

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования "Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра микробиологии имени доцента Б.М.Зельмановича

**Микробиология, вирусология, иммунология**

**Сборник методических указаний для обучающихся к внеаудиторной (самостоятельной) работе по  
направлению подготовки 34.03.01 Сестринское дело (очная форма обучения)**

Красноярск

2022

Микробиология, вирусология, иммунология : сборник методических указаний для обучающихся к внеаудиторной (самостоятельной) работе по направлению подготовки 34.03.01 Сестринское дело (очная форма обучения) / сост. В.В. Камшилова, Л.И. Николаева, Н.П. Осипова, О.В. Перьянова, Т.С. Подгрушная, И.Н. Протасова, И.Т. Решетнева, Т.В. Рукосуева, О.Е. Хохлова. - Красноярск : тип. КрасГМУ, 2022.

**Составители:**

к.б.н. В.В. Камшилова  
старший преподаватель Л.И. Николаева  
к.б.н. Н.П. Осипова  
к.б.н., доцент О.В. Перьянова  
ассистент Т.С. Подгрушная  
д.м.н. И.Н. Протасова  
к.м.н. И.Т. Решетнева  
к.б.н. Т.В. Рукосуева  
д.б.н., доцент О.Е. Хохлова

Сборник методических указаний предназначен для внеаудиторной работы обучающихся. Составлен в соответствии с ФГОС ВО 2017 по направлению подготовки 34.03.01 Сестринское дело (очная форма обучения), рабочей программой дисциплины (2022 г.) и СТО СМК 8.3.12-21. Выпуск 5.

Рекомендован к изданию по решению ЦКМС (Протокол № 10 от 26 мая 2022 г.)

© ФГБОУ ВО КрасГМУ  
им.проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Минздрава России, 2022

**1. Тема № 1.** Микроскопический метод исследования. Морфология бактерий. Простые и сложные методы окраски. Метод Грама. Структурные элементы микробной клетки.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): В связи с малыми размерами микроорганизмов (не более 2-30 мкм) изучение их морфологии возможно только с помощью специальных оптических приборов – микроскопов. Они обладают высокой разрешающей способностью и дают значительное увеличение. В настоящее время в практике микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (темнопольный, фазово-контрастный). Для изучения морфологии бактерий можно использовать прижизненные (нативные) препараты и наблюдать бактерии в неокрашенном состоянии. Чаще для изучения морфологии готовят фиксированные препараты с их окраской простыми и сложными методами. Классическим методом окраски в микробиологической практике является метод Грама, имеющий дифференциально-диагностическое значение. Микроорганизмы представляют собой сложные биологические системы: структура и функции бактериальной клетки взаимосвязаны и динамичны, т.е. способны изменяться. Это усложняет дифференциацию и идентификацию бактерий, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний и патологических процессов. Важнейшей задачей в этом аспекте является совершенствование методов и аппаратуры для изучения ультраструктуры бактерий.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфобиологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Классификация царства прокариот.** Царство *Procaryotae*.

### **Морфология бактерий: форма, величина, взаимное расположение.**

Бактерии имеют разнообразную форму и довольно сложную структуру, определяющую их многообразие их функциональной деятельности. Для бактерий характерны четыре основные формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная), извитая и нитевидная. Бактерии шаровидной формы – кокки, в зависимости от плоскости деления и расположения относительно друг друга отдельных особей, подразделяются на микрококки (отдельно лежащие кокки), стрептококки (цепочки кокков, стафилококки (имеющие вид виноградных гроздьев), тетракокки (образование из четырех кокков и сарцины (делятся в трех перпендикулярных плоскостях, в мазках располагаются «этажами» в форме «пакетов» по 8, 16, 32.).

Палочковидные бактерии располагаются в виде единичных клеток, дипло - или стрептобактерий.

Извитые формы бактерий - вибрионы и спириллы, а также спирохеты. Вибрионы имеют вид слегка изогнутых палочек, спириллы - извитую форму с несколькими спиральными завитками. Размеры бактерий колеблются от 0,1 до 10 мкм.

### **Простые и сложные методы окраски; их информативность.**

Простая окраска позволяет быстро и хорошо ознакомиться с общей морфологией микробов, ввиду чего этот способ применяется в лабораториях наиболее часто. При простой окраске обычно употребляется только одна краска, чаще всего красная – фуксин, или синяя – метиленовая синяя.

Фуксин красит быстрее (1 – 2 мин.), интенсивнее и окрашивает одинаково все виды бактерий.

Метиленовая синяя красит медленнее (3 - 5 мин.), менее ярко, но препараты получаются более яркими. Кроме того, она дает окраску различной интенсивности у разных видов бактерий.

Сущность данных методов окраски заключается в нанесении на фиксированный препарат одного вида красителя, например фуксином водным (1 - 2 мин) или метиленовым синим (3 - 5 мин), после чего промыть водой, высушить и микроскопировать.

Сложные, или дифференциальные, способы окраски бактерий основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для детального изучения структуры клетки, а также для характеристики и дифференциации данного микроба от других. Таким образом, сложные способы окраски микробов являются необходимым диагностическим методом в микробиологической практике.

В данных методах окраски применяют последовательное нанесение на препарат определенных красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протравы, спирты, кислоту и др. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других. Чаще других используется метод Грама.

*Метод Грама (модификация Синева):*

1. На препарат положить бумажку, пропитанную раствором генцианвиолета (модификация Синева, смочить водой, красить 2 мин; слить;
2. Налить раствор Люголя - 1 мин, слить;
3. Обесцветить 96° спиртом до отхождения струек краски;
4. Промыть водой
5. Докрасить раствором фуксина 1-2 мин
6. Высушить фильтровальной бумагой.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена:

- На фиксированный препарат нанести карболовый раствор фуксина через полоску фильтровальной бумаги и подогреть до появления паров в течение 3-5 минут.
- Снять бумагу, промыть мазок водой.
- Нанести 5% раствор серной кислоты на 1-2 минуты для обесцвечивания.
- Промыть водой.
- Докрасить мазок водным раствором метиленового синего в течение 3-5 минут.
- Промыть водой, высушить и микроскопировать.

Кислотоустойчивость обусловлена наличием в клеточной стенке и цитоплазме бактерий повышенного количества липидов, воска и оксикислот, в частности, миколовой кислоты. Раствор карболовой кислоты разрыхляет клеточную стенку и тем самым повышает ее тинкториальные свойства, а высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливают реакцию взаимодействия красителя с бактериальными клетками, которые окрашиваются при этом в красный цвет. При обработке препарата серной кислотой нестойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые бактерии остаются окрашенными фуксином в красный цвет.

**Типы микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (темнопольная, фазово-контрастная).**

Для микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, электронный) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный, темнопольный). В микробиологической практике применяют микроскопы отечественных марок: МБР-1, МБИ-1 МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, «Биолам» Р-1 и др. Они предназначены для изучения формы, структуры размеров и других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2-0,3 мкм. Предельная разрешающая способность иммерсионного микроскопа 0,2 мкм. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом 90 и окуляром 10 составляет:  $90 \times 10 = 900$ .

**Принцип темнопольной микроскопии:** темнопольная микроскопия основана на способности микроорганизмов сильно рассеивать свет. Для темнопольной микроскопии пользуются обычными объективами и специальными темнопольными конденсорами, центральная часть которых затемнена, так что прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают. Объект освещается косыми боковыми лучами, и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате.

При темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне. При этом могут быть обнаружены мельчайшие микроорганизмы, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Однако темнопольная микроскопия позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучить его внутреннюю структуру. Для препаратов применяют более тонкие предметные и покровные стекла

**Принцип фазово-контрастной микроскопии:** большинство препаратов живых микробов плохо видны, так как коэффициент преломления света их близок к коэффициенту преломления окружающей среды. Проходя через

объект, световая волна, выходя из более плотной среды, несколько запаздывает по фазе относительно соседних волн. Но органы зрения человека выявляют лишь различие по длине волны и амплитуде, а не по фазе. Фазово-контрастное устройство светового микроскопа переводит фазовые изменения в амплитудные, в результате живые прозрачные объекты становятся контрастными и хорошо видны глазом. В России выпускают устройство КФ - 4 для позитивного фазового контраста. Фазово-контрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия вирусов на клетки. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики - так называемые инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор сверху. За изобретение фазово-контрастной микроскопии его автор - голландский физик Цернике был удостоен Нобелевской премии.

**Принцип люминесцентной микроскопии:** люминесценция - явление, когда некоторые вещества под влиянием света испускают лучи обычно большей длины волны. При использовании УФ - лучей (= 400нм) возникает люминесценция в световой гамме видимого спектра. Поскольку большинство микроорганизмов не обладают собственной люминесценцией, существует несколько способов их обработки для наблюдения в люминесцентном микроскопе. Прежде всего, это флюорохромирование - окрашивание сильно разведенными (до нескольких микрограмм /мл) растворами флюоресцирующих красителей (флюорохромом). Этот метод используется для бактериоскопического исследования возбудителей инфекций: туберкулеза (ауромин, родамин), дифтерии (кориофосфин), включений в клетках, образуемых некоторыми вирусами (примулин). Люминесцентная микроскопия применяется также для цитохимического изучения живых и фиксированных микроорганизмов: некоторые флюорохромы избирательно связываются с полимерами клетки (акридиновый оранжевый, связываясь с ДНК, флюоресцирует зеленым, а с РНК красным цветом). В реакции иммунофлюоресценции с помощью антител, меченных флюорохромами (ФИТЦ и др.), выявляются антигены микроорганизмов или антитела в сыворотке больных. В качестве источника света применяют ртутно-кварцевые лампы. Вся оптика микроскопа и предметные стекла должны быть изготовлены из кварцевого стекла, пропускающего ультрафиолетовые лучи.

