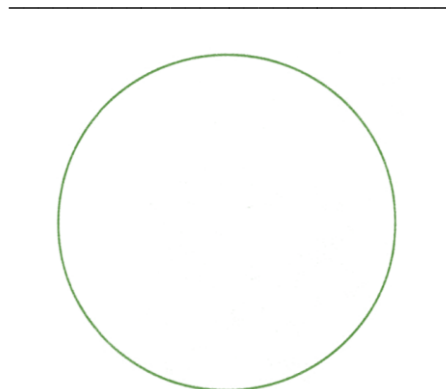
Титр антител к бледным трепонемам _____, что **подтверждает/не подтверждает** диагноз сифилиса. Диагностический титр 1:8 – 1:16)

(Подпись преподавателя)

ПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЕТЕЙ



Окраска: _____



Окраска: _____

(Подпись преподавателя)

РАЗДЕЛ: «ЧАСТНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ»

ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

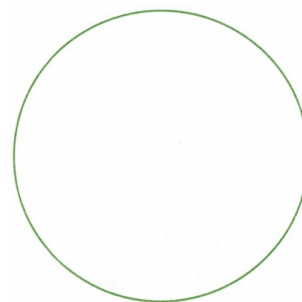
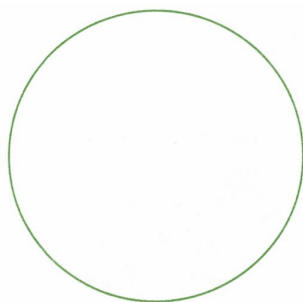
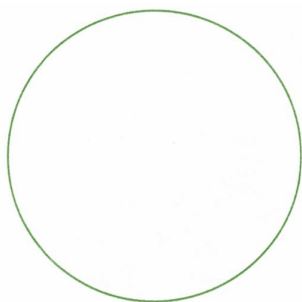
РЕАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РБН) В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АДЕНОВИРУСА

							
Аденовирус + Сыв. 3	Аденовирус + Сыв. 4	Аденовирус + Сыв. 7	Контроли:				
			Культ. клеток	Вируса	Сыв.3	Сыв.4	Сыв.7
ВЫВОД:							

Реакция
гемадсорбции

ЦПД аденовирусов
(внутриядерные включения)

ЦПД вирусов бешенства
(тельца Бабеша-Негри)



РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РГА) ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВИРУСА ГРИППА В АЛЛАНТОИСНОЙ ЖИДКОСТИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Ингредиенты	Разведения вирусосодержащего материала					Контроль эритроцитов
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Изотонический р-р хлорида натрия, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Аллантоисная жидкость (вирусосодержащий материал), мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
1% суспензия эритроцитов, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Перемешать, инкубировать при комнатной температуре в течение 30-60 мин.</i>						
Результаты:						

ВЫВОДЫ: РГА *положительная/отрицательная*. В аллантоисной жидкости *обнаружен/не обнаружен* вирус, обладающий гемагглютинирующей способностью. Титр вируса _____.

РЕЗУЛЬТАТЫ РСК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЕРОТИПА ВИРУСА ГРИППА

Результаты:	Разведения сыворотки						Контроли				
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Эритр.	Компл.	Гем. Системы	Сыв. А	Сыв. В
Сыворотка против вируса гриппа А											
Сыворотка против вируса гриппа В											
ВЫВОДЫ: РСК положительная с сывороткой _____ до титра _____, следовательно идентифицирован серотип вируса гриппа _____.											

Условные обозначения: «+» – наличие гемолиза (РСК «-»),
«-» – отсутствие гемолиза (РСК «+»).

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РТГА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДТИПА ВИРУСА ГРИППА

Разведения вируса	1	2	3	4	5	Контроли		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	вируса	сывороток	эритр.
Изотонический р-р NaCl, мл	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0
Исследуемый вирус 1:10, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—
Первый ряд: Сыворотка к вирусу H1N1 1:10, мл						—	0,5	—
Второй ряд: Сыворотка к вирусу H3N2 1:10, мл						—	0,5	—
1% суспензия эритроцитов, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Результаты:								
С сыв. к вирусу гриппа H1N1								
С сыв. к вирусу гриппа H3N2								
ВЫВОДЫ: РТГА положительная с сывороткой к подтипу вируса гриппа _____ до титра _____.								

Условные обозначения: «+» – наличие гемагглютинации (РТГА «-»),
«-» – отсутствие гемагглютинации (РТГА «+»).