**Принцип электронной микроскопии:** в электронном микроскопе вместо света для построения изображения используют поток электронов в глубоком вакууме. В качестве «линз», фокусирующих электроны, служит электромагнитное поле, создаваемое электромагнитными катушками. Изображение в электронном микроскопе наблюдают на флюоресцирующем экране и фотографируют. Объекты при электронной микроскопии находятся в глубоком вакууме, поэтому подвергаются фиксации и специальной обработке. Кроме того, они должны быть очень тонкими, так как поток электронов сильно поглощается объектом. В связи с этим в качестве объектов используют ультратонкие срезы толщиной 20 - 50 нм, помещенные на тончайшие пленки. Разрешающая способность электронных микроскопов значительно выше, чем световых, и достигает 1.5 А (0.15 нм), что позволяет получить полезное увеличение в миллионы раз. Наиболее широко применяется просвечивающая (трансмиссивная) и сканирующая электронная микроскопия.

Просвечивающая электронная микроскопия применяется для изучения ультра тонких срезов микробов, тканей, а также строения мелких объектов (вирусов, жгутикоз., контрастированных фосфорно - вольфрамовой кислотой, уранилацетатом, напылением металлов в вакууме.

Сканирующая электронная микроскопия применяется для изучения поверхности объектов. Увеличить разрешение можно путем использования коротких волн - например, пучка электронов, длина волны которых составляет 1/100000длины света. Поэтому при электронной микроскопии можно рассматривать объекты, размер которых в 50 - 100 раз меньше видимых в обыкновенном микроскопе.

Таким образом, электронный микроскоп позволяет получить увеличение в 200 000 раз и рассмотреть самые нежные структуры. Источник электронов - катодная лампа, настройка пучка проводится электромагнитами, изображение получаем на светящемся экране. Разрешающая способность микроскопа ограничена длиной волны используемого света, увеличить разрешение можно путем использования коротких волн - например, пучка электронов, длина волны которых составляет 1/100000длины света. Поэтому при электронной микроскопии можно рассматривать объекты, размер которых в 50 - 100 раз меньше видимых в обыкновенном микроскопе.

### **Правила работы с иммерсионной системой.**

При исследовании микробов применяется иммерсионный или погруженный в масло объектив микроскопа. Его преимущество перед сухими объективами состоит в том, что между стеклом и линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата - масло - стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем и достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этого обычно пользуются кедровым маслом, показатель преломления которого почти равен показателю преломления стекла. Иммерсионный объектив, называемый также «масляной» системой, требует особенно осторожного обращения. Так как фронтальная линза имеет очень короткое фокусное расстояние до исследуемого объекта, опускать объектив нужно крайне осторожно, чтобы не раздавить стекла препарата, что связано с серьезной порчей линзы. Погружать иммерсионный объектив в капле масла на

стекле нужно очень осторожно, смотря сбоку. После погружения объектива в каплю, масла вращением сначала макро-, а затем и микрометрического винта устанавливают ясное изображение.

**Понятия: «эукариоты», «прокариоты».** К эукариотам принадлежат клетки растений, животных, грибов, простейших. У них развита эндоплазматическая сеть, ядро, чаще диплоидный набор генов, имеются митохондрии, хлоропласты, пластинчатый комплекс Гольджи.

К прокариотам относятся собственно бактерии, акциномицеты, спирохеты, риккетсии, хламидии, микоплазмы. Вместо ядра они имеют нуклеоид, у которого нет ядерной мембраны. Также содержат гаплоидный набор генов. У них не развита эндоплазматическая сеть, отсутствуют митохондрии, хлоропласты, сетчатый аппарат Гольджи. Константа седиментации рибосом 70S, у эукариот 80S. Функцию митохондрий у прокариотов выполняют мезосомы.

**Ультраструктура бактериальной клетки и методы ее изучения.** Бактериальная клетка состоит из трехслойной оболочки и цитоплазмы, в которой находятся структурные элементы клетки: нуклеоид, рибосомы, мезосомы, включения, плазмиды. Оболочка бактерий включает слизистый слой, клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. К поверхностным структурам клетки относят: капсулу, жгутики, ворсинки, клеточную стенку. Для изучения используют микроскопический, цитохимический метод электронной микроскопии (метод ультратонких срезов бактерий в сочетании с контрастированием; замораживание - травление; сканирующая микроскопия, методы радиоавтографии, кристаллографии, иммунохимии и др.)

**Обязательные и необязательные структурные элементы бактериальной клетки.** К обязательным структурным элементам относятся те, без которых бактериальная клетка не может существовать: нуклеоид, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка. Капсула, жгутики, ворсинки, включения и споры являются необязательными структурными элементами.

**Особенности строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий.** Грам (+) бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, Грам (-) - в красный. Отношение бактерий к окраске по Граму определяется их способностью удерживать образовавшийся в процессе окраски комплекс генцианвиолетового с йодом. Это зависит от различий в химическом составе и проницаемости клеточной стенки. Грам (+) и Грам (-) бактерий. У Грам (+) бактерий пептидогликан многослоен, с ним связаны тейхоевые кислоты. У Грам (-) бактерий пептидогликан однослоен, имеется наружная мембрана, в состав которой входят фосфолипиды, липопротеиды, белки и сложный липополисахарид (ЛПС). Всю наружную мембрану пронизывают белки - порины, обеспечивающие диффузию различных соединений. Таким образом, у Грам (+) бактерий создаются оптимальные условия для прочной фиксации красителя и резистентности к обесцвечиванию спиртом. Внутренний слой клеточной стенки является ростовым. Пептидогликан состоит из цепей ацетилгликозидов, ацетилмурамовой кислоты и тетрапептида: - аланина, диаминопимелиновой кислоты (ДАП), лизина, D-аланина. Вместо ДАП могут быть орнитин или диаминомасляная кислота. Пептидогликан Грам (+) бактерий содержит тейхоевые кислоты и М-протеин, аминокислоты у них связаны через пептидный мостик. У Грам (-) бактерий поверх пептидогликана имеется наружная двухслойная мембрана, включающая: фосфолипиды, липопротеиды, белки, липополисахарид, снаружи слой липопротеида, через наружную мембрану проходят выводные каналы из белков, обеспечивающие диффузию химических веществ, являющиеся рецепторами для фагов и бактериоцидов. К липополисахариду Грам (-) бактерий с одной стороны прикреплен липид, а с другой стороны-олигосахариды (галактоза, рамноза). С липополисахаридами (ЛПС) у них связаны патогенные, токсические и антигенные свойства. Образование пептидных связей ингибируется пенициллином. Лизоцим разрывает гликозидные связи между мурамовой кислотой и ацетилглюкозаминном. После обработки бактериальной культуры лизоцимом и пенициллином могут образовываться субклеточные формы (L-Формы, протопласты.)

**L-формы бактерий, протопласты, сферопласты.** Субклеточные формы микроорганизмов- L-формы бактерий. Они частично или полностью лишены клеточной стенки, либо не способны синтезировать ее предшественников, что приводит к изменению морфологии и замедляет процесс деления клеток. L-формы могут содержать вакуоли и гранулы. Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы сохраняют внутренний ростовой слой клеточной стенки, способны к реверсии в исходный вид. Стабильные L-формы не способны к реверсии. Протопласты полностью лишены клеточной стенки, а сферопласты частично имеют дырчатую клеточную стенку, сферическую форму, чувствительны к внешним воздействиям. Жизнеспособность сохраняется в гипертонических растворах сахарозы, хлорида натрия. Не способны к размножению. Клеточную стенку можно обнаружить в результате плазмолиза бактерий в гипертоническом растворе, микроскопированием нативных препаратов в фазово-контрастном микроскопе и с помощью электронной микроскопии

**Капсула бактерий, ее значение и методы выявления.** Капсула представляет собой толстый слизистый слой вокруг бактериальной клетки, чаще полисахаридной природы. У сибиреязвенных бацилл - полипептид. Капсула бактерий имеет фибриллярное строение. Образование ее зависит от среды. Пневмококки и сибиреязвенные бациллы образуют капсулу только в организме человека или животных. Клебсиеллы пневмонии - в организме и на питательных средах. Капсулообразование является защитной функцией патогенных бактерий. В макроорганизме

она защищает их от фагоцитоза, иммуноглобулинов, лекарственных препаратов и др. Способствует проявлению патогенного действия пневмококков, сибиреязвенных бацилл, клебсиелл и др., обуславливает их иммунохимическую специфичность. Капсула содержит много воды. Слабо преломляет свет и слабо воспринимает анилиновые красители, не окрашивается. Ее выявляют приготовлением негативных препаратов по Бурри-Гинсу и по методу Зырянова А.И.

Метод Бурри-Гинса (для создания фона используют профильтрованную разведенную водой 1:10 черную тушь):

1. Готовят тушевой препарат, фиксируют химическим способом. Промывают водой.
1. Окрашивают карболовым фуксином Циля, разведенным 1:3 в течение 1-2 минут. Промывают водой, высушивают.

На черном фоне видны не окрашенные капсулы, внутри которых бактерии красного цвета.

Метод Зырянова:

1. На край обезжиренного предметного стекла наносится капля сыворотки, затем, внося микробный комочек, эмульгируют его.
2. Ребрам шлифованного стекла готовят мазок на 1/3-2/3 стекла.
3. Высушивают на воздухе.
4. Фиксируют в жидкости Никифорова 15-20 минут.
5. Опускают в стаканчик с карболовым фуксином Циля на 5-10 секунд. Промывают. Высушивают на воздухе.

На красном фоне окрашенной сыворотки видны неокрашенные капсулы, внутри которых бактерии красного цвета.

**Органоиды движения бактерий - жгутики. Методы обнаружения и окраски жгутиков.** Жгутики - органоиды движения многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Начинаются из цитоплазматической мембраны и прикрепляются к клетке с помощью базального тельца. Имеют вид спирали или продольных нитей, нередко покрытых белковым чехлом. Белок жгутиков называется флагеллин, относится к сократительным белкам типа миозина.

В зависимости от количества и места расположения жгутиков, бактерии подразделяются на монотрихи - имеющие один жгутик на одном из полюсов клетки Лофотрихи - пучок жгутиков на одном из полюсов клетки. Перетрихи - жгутики расположены по всей поверхности клетки. Монотрихи передвигаются быстрее, чем перетрихи. Бактерии передвигаются беспорядочно или путем направленного хемотаксиса, аэротаксиса, фототаксиса.

Жгутики обнаруживают микроскопированием нативных препаратов по подвижности бактерии. Расположение жгутиков изучают в препаратах, окрашенных по Морозову, Лефлеру, Лейфсону и электронной микроскопией. Принципы окраски жгутиков: петлю с клеточной структурой помещают в дистиллированную воду или 1% раствор хлорида натрия для набухания жгутиков, затем адсорбируют на бактериях танин и окрашивают метиленовой синькой, нейтральротом, или фуксином Циля. При этом толщина жгутиков становится больше разрешающей способности микроскопа, что позволяет их видеть.

**Ворсинки и их структура.** Пили - тонкие полые нити белковой природы длиной 0.3-10 мкм, толщиной Юнм. По функциональному назначению пили, подразделяются на два типа. Пили первого типа, обуславливают адгезию бактерий к определенным клеткам организма хозяина. Их количество достигает от нескольких сотен до нескольких тысяч. Ворсинки 2-ого типа - половые ворсинки. Их 1 -4 на клетку, участвуют в передаче генетического материала от одной клетки к другой при конъюгации бактерий. Участвуют в передаче и распространении лекарственной устойчивости. На половых ворсинках адсорбируются бактериальные вирусы (фаги).

**Цитоплазматическая мембрана, ее структура и функции.** Между пептидогликаном клеточной стенки и цитоплазматической мембраной Грам (-) бактерий находится периплазматическое пространство, в котором локализируются ферменты: фосфатаза, рибонуклеаза 1, пенициллиназа и др. У Грам (+) бактерий сходные ферменты относятся к экзоферментам. ЦПМ, ограничивающая протопласт клетки, 3-х слойная, толщина 7-10 нм, состоит из липопротеинового, фосфолипидного и рибонуклеопротеинового слоев. ЦПМ содержит липидов-15-30%, белков-50-70%, углеводов 2-5% и РНК, у некоторых бактерий обнаружены каротиноиды. Белки ЦПМ включают: структурные белки; пермиазы, участвующие в переносе органических и неорганических веществ; ферменты дыхания; синтеза тейхоевых кислот, пептидогликана, удвоения бактериальных хромосом.

ЦПМ можно обнаружить при явлении плазмолиза у бактерий в результате ее отделения от клеточной стенки. У прокариотов ЦПМ является местом локализации пермиаз и ферментов окислительного фосфорилирования, осмотическим барьером клетки. ЦПМ регулирует транспорт метаболитов и генов, выделение ферментов и токсинов, участвует в репликации ДНК, нуклеоида, делении и синтезе компонентов клеточной стенки, в спорообразовании.

**Цитоплазма и ее структура.** Представляет собой сложную коллоидную систему, заполняет полость, ограниченную ЦПМ. Состоит из органических и неорганических веществ, воды (70-80%). Основные ее компоненты: белки, ферменты, РНК, ДНК, липиды, углеводы. Содержит органеллы: нуклеоид, рибосомы, лизосомы, плазмиды, различные включения. У бацилл в цитоплазме образуются споры.

**Мезосомы, их структура.** Мезосомы образуются путем инвагинации ЦПМ в цитоплазму. Могут иметь пластинчатое строение; везикулярное - в форме пузырьков; трубчатое или смешанное. Могут быть сферической формы или иметь форму петли. Мезосомы могут располагаться на периферии клетки. У грам (-) бактерий мезосомы развиты более слабо, чаще имеют форму петли.

Мезосомы участвуют в делении клетки, спорообразовании, синтезе компонентов клеточной стенки, энергетическом метаболизме.

**Нуклеоид, его структура и функции.** Нуклеоид бактерий не имеет мембраны, т.е. не ограничен от цитоплазмы клетки, не содержит хромосом, гистонов, не делится митозом. В состав нуклеоида, кроме ДНК, входят также РНК и белки. Молекула ДНК имеет замкнутую кольцевую структуру, в развернутом состоянии длиной более 1 мм. Покоящиеся клетки содержат один нуклеоид, перед делением клетки - два, в логарифмической фазе - до четырех и более нуклеоидов.

Плазмиды - внехромосомные наследственные детерминанты, представляют внехромосомную ДНК, имеют кольцевую структуру и кодируют ряд свойств: образование гемолизина, устойчивость к антимикробным препаратам и др.

Нуклеоид является носителем генетической информации клетки. Нуклеоид обнаруживают окраской по Фельгену, реактивом Шиффа. Нуклеоплазма, содержащая ДНК окрашивается в красный цвет.

**Рибосомы, их структура и функции.** Рибосомы содержат рибосомальную РНК, 40-60% белка, имеют сферическую форму, диаметром около 20 нм. С помощью информационной РНК рибосомы образуют полисомы, обычно связанные с ЦПМ. Рибосомы синтезируют белок клетки. Имеют значение в объяснении механизма антибактериального действия некоторых антибиотиков, в возникновении антибиотикоустойчивых форм бактерий. Так, стрептомицин, канамицин, левомицитин и др. избирательно соединяются с определенными молекулами рибосом, что блокирует синтез белка. Мутации в рибосомах приводят к неспособности некоторых антибиотиков соединяться с определенными фрагментами рибосом, в результате возникают антибиотикорезистентные клетки.

### **Внутриплазматические включения, их состав и функции.**

#### Зерна волютина.

Включения могут формироваться в цитоплазме бактерий в процессе их жизнедеятельности. К ним относятся: капли жира, гранулы крахмала, гликогена, гранулы серы, железа, полифосфата. Некоторые из них представляют собой ненужные продукты обмена, другие можно отнести к запасам питательных веществ. Включения жира окрашиваются 0,3% Суданом в оранжево-желтый цвет, гликогенподобные вещества раствором Люголя - в темно-синий цвет. Обнаружены впервые Бабешем и Эрнстом. Содержат полифосфаты. Являются внутриклеточным резервом фосфатов. Волютину присуща метохромазия, т.е. окрашивание в иной цвет, чем цитоплазма.

Зерна волютина окрашиваются простыми методами: по Лефлеру метиленовым синим 10-30 сек. в темно-синий цвет, на фоне голубой цитоплазмы или 1% толуидиновым синим - в красный цвет на фоне голубой цитоплазмы.

Из сложных методов окраски зерен волютина чаще используют метод Нейссера:

Окрашивают фиксированный препарат:

1. Уксуснокислой синькой Нейссера- 1мин. промывают.
2. Раствор Люголя - 30 сек., слить.
3. Везувин или хризоидин-10-15сек., промывают, высушивают.

Зерна волютина темно - синие на фоне светло - коричневой цитоплазмы. Они присущи дифтерийной палочке.

### **Бактериальные эндоспоры.**

Значение спорообразования и условия образования спор. Споры, их строение, функции, форма, размер и положение спор в клетке - споры образуются внутри клетки палочковидными бактериями родов бацилл, клостридий, спорообразующих кокков рода споросарцина.

Спорообразование не является способом размножения бактерий, т.к. бактериальная клетка образует только одну спору. Она служит для сохранения вида. Образование спор у бактерий происходит при неблагоприятных условиях

существования: обеднение питательной среды, изменение ее влажности и рН, старение культуры, при попадании вегетативных клеток в почву, и т. д. Таким образом, спорообразующие бактерии могут существовать в 2-х формах: вегетативной и в форме спор.