РЕЗУЛЬТАТЫ РТГА С ПАРНЫМИ СЫВОРОТКАМИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА

Результаты:	Разведения сыворотки							Контроли				
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Вируса H1N1	Вируса H3N2	Эритроц.	Сыв. 1	Сыв. 2
Диагностикум (H1N1)												
Сыв. 1												
Сыв. 2												
Диагностикум (H3N2)												
Сыв. 1												
Сыв. 2												

ВЫВОДЫ: РТГА положительная с диагностикумом _____.
Титр антител в сыворотке 1 _____, в сыворотке 2 _____; _____ - кратное нарастание титра антител во второй сыворотке **позволяет/не позволяет** подтвердить диагноз гриппа. Грипп вызван вирусом _____.

Условные обозначения:

«+» – наличие гемагглютинации (РТГА «-»), «-» – отсутствие гемагглютинации (РТГА «+»).

ИССЛЕДОВАНИЯ СМЫВА ИЗ НОСОГЛОТКИ БОЛЬНОГО ПРИ ГРИППЕ

Материал для исследования – смыв из носоглотки.

Цель исследования – выделение и идентификация возбудителя.

Предварительный клинический диагноз – грипп (?)

День	Ход исследования	Результат исследования/ промежуточные выводы
1	Заражение исследуемым материалом 7-дневных куриных эмбрионов. Инкубирование при температуре 37°C в течение 48 часов.	
2	1. Вскрытие куриных эмбрионов, взятие аллантоисной жидкости стерильным шприцом в асептических условиях. 2. Постановка РГА для индикации вируса. 3. Постановка РСК для определения серотипа вируса гриппа. 4. Постановка РТГА для определения подтипа вируса гриппа.	
Через 2-3 недели	Исследование парных сывороток больного в РТГА.	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ: Из носоглоточного смыва выделен вирус гриппа типа _____ подтип _____. Грипп вызван вирусом _____. При серологическом исследовании парных сывороток обнаружено _____.

(Подпись преподавателя)

ВОЗБУДИТЕЛИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ГЕПАТИТОВ

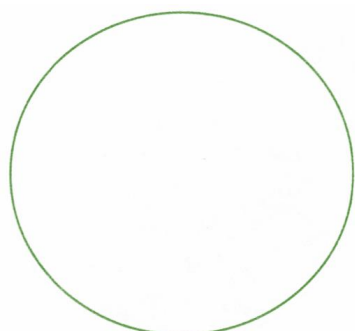
РЕАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РБН) В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛИОВИРУСА

							
Полиовирус + сыв. 1	Полиовирус + сыв. 2	Полиовирус + сыв. 3	Контроли:				
			Культ. клеток	Вируса	Сыв.1	Сыв.2	Сыв.3
ВЫВОД:							

РБН В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК С ПАРНЫМИ СЫВОРОТКАМИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМИЕЛИТА

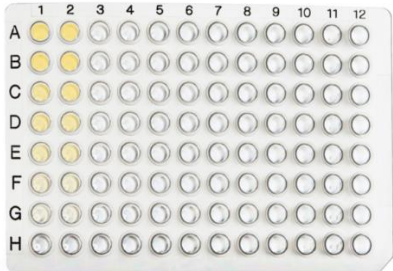
Первая сыворотка					Вторая сыворотка					Контроли:			
													
1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	Культ. клеток	Вируса	Сыв. 1	Сыв. 2
ВЫВОД:													

ЦПД вирусов полиомиелита
(гибель и деструкция монослоя)



(Подпись преподавателя)

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА

Ингредиенты	Опыт	«Положительный контроль»						«Отриц. контроль»
	A1 A2	B1 B2	C1 C2	D1 D2	E1 E2	F1 F2	G1 G2	H1 H2
1. Буфер А (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 10 мин.</i>								
2. Сыворотка больного (мл)	0,1*	—	—	—	—	—	—	—
3. Стандартный антиген 100 мкг/мл (мл)	—							—
4. Отрицательный контроль (мл)	—	—	—	—	—	—	—	0,1
<i>Инкубация при 37°C в течение 20 мин., отмывка</i> <i>*Добавить 0,1 мл, аккуратно перемешать и слить 0,1 мл (во всех лунках должен быть одинаковый объем жидкостей)</i>								
5. Конъюгат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при 37°C в течение 20 мин., отмывка</i>								
6. Субстрат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 20 мин.</i>								
7. «Стоп-реагент» (50% H ₂ SO ₄) (мл)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
 ➔  Фотометр вертикального сканирования измеряет оптическую плотность содержимого лунок планшета.								
Результаты (+/—):								
ВЫВОДЫ: ИФА положительная/отрицательная Концентрация HBs антигена в исследуемой сыворотке _____ мкг/мл								

(Подпись преподавателя)