Споры представляют собой тельца округлой или овальной формы, располагаются в клетке центрально, субтерминально или терминально. Возбудитель столбняка имеет форму барабанной палочки, т.к. образует шаровидной формы споры на конце клетки, которая больше ее поперечника. У сибирских бацилл спора овальная, располагается в центре клетки и меньше ее поперечника.

1. Споробразование начинается с появления в цитоплазме бактерий уплотненного участка - «спорогенной зоны», содержащей нуклеоид.
2. С обеих сторон клетки происходит вращение внутрь ЦПМ, что обособляет спорогенную зону от остальной цитоплазмы. Спорогенная зона приобретает двойную мембранную оболочку. Образуется проспора.
3. Между наружным и внутренним слоем мембраны споры появляется слой пептидогликана. По строению он несколько отличается от пептидогликана клеточной стенки. С внешней стороны мембраны образуется оболочка споры, состоящая из белков, липидов, гликопротеидов, а вегетативная часть клетки лизируется. Оболочка спор у разных бактерий имеет различное число слоев. На формирование споры требуется 15-20 часов.

Высокая устойчивость спор к воздействию физических и химических факторов, плохая прокрашиваемость их анилиновыми красителями обусловлена содержанием в споре воды и ферменте в химически связанном состоянии, повышенным количеством кальция, наличием дипиколиновой кислоты и др. особенностями их строения и химического их состава. Это затрудняет борьбу со спорообразующими патогенными бактериями.

В благоприятных условиях споры в течении 4-5 час прорастают в вегетативные клетки. При этом в результате увеличения в споре воды происходит активирование ферментов, энергетических и биосинтетических процессов. Разрушается пептидогликан, исчезает дипиколиновая кислота, разрывается оболочка споры и из нее выходит ростовая трубка, которая покрывается клеточной стенкой. Вегетативная клетка начинает делиться.

Споры содержат мало свободной воды и сильно преломляют свет. Неокрашенные эндоспоры живых бактерий при наблюдении в обычный микроскоп имеют черное обрамление и ярко светятся. При простых методах окраски и методе Грама споры не окрашиваются, но видны в виде блестящих образований, расположенных внутри и вне клетки. В основу методов окраски спор положено предварительное воздействие на оболочку для ее разрыхления какого-либо вещества или окраска при подогривании с растворами красителей в большой концентрации.

#### Метод Ожешко:

1. На высушенный нефиксированный препарат наливают несколько капель 0,5% раствора HCl и подогривают до кипения 2-3 мин. Сливают кислоту; промывают водой; сушат и фиксируют.
2. Через полоску фильтровальной бумаги окрашивают карболовым фуксином Циля, подогривая до отхождения паров.
3. Обесцвечивают 5% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> несколько секунд, промывают водой.
4. Окрашивают метиленовым синим или 1% раствором малахитового зеленого 3-5 мин. промывают водой, высушивают.

Споры рубиново-красного цвета, вегетативные формы синие или зеленые.

#### Метод Тружильо:

1. Фиксированный препарат окрашивают 7 мин. 0,5% раствором малахитовой зелени через полоску фильтровальной бумаги, подогривая до отхождения паров. Промывают водой.
2. Окрашивают 0,25% водным раствором фуксина-1 мин., высушивают.

Споры зеленого цвета, вегетативные формы красные.

**Идентификация микроорганизмов, значение выявления структурных элементов бактерий.** Выявление структурных элементов бактерий возможно благодаря неодинаковому физико-химическому строению их и различному отношению к красителям. Изучение структурных элементов бактериальной клетки, прежде всего, имеет дифференциально - диагностическое значение в связи с идентификацией. Вместе с тем это позволило накопить огромный материал по их субмикроскопической организации и исследованию у них физико-химических процессов на молекулярном уровне, что способствует развитию, помимо описанного раздела, функциональной морфологии.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Принципы систематики микроорганизмов.
2. Понятия вида микробов; интравидовых категорий (хемовар, серовар, фаговар, биовар); штамма, клона.
3. Морфология бактерий: форма, величина, взаимное расположение.
4. Простые и сложные методы окраски; их информативность.
5. Устройство биологического микроскопа. Разрешающая способность микроскопа.
6. Правила работы с иммерсионной системой.
7. Назовите отличительные признаки микроорганизмов, как представителей царства прокариот.
8. Какие свойства микроорганизмов лежат в основе микроскопического метода исследования?
9. L-формы, протопласты, сферопласты.
10. Значение выявления структурных элементов бактерий в идентификации микроорганизмов.

#### **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

##### **1. ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ПО БЕРЖДИ:**

- 1) степень вирулентности;
- 2) чувствительность к антибиотикам;
- 3) строение клеточной стенки и отношение к окраске по Граму;
- 4) отношению к молекулярному кислороду;
- 5) наличие ядра;

##### **7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

#### **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

##### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

##### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

Лелевич, С. В. [Клиническая микробиология](#) : учебное пособие для вузов / С. В. Лелевич, О. М. Волчкевич, Е. А. Сидорович. - 2-изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 308 с. - Текст : электронный.

[Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии](#) / ред. А. А. Воробьев, А. С. Быков. - 3-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2022. - 272 с. : ил. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник / ред. А. А. Воробьев. - 3-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2022. - 704 с. : ил., таб. - Текст : электронный.

##### **- электронные ресурсы:**

Ламинарный бокс в микробиологической лаборатории. Основные принципы работы. (<https://www.youtube.com/watch?v=1nf-ALc6lW0>)

Приготовление мазка бактериальной культуры (<https://www.youtube.com/watch?v=QjfmbrzaHcs>)

Окраска по Граму (<https://www.youtube.com/watch?v=97Kw9wP2vbU>)

**1. Тема № 2.** Физиология бактерий. Принципы, методы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов и выделения чистых культур микроорганизмов. Бактериологический метод исследования: 1 и 2 этап. Стерилизация, дезинфекция, асептика, антисептика.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Бактериологический метод исследования микроорганизмов является наиболее объективным из всех лабораторных методов исследования. Бактериологический метод основан на выделении чистой культуры возбудителя и ее последующей идентификации на основании морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств. Располагая чистой культурой бактерий можно определить их родовую и видовую принадлежность, факторы патогенности а также чувствительность к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам. Для эпидемиологического анализа вспышек бактериальных инфекций проводят типирование культур, выделенных от разных больных и из других источников (вода, пищевые продукты и т.д.), с целью установления их биовара, серовара, фаговара на основании изучения биохимических, антигенных особенностей или чувствительности к фагам соответственно. Кроме того, бактериологическое исследование проводят для выявления бактерионосителей среди детей и взрослых, а также среди работников медицинских и пищевых учреждений. Уничтожение патогенных для человека микроорганизмов является одной из важнейших проблем в профилактике и лечении различных заболеваний. Для решения данной задачи используются методы асептики, антисептики, дезинфекции стерилизации. Каждый метод имеет свои цели и условия применения.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Бактериостатическое и бактерицидное действие низких и высоких температур на микроорганизмы.**

Температура имеет важнейшее значение для регуляции интенсивности метаболических реакций в микробных клетках. В зависимости от температурных предпочтений выделяют три группы микроорганизмов - *термофилы*, *психрофилы* и *мезофилы*.

Для *термофилов* оптимальная температурная зона роста равна 50-60°C, верхняя зона задержки роста - 75°C, нижняя - 45°C. Термофилы не размножаются в организме теплокровных животных, поэтому медицинского значения не имеют.

*Психрофилы* имеют оптимальную температурную зону роста в пределах 10-15°C, максимальную зону задержки роста 25-30°C, минимальную 0-5°C. Психрофилы являются свободно живущими организмами или паразитами холоднокровных животных, но некоторые факультативные психрофилы, например иерсинии, клебсиеллы, псевдомонады вызывают заболевания у человека. Размножаясь в пищевых продуктах при температуре бытового холодильника, эти бактерии нередко повышают вирулентность.

Большинство патогенных бактерий - *мезофилы*. Они обитают главным образом в организме теплокровных животных. Оптимальная температура их роста колеблется в пределах 35-37°C, максимальная 43-45°C, минимальная 15-20°C. В окружающей среде могут переживать, но обычно не размножаются. При пониженной температуре подавляется образование факторов адгезии (пилей), капсул, антигенов вирулентности и других структурных элементов, отвечающих за патогенные свойства. Эти изменения обратимы, восстановление признаков происходит через 2-3 ч культивирования бактерий при оптимальной температуре.

Критические температурные параметры неодинаковы для разных микробов. Повреждающее действие высокой температуры связано с необратимой денатурацией ферментов и других белков, низкой - с разрывом клеточной мембраны кристаллами льда и приостановкой метаболических процессов. *Вегетативные формы* погибают при

температуре 60-80°C в течение часа, при 100°C – мгновенно. Споры устойчивы к температуре 100°C, гибнут при 130°C. Нижняя температурная граница гибели некоторых патогенных агентов варьирует от 20°C до абсолютного нуля (вирус кори, бактериальные возбудители коклюша, сифилиса, менингококковой и гонококковой инфекции).

### **Влияние химических веществ различных классов на микроорганизмы. Антисептики и дезинфектанты.**

Способность ряда химических веществ подавлять жизнедеятельность микроорганизмов и предотвращать порчу органических субстратов известна с глубокой древности. В частности, египтяне широко применяли кислоты, щелочи, природные ароматические вещества для мумификации умерших; персы-огнепоклонники для предохранения дерева и кожи от гниения использовали нефть и ее продукты. Применение химических веществ – основа метода антисептики (предложил Джозеф Листер в 1867 г.). Эффективность зависит от концентрации химических веществ и времени контакта с микробом. Химические вещества могут подавлять рост и размножение микроорганизмов, проявляя статический эффект, либо вызывать их гибель (микробицидный эффект (от лат. *caedo*, убивать)). Дезинфектанты и антисептики дают неспецифический микробицидный эффект; химиотерапевтические средства проявляют избирательное противомикробное действие.

*Дезинфектанты* – химические средства неспецифического действия, применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов. *Антисептики* – вещества, используемые для обработки живых тканей. Дезинфицирующие средства оказывают в рабочих концентрациях бактерицидное действие, а антисептики (в зависимости от концентрации) – бактериостатическое или бактерицидное. Антисептики и дезинфектанты обычно легко растворимы в воде и действуют быстро; они дешевы и при правильном применении не оказывают вредного воздействия на организм человека. *Дезинфекция* позволяет уменьшить число патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды. Дезинфекцию проводят с определенной периодичностью (профилактическая дезинфекция), либо при возникновении инфекционного заболевания или подозрении на него (очаговая дезинфекция).

### **Понятия: стерилизация, дезинфекция, асептика, антисептика.**

*Стерилизация* – полное уничтожение микроорганизмов в стерилизуемом объекте (в переводе с латинского – обеспложивание).

Основными целями стерилизации являются:

- предупреждение заноса микробных клеток в организм человека при медицинских вмешательствах;
- исключение контаминации питательных сред и культур клеток при диагностических и научных исследованиях, в процессе биотехнологического производства;
- предупреждение микробной биодegradации материалов, в том числе диагностических и лекарственных средств.

В медицинской практике стерилизации подвергают инструментарий, перевязочный, шовный материал, операционное белье, лекарственные препараты, питательные среды, лабораторную посуду, а при создании безмикробной среды – воздух операционных. Должны быть стерилизованы все изделия, которые соприкасались с раневой поверхностью, кожными покровами или слизистыми, контактировали с кровью или инъекционными препаратами.

*Дезинфекция* – это мероприятия, направленные на уничтожение или резкое подавление численности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов во внешней среде, в том числе на объектах и изделиях. Целью дезинфекции является предупреждение или прерывание передачи возбудителей от инфицированного индивидуума к интактному через объекты внешней среды (факторы передачи). Практически чаще всего используют комбинацию нескольких методов в различных сочетаниях с учетом конструкции объекта, предполагаемой массивности микробной контаминации, свойств дезинфектанта и т. п.

В медицинских учреждениях преимущественно применяют для дезинфекции достаточно высокие концентрации химических веществ, обладающих широким спектром микробицидного действия (дезинфектанты), реже используют сочетание дезинфектанта с температурной обработкой (пароформалиновая дезинфекция) или вместе с поверхностно-активными веществами.

В очагах туберкулеза, сибирской язвы, кишечных инфекций дезинфекция проводится с учетом свойств конкретных возбудителей соответствующих заболеваний. В больничных учреждениях обычно уничтожают широкий спектр патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

*Асептика* включает в себя совокупность прямых (стерилизация, дезинфекция, антисептика) и косвенных методов воздействия на микроорганизмы с целью создания безмикробной зоны или зоны с резко сниженной численностью микроорганизмов для проведения медицинских вмешательств и исследовательских манипуляций.

Асептическая практика применяется в операционных, родильных залах, лабораторных и инфекционных боксах, в абактериальных палатах для лиц с трансплантированными органами, в кюветах для недоношенных детей, в биотехнологии и производстве многих лекарственных препаратов. О прямых методах воздействия на микроорганизмы уже сказано выше. Косвенные, т. е. разделительные меры, заключаются в использовании герметичных перегородок в рабочих помещениях, специальной одежды и обуви, перчаток, системы воздушных бактериальных фильтров.

Таким образом, предупреждают или снижают риск заноса микроорганизмов в «рабочую зону», которой может быть операционная рана, питательная среда, пищевой продукт, инъекционный раствор, организм ослабленного больного.

*Антисептика* – это система мер быстрого подавления патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на коже и слизистых хирургов, оперируемых, раневых, персонала особо чистых производств. В принципе антисептика – это щадящая дезинфекция применительно к человеку.

Главным методом антисептики является обработка химическими веществами с преимущественно микростатическим действием (антисептиками) с учетом спектра их антимикробной активности и чувствительности конкретных возбудителей.

Деконтаминация с помощью антисептиков предполагает подавление патогенных и условно-патогенных микроорганизмов при условии сохранения непатогенных видов. Исключение составляет антисептическая обработка рук оператора и операционного поля пациента, а также ран и слизистых оболочек иммунодефицитных лиц, когда необходимо более полное освобождение названных биотопов от всех микроорганизмов.

Для антисептики применяют растворы кислородсодержащих препаратов на основе перекисных соединений или перекиси водорода (первомур и др.), спирты и другие вещества с дезинфицирующими свойствами. Конечно, концентрация антисептических растворов существенно ниже, чем при использовании в качестве дезинфектантов.

### **Методы, аппаратура и режимы стерилизации, их выбор в зависимости от свойств стерилизуемого объекта.**

Стерилизацию производят различными способами: 1. физическими (воздействиями высокой температуры, излучением); 2. механическими (фильтрование); 3. химическими. Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяется свойствами объекта, подлежащего стерилизации, его физическими свойствами и химическим состоянием, целью исследования.

#### *Физические методы стерилизации.*

Прокаливание. Данный способ используется ограниченно, например, для стерилизации бактериологических петель, игл, пинцетов.

Стерилизация сухим жаром. Осуществляют в печах Пастера (сушильных шкафах) при 165-180° в течение 150, 60 минут соответственно. Сухой жар используют в основном для стерилизации стеклянной посуды. При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутренних компонентов.

Стерилизация паром под давлением. Проводят в паровом стерилизаторе. Это один из наиболее эффективных методов стерилизации, который широко применяется не только в микробиологической практике, но и в фармацевтической практике. Работа с паровым стерилизатором требует точного выполнения специальной инструкции и соблюдения правил безопасности.

Так как паровой стерилизатор заполняется паром под давлением выше атмосферного, то это позволяет проводить стерилизацию при температурах, значительно превышающих температуру кипения воды при нормальном давлении. Конкретные режимы выбирают в соответствии с особенностями стерилизуемого объекта.

Стерилизация текучим паром в аппарате Коха или в паровом стерилизаторе применяется в тех случаях, когда стерилизуемый материал не выдерживает высокой температуры, например, питательные среды с витаминами, углеводами. В основе метода лежит антибактериальное действие пара в отношении вегетативных клеток. Поэтому для полного обеспечения обеспложивания применяют дробную стерилизацию, т.е. стерилизуют материал при 100° в течение 30-60 мин три дня подряд. При этом вегетативные клетки погибают, а споры сохраняются и за сутки прорастают. Последующее двукратное прогревание обеспечивает достаточно надежную стерильность материала.

Излучение может быть как ионизирующим, так и неионизирующим. Неионизирующее излучение включает такие виды как инфракрасное, ультрафиолетовое, ультразвуковое и радиочастотное. Ионизирующее излучение может быть корпускулярным (бета-частицы или электронным) или электромагнитным (рентгеновские, гамма-лучи). На практике наиболее часто используют ультрафиолетовое облучение в диапазоне 254 нм (стерилизация воздуха в боксах, операционных, детских учреждениях при помощи бактерицидных ламп разной мощности – БУВ-15, БУВ-50).

Остальные типы облучения используются в основном для промышленной стерилизации.

Химический метод стерилизации. Существенное требование, которому должен удовлетворять химической стерилизации агент, заключается в том, что он должен быть не только токсичен, но и еще и летуч. Хотя показано, что бактерицидными свойствами обладают многие газы (формальдегид, озон, надуксусная кислота, метилбромид), для стерилизации наиболее широко используются окись этилена (ОЭ), благодаря ее хорошей совместимости с различными материалами. В силу того, что ОЭ взрывоопасна и токсична для человека, в лабораторной практике стерилизацию ОЭ не применяют, однако это вещество используют в промышленности для стерилизации пластмассовых чашек Петри и других предметов, которые плавятся при температурах выше 100°.

### **Основные группы дезинфектантов и тактика их применения в ЛПУ.**

Химический метод дезинфекции основан на применении химических дезинфицирующих средств, содержащих активно действующие вещества (ДВ). Дезинфицирующие средства производят в виде следующих форм:

- таблетки, гранулы, порошки;
- жидкие концентраты (растворы, эмульсии, пасты, кремы и др.);
- газы;
- готовые формы применения (рабочие растворы, бактерицидные салфетки, лаки, краски, аэрозольные баллоны).

### Требования к химическим средствам.

К химическим дезинфицирующим средствам, применяемым в ЛПУ, предъявляются следующие требования:

#### 1. По антимикробной активности:

- должны обладать микробицидным действием (бактерицидным, туберкулоцидным, вирулицидным, фунгицидным, спороцидным). Непригодны средства, только задерживающие рост микроорганизмов, т.е. обладающие микростатическим действием;
- иметь широкий спектр антимикробного действия, т.е. убивать патогенные и условно-патогенные бактерии, вирусы, микобактерии, грибы, споровые формы бактерий;
- обладать высокой эффективностью, т.е. обеспечивать обеззараживание объекта при их использовании в небольших концентрациях в короткие сроки;
- обладать остаточным антимикробным действием;
- иметь незначительную зависимость активности от наличия загрязнений, изменений величины рН и понижения температуры.

#### 2. По токсичности все дезинфицирующие средства делятся на 4 класса. В ЛПУ разрешается использовать:

- средства 2-го класса опасности – со средствами защиты органов дыхания, глаз и кожи в отсутствие больных и пациентов;
- средства 3-го класса опасности – без средств защиты, в отсутствие больных и пациентов;
- средства 4-го класса опасности – без средств защиты, в присутствии больных и пациентов.

#### 3. По физико-химическим свойствам:

- иметь большое количество действующего вещества (ДВ);
- быстро растворять в воде;
- иметь стабильность дезинфицирующего средства нескольких лет (3-5), рабочих растворов – несколько часов; содержание ДВ, физико-химические показатели должны соответствовать требованиям нормативно-методических документов.

Дезинфицирующие средства не должны обладать коррозионной активностью, разрушать и обесцвечивать ткани, обои, повреждать лакированные, полированные, синтетические поверхности и т. п., а также загрязнять окружающую среду, т. е. быть биоразлагаемыми. Желательно, чтобы, кроме основного антимикробного действия, средства обладали положительными побочными свойствами: моющим, дезодорирующим, отбеливающим, чистящим, а также имели гомогенизирующую способность при обеззараживании выделений (фекалии, моча, гной и др.) и остатков пищи.

Процесс обеззараживания объектов сложен, его эффективность зависит от следующих факторов:

- от химической природы ДВ и его механизма действия, от концентрации ДВ в препарате и его концентрации в рабочем растворе;
- от вида микроорганизма, являющегося возбудителем инфекции, его устойчивости к применяемому дезинфицирующему средству и количества на обрабатываемом объекте;

- от физико-химических свойств обрабатываемого объекта, его формы, величины, наличия на нем загрязнений органической и неорганической природы;
- от способа обработки объекта дезинфицирующим средством (орошение, мытье, погружение в растворы, протирание ветошью, смоченной в дезрастворе, обработка направленными аэрозолями поверхности, заполнение аэрозолями герметичного помещения, газация или создание бактерицидных паров и дымов в обрабатываемом помещении);
- от времени воздействия дезинфицирующего раствора на микроорганизмы.

Дезинфицирующие средства относятся к разным химическим группам в зависимости от принадлежности входящих в их состав активно действующих веществ (ДВ) и распределены по следующим группам:

1) Галоидсодержащие, в них активно действующим антимикробным началом являются хлор, бром или йод (хлорная известь, соли гипохлорита кальция, хлорамины, дихлорциануровая кислота и ее соли, аквасепт, йодонат, дипромантин).

- Как антисептики применяют йодсодержащие препараты – спиртовой раствор йода (5% в этаноле); йодинол (1% водный раствор содержит 0,1% йода, 0,3% калия йодида и 0,9% поливинилового спирта, замедляющего выделение йода); йодонат (водный раствор комплекса поверхностно-активного вещества с йодом); повидон-йод (комплекс йода с поливинилпирролидоном) и раствор Люголя применяют для обработки слизистых оболочек.
- Как дезинфектанты применяют хлорсодержащие препараты – газообразный хлор (взаимодействуя с водой, образует хлорноватистую кислоту; в присутствии органических веществ противомикробное действие уменьшается); хлорную известь (5,25%NaClO, а также образующую при растворении хлорноватистую кислоту); хорамин Б (содержит 25-29% активного хлора; для обеззараживания питьевой воды применяют в виде таблеток, содержащих 3 мг активного хлора); хлоргексидина биглюконат (гибитан).

2) Кислородсодержащие на основе перекисных соединений или перекиси водорода (первомур, ПВК, перамин, виркон, дезоксон). Механизм антимикробной активности связан с окислением метаболитов и ферментов микроорганизмов, либо денатурацией микробных белков. Наиболее распространенные окислители, применяемые как антисептики, – перекись водорода и перманганат калия.

3) Альдегидсодержащие на основе глутарового или янтарного альдегидов (гигасепт, сайдекс, глутарал, альдесол).

Альдегиды широко применяют как консерванты. Наиболее известные – формальдегид (8%) и глутаральдегид (2-2,5%) – проявляют раздражающее действие (особенно пары), ограничивающее их широкое применение.

- Раствор формальдегида обладает дезинфицирующим и дезодорирующим эффектами. Применяют для мытья рук, дезинфекции инструментов, обработки кожи ног при повышенной потливости. Входит в состав препаратов (формидрон, мазь формалиновая). Мыльный раствор формальдегида (лизоформ) применяют для спринцеваний в гинекологической практике, для дезинфекции рук и помещений.
- Уротропин (гексаметилентетрамин) в кислой среде организма расщепляется с выделением формальдегида; последний, выделяясь с мочой, оказывает антисептическое действие. Применяют при инфекционных процессах мочевыводящих и желчевыводящих путей, кожных заболеваниях. Входит в состав комбинированных препаратов (кальцекс, уробесал).
- Циминаль, цимизоль и ципидол – антисептики, действующие за счет образования формальдегида путем их гидролиза; применяют для индивидуальной профилактики венерических заболеваний у мужчин после случайных половых связей.

4) Поверхностно-активные вещества (ПАВ) на основе четвертично-аммониевых соединений и амфотерных поверхностно-активных соединений (аламинол, дюльбаль, санифект, вертолен, гермосепт, септодор).

5) Гуанидины и их смеси с ПАВ (демос, катасепт, лизоформин, пливасепт).

6) Спирты – на основе этанола. Как антисептики, наиболее эффективны в виде 60-70% водных растворов. Спирты осаждают белки и вымывают из клеточной стенки липиды. При правильном применении эффективны в отношении вегетативных форм большинства бактерий; споры бактерий и грибов, а также вирусы к ним резистентны.

7) Фенолсодержащие широко применяют как дезинфектанты, в меньших концентрациях – в качестве антисептиков. Препараты денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки. От применения собственно фенола отказались давно вследствие его токсичности, но его производные (например, гексахлорофен, резорцин, хлорофен, тимол, салол) применяют часто.

8) Кислоты и щелочи применяют как антисептики. Среди кислот наиболее известны борная, бензойная, уксусная и салициловая. Применяют для лечения поражений, вызванных патогенными грибами и бактериями. Наиболее

распространена салициловая кислота, применяемая в спиртовых растворах (1-2%), присыпках, мазях, пастах (например, для лечения дерматомикозов в областях, поврежденных трением); оказывает также в зависимости от концентрации отвлекающее, раздражающее и кератолитическое действие. Из щелочей наиболее распространен раствор аммиака (нашатырный спирт содержит 9,5-10,5% аммиака), применяемый для обработки рук хирурга (0,5% раствор).

9) **Металлы.** Антимикробный эффект основан на способности осаждать белки и другие органические соединения. В качестве антисептиков широко применяют нитрат серебра (ляпис), сульфат меди (медный купорос) и хромат ртути (мербромин). Соединения металлов (особенно свинца, мышьяка и ртути) не рекомендуют применять для дезинфекции и антисептики, поскольку они способны накапливаться в организме человека. Исключение - сулема (ртути дихлорид), иногда применяемая для дезинфекции белья, одежды, предметов ухода за больными.

10) **Катионные детергенты** оказывают бактерицидное действие, связанное с изменением проницаемости ЦПМ. Их эффект уменьшают анионные поверхностно-активные вещества (по этой причине катионные детергенты несовместимы с мылами), низкие значения pH (то есть повышенная кислотность), некоторые органические соединения, ионы металлов. Катионные детергенты адсорбируются пористыми и волокнистыми материалами. При нанесении на кожу образуют пленку, под которой могут оставаться живые микроорганизмы. Наиболее часто применяют для обработки рук хирурга (препараты циргель, дегмицид, роккал).

11) **Красители.** В качестве антисептиков давно применяют различные красители (например, бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, риванол, основной фуксин).

### **Принципы и методы культивирования микроорганизмов**

Микроорганизмы (за исключением облигатных внутриклеточных паразитов) культивируют, как правило, на искусственных питательных средах. В зависимости от пищевых потребностей того или иного вида питательные среды должны содержать соответствующие исходные вещества, необходимые для пластического и энергетического метаболизма. Условия культивирования также зависят от свойств соответствующих микроорганизмов. Большинство патогенных микробов выращивают на питательных средах при температуре 37 °С в течение 1-2 суток. Для культивирования анаэробов применяют особые методы, сущность которых заключается в исключении влияния на культуры атмосферного кислорода.

### **Питательные среды: понятие; требования, предъявляемые к ним; классификация.**

Питательные среды необходимы для выращивания микробов и выделения их в чистой культуре, с последующим изучением её биологических свойств. Результаты бактериологических исследований зависят от полноценности состава применяемых питательных сред, так как микроорганизмы могут различаться по типу питания и ферментативной активности. В микробиологической практике применяются следующие питательные среды: 1) обычные, или основные, среды, на которых хорошо растёт большинство микробов; 2) специальные среды, предназначенные для выращивания отдельных видов микроорганизмов с повышенной или индивидуальной требовательностью; 3) дифференциально-диагностические среды, позволяющие отличить отдельные виды бактерий друг от друга по характеру роста на питательных средах. Обычные среды называются основными потому, что из них изготавливаются специальные среды путём добавления различных веществ, повышающих питательность среды для тех или иных видов микробов.

К питательным средам предъявляются следующие требования:

- а) достаточная питательность для данного вида микробов, т. е. содержание всех необходимых компонентов для жизни клетки;
- б) концентрация водородных ионов (pH) должна соответствовать индивидуальным потребностям выращиваемых видов микробов;
- в) среды должны быть прозрачными, иначе невозможно наблюдать за ростом микробов в них;
- г) абсолютная стерильность среды обеспечивает выделение чистой культуры микробов.
- д) изотоничность питательной среды должна обеспечивать физиологическое осмотическое состояние в цитоплазме бактериальных клеток.

Питательные среды делятся на две группы: естественные - животного и растительного происхождения (картофель, морковь, фрукты, молоко, кровь, сыворотка, асцитическая жидкость, яйца птиц и т. д.) и искусственные - основу их составляет мясопептонный бульон коммерческого изготовления или мясная вода. Необходимую плотность питательной среде придаёт добавление определённого количества агар-агара. В зависимости от его содержания различают по консистенции жидкие, полужидкие и плотные среды.

## **Понятие о виде, штамме, колонии, чистой культуре микроорганизмов**

Вид определяют как эволюционно сложившуюся совокупность особей, имеющих единый тип организации, который в стандартных условиях проявляется сходными фенотипическими признаками: морфологическими, физиологическими, биохимическими и др.

Штаммом называют культуру, выделенную из определённого источника, или из одного и того же источника в разное время.

Изолированное скопление особей микроорганизмов одного вида, образующееся в результате деления одной бактериальной клетки на плотной питательной среде называют колонией микроорганизмов.

Чистая культура - это популяция бактерий одного вида, полученная из одной изолированной колонии, выращенной на питательной среде.

## **Сущность бактериологического метода и области его применения**

Бактериологический метод - это метод, основанный на выделении чистой культуры и изучении всех его свойств. При микроскопическом методе мы можем изучить только морфо-тинкториальные свойства и структурные элементы бактериальной клетки. На основании всех свойств, выделенной культуры, изучаемых при бак.методе возможно подтверждение клинического диагноза. Кроме того, располагая чистой культурой бактерий, определяют её чувствительность к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам. Последнее лежит в основе рационального выбора средств этиотропной терапии. Благодаря этому бак.метод назван «золотым стандартом» в диагностике заболеваний.

Для эпидемиологического анализа вспышек бактериальных инфекций проводят типирование культур, выделенных от больных и из других источников (вода, пищевые продукты, смывы и т.д.), с целью установления их биовара, серовара, фаговара на основании изучения биохимических, антигенных особенностей или чувствительности к фагам соответственно. Кроме того, бактериологическое исследование проводят для выявления бактерионосителей, в т.ч. среди работников медицинских и аптечных учреждений.

Выбор исследуемого материала зависит от вида заболевания и преимущественной локализации возбудителя на определенном этапе его развития (патогенеза). Материалом может служить кровь, ликвор, раневое отделяемое, мокрота, испражнения, моча и т. д. Техника забора материала имеет большое значение в получении достоверного результата.

### **Цель и последовательность выполнения 1 этапа бактериологического метода выделения аэробов.**

Цель 1 этапа бак.метода - получение изолированных колоний. В исследуемом материале находится, как правило, смесь микробов разных видов, для выделения чистой культуры необходимо их разобщить.

Метод «штрих с площадкой»: Бактериологической петлей берется исходный материал. С одной стороны чашки с плотной питательной средой производим посев микроорганизмов на участке площадью 2\*1 см (формирование такой площадки является обязательным). Затем этой же петлей засевают оставшуюся поверхность 0,5 чашки. Посев производят частыми штрихами. Такой метод позволяет при формировании «площадки» освободиться от излишек материала и при нанесении штрихов получить изолированные колонии.

Метод Дригальского: заключается в помещении материала на чашку со средой и равномерном втирании шпателем в поверхность среды круговыми движениями. Затем, не прожигая шпателя, операцию повторяют во второй чашке, затем на третьей. Изолированные колонии в зависимости от концентрации микроорганизмов в исходном материале можно получить во второй или третьей чашке.

### **Цель и последовательность выполнения 2 этапа бактериологического метода выделения аэробов.**

Цель 2 этапа бак. метода - выделение и накопление чистой культуры.

Для этого проводится оценка культуральных свойств предполагаемого возбудителя: макроскопическая характеристика колоний в проходящем, отраженном свете, микроскопическая характеристика колоний при малом увеличении. Далее оцениваются морфо-тинкториальные свойства предполагаемого возбудителя (приготовление микропрепарата из характерной колонии).

Для накопления чистой культуры производят отсев части характерной изолированной колонии на скошенный агар.

При культивировании микроорганизмов необходимо учитывать присущий данному виду тип дыхания. Наиболее сложным является культивирование облигатных анаэробов, для которых присутствие кислорода в атмосфере и в

питательной среде является губительным.

### **Приборы для культивирования анаэробов:**

Микроанаэростат – используется для создания вакуума с дозированным содержанием кислорода. Прибор представляет собой герметически закрывающийся сосуд, снабженный манометром, в который помещают посе́вы и откачивают воздух. Микроанаэростат помещают в термостат.

Эксикатор – стеклянный лабораторный сосуд с притертой крышкой. В его донной части имеется дополнительная емкость, куда наливается смесь пирогаллола и едкого натра или гидросульфита натрия и двууглекислой соды. На сетку-подставку помещают посе́вы и притирают крышку с помощью вазелина. Эксикатор помещают в термостат.

### **Методы культивирования анаэробов:**

Метод Фортнера. В чашку Петри наливают питательный агар с 1-2% глюкозы. Посредине чашки стерильным скальпелем вырезают канавку шириной приблизительно 1 см. Одну половину чашки засевают культурой аэробов (сарцина, кишечная палочка), вторую – культурой анаэробов или исследуемым на их наличие материалом. Засеянную чашку закрывают, герметизируют и помещают вверх дном в термостат. Быстрорастущие аэробы, поглощая кислород, создают тем самым благоприятные условия для роста анаэробных микроорганизмов.

Метод Перетца. В стерильную чашку Петри помещают стеклянные палочки, на которые кладут стеклянные пластинки или предметные стекла. В пробирку с 20 мл расплавленного и охлажденного до 50°С МПА с 10% глюкозы (рН 7,0-7,2) вносят исследуемый материал и добавляют 2-4 капли 10% гидросульфита натрия на 10%-м растворе углекислой соды. Содержимое пробирки быстро перемешивают и выливают в чашку с таким расчетом, чтобы агар заполнил пространство между стеклянной пластинкой и дном чашки. Чашки инкубируют при 37°С 24-48 часов. Колонии анаэробов вырастают под стеклянной пластинкой.

Метод Виньяль-Вейона. В пробирку с 0,5% расплавленным и охлажденным до

40-45°С сахарным агаром вносят исследуемый материал и перемешивают. Содержимое пробирки набирают в пастеровскую пипетку. После заполнения пипетки вытянутый конец запаивают, а противоположный конец закрывают стерильной ваткой и заливают парафином. Трубки помещают в термостат; через 2-3 суток в агаре вырастают колонии, видимые в проходящем свете, которые можно изолировать. Для этого трубку надрезают напильником выше уровня намеченной колонии, надламывают, а колонию извлекают петлей и пересекают для накопления чистой культуры в соответствующую питательную среду.

Метод Биттнера. К крышке чашки Петри с посевом исследуемого материала или выделенной культуры анаэробов прикрепляют пакет из фильтровальной бумаги, содержащей пирогаллол, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и тальк. Чашку герметизируют при помощи парафина или скотча. Содержимое пакета увлажняется за счет образующегося конденсата и ингредиенты вступают в реакцию, которая сопровождается поглощением O<sub>2</sub> и выделением CO<sub>2</sub>.

Газ-пак (Genbag anaer). Система Genbag anaer состоит из воздухонепроницаемых пакетов, изготовленных из прозрачной пластмассы и генераторов, содержащих смесь веществ, поглощающих кислород.

Последовательность работы: вынуть генератор из пакета, поместить в нижнюю часть воздухонепроницаемого пакета, затем поместить чашки (или пробирки) с посевами и с помощью специальной скрепки закрыть пакет. Инкубация при 37°.

### **Среды для культивирования анаэробов:**

Среда Китта-Тароцци. Содержит мясо-пептонный бульон (МПБ), 0,5% глюкозы и 0,15% агара. На дно пробирки для адсорбции O<sub>2</sub> помещают кусочки вареной печени или фарша слоем 1-1,5 см и заливают 6-7 мл среды. Среду перед посевом регенерируют (прогревают 15-20 мин на водяной бане для удаления воздуха, а затем быстро охлаждают). После посева среду заливают вазелиновым маслом и помещают в термостат.

Полужидкий сахарный агар (высокий столбик). В пробирку с 6-7 мл расплавленного и охлажденного до 40-45° полужидкого питательного агара, содержащего 0,5-1% глюкозы, вносят исследуемый материал и перемешивают. Посевы помещают в термостат.

Среда для контроля стерильности (СКС). Рост многих анаэробных микроорганизмов возможен только на средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом. Поэтому в среды добавляют восстановители, например, тиогликолевую кислоту или ее натриевую соль, цистеин, аскорбиновую кислоту. Функции восстановителей выполняют и другие компоненты среды: глюкоза, пептон. СКС содержит питательный бульон, витаминный препарат ЭКД, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, глюкозу, тиогликолят натрия, цистеин, агар (0,75%). Среду разливают в пробирки по 6-7 мл.

## 5. Вопросы по теме занятия

1. Бактериостатическое и бактерицидное действие низких и высоких температур на микроорганизмы.
2. Влияние химических веществ различных классов на микроорганизмы. Антисептики и дезинфектанты.
3. Понятия: стерилизация, дезинфекция, асептика, антисептика.
4. Методы, аппаратура и режимы стерилизации, их выбор в зависимости от свойств стерилизуемого объекта.
5. Основные группы дезинфектантов и тактика их применения в ЛПУ.
6. Принципы и методы культивирования микроорганизмов.
7. Питательные среды: понятие; требования, предъявляемые к ним; классификация.
8. Понятие о виде, штамме, колонии, чистой культуре микроорганизмов.
9. Сущность бактериологического метода и области его применения.
10. Цель и последовательность выполнения 1 этапа бактериологического метода выделения аэробов.

## 6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов

1. СРЕДЫ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ ПО БИОХИМИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ::
  - 1) дифференциально-диагностические;
  - 2) среды накопления;
  - 3) элективные;
  - 4) специальные;
  - 5) общепотребляемые;
2. ПРИНЦИП ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ::
  - 1) посев на элективные среды;
  - 2) заражение чувствительных лабораторных животных;
  - 3) разобщение микробных клеток;
  - 4) посев «газоном»;
  - 5) посев "уколом";
3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗРАБОТАЛ И ВВЕЛ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ::
  - 1) А. Ван Левенгук;
  - 2) Р. Кох;
  - 3) Л. Пастер;
  - 4) З.В. Ермольева;
  - 5) И.И. Мечников;
4. ЦЕЛЬ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ::
  - 1) обнаружение возбудителя;
  - 2) определение чувствительности возбудителя к антибиотикам;
  - 3) получение чистой культуры, ее идентификация и определение чувствительности к антибиотикам;
  - 4) определение иммунного статуса;
  - 5) определение патогенности возбудителя;
5. МЕТОД МЕХАНИЧЕСКОГО РАЗОБЩЕНИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК:
  - 1) центрифугирование;
  - 2) посев исследуемого материала «газоном»;
  - 3) посев исследуемого материала уколом;
  - 4) заражение восприимчивых лабораторных животных;
  - 5) посев исследуемого материала методом «штрих с площадкой»;
6. ЦЕЛЬ I ЭТАПА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА:
  - 1) получение изолированных колоний;
  - 2) посев исследуемого материала;
  - 3) микроскопия исследуемого материала;
  - 4) выделение и накопление чистой культуры;
  - 5) идентификация исследуемой культуры;
7. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ИСПОЛЬЗУЮТ::
  - 1) лабораторных животных;
  - 2) питательные среды;
  - 3) куриные эмбрионы;
  - 4) культуры клеток;
  - 5) электронный микроскоп;
8. УНИЧТОЖЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ::
  - 1) асептика;
  - 2) стерилизация;
  - 3) дезинфекция;
  - 4) антисептика;
  - 5) пастеризация;
9. СИСТЕМА МЕРОПРИЯТИЙ, ПРЕДУПРЕЖДАЮЩИХ ВНЕСЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ

## СРЕДЫ В ТКАНИ::

- 1) дезинфекция;
- 2) асептика;
- 3) стерилизация;
- 4) антисептика;
- 5) тиндализация;

## 10. ПОЛНОЕ УНИЧТОЖЕНИЕ В ОБЪЕКТЕ ВСЕХ МИКРООРГАНИЗМОВ:

- 1) асептика;
- 2) антисептика;
- 3) стерилизация;
- 4) дезинфекция;
- 5) пастеризация;

## 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. Медицинский инструментарий должен быть подвергнут стерилизации. Одним из возможных способов стерилизации является автоклавирование

**Вопрос 1:** Назовите фактор, оказывающий антимикробное действие при автоклавировании.;

**Вопрос 2:** Назовите примеры изделий, используемых в медицинской практике, которые можно стерилизовать с использованием автоклава.;

- 1) Фактор, оказывающий антимикробное действие при автоклавировании - температура более 100 градусов Цельсия, которая достигается при давлении пара выше атмосферного. Это позволяет проводить стерилизацию при температурах, значительно превышающих температуру кипения воды при нормальном давлении.;
- 2) Путем автоклавирования в медицинской практике стерилизуют: материал из текстиля (перевязочный материал, хирургическое бельё и т.д.), изделия из резины и латекса, жидкости (лекарственные растворы, питательные среды и т.д.);

2. При посеве спинномозговой жидкости, полученной от обследуемого с предварительным клиническим диагнозом «Менингит», выявить рост микроорганизмов на питательных средах не удалось

**Вопрос 1:** Можно ли приготовить универсальную питательную среду, на которой росли бы, если не все, то большинство микроорганизмов?;

**Вопрос 2:** Назовите примеры общеупотребляемых сред;

- 1) Нельзя. В питательной среде должны содержаться питательные вещества в количествах и форме, соответствующих специфическим потребностям микроорганизмов. Количество микроорганизмов огромно, крайне разнообразны и их физиологические особенности, поэтому столь же разнообразны их специфические потребности в питательных веществах. В связи с этим существуют тысячи различных сред. Причем для одного и того же микроорганизма среды могут быть различными в зависимости от задач исследования.;
- 2) К общеупотребляемым средам относятся мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон и др.;

3. На первом этапе бактериологического исследования проводится посев исследуемого материала на плотные питательные среды с целью получения изолированных колоний

**Вопрос 1:** Каким способом можно сделать эту работу, если имеется: • исследуемый материал в пробирке; • три чашки Петри с плотной питательной средой; • стерильный шпатель; • стерильная пипетка?;

**Вопрос 2:** Какой принцип лежит в основе этого метода посева?;

- 1) Можно использовать метод Дригальского. Для этого производится нанесение исследуемого материала на поверхность плотной питательной среды в 1-ю чашку с помощью стерильной пипетки. Затем последовательно распределяем материал шпателем по поверхности среды в первой чашке, затем - второй и третьей.;
- 2) В основе метода - принцип разобщения микробных клеток, позволяющий получить изолированные колонии.;

## 8. Рекомендованная литература по теме занятия

### - обязательная:

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### - дополнительная:

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

[Основы фармацевтической микробиологии](#) : учеб. пособие / В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец [и др.]. - 2-е изд., стер. - СПб. : Проспект Науки, 2017. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. -

Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**- электронные ресурсы:**

Питательные среды для микробиологии. Часть 1. Основные сведения (<https://www.youtube.com/watch?v=iapM74ipRzM>)

Питательные среды для медицинской микробиологии. Часть 2. (<https://www.youtube.com/watch?v=eRFn20IUnM4>)

Приготовление мазка бактериальной культуры (<https://www.youtube.com/watch?v=QjfmbrzaHcs>)

**1. Тема № 3.** Бактериологический метод исследования. 3 и 4 этап. Антибиотикограмма и другие методы определения антибиотикорезистентности бактерий.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): На третьем этапе бактериологического метода на основе знаний о биологии микроорганизмов предстоит провести исследования, позволяющие идентифицировать микроорганизм до вида и тем самым определить его систематическое положение. Только выделение из патологического материала больного человека чистой культуры возбудителя даёт возможность определить чувствительность данного микроорганизма к широкому спектру антибактериальных препаратов и провести рациональную антимикробную терапию. На четвертом этапе бактериологического метода предстоит провести учёт результатов исследований, которые позволят идентифицировать микроорганизм до вида и определить его чувствительность к антибиотикам.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агаре и методом серийных разведений., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Цель и последовательность выполнения 3 этапа бактериологического метода выделения аэробов.**

Целью 3 этапа бактериологического метода выделения чистых культур аэробов является идентификация выделенной чистой культуры возбудителя по морфо-тинкториальным, культуральным, биохимическим и другим свойствам.

Порядок проведения работы на 3 этапе бактериологического метода:

На 3 этапе бак.метода проводится контроль чистоты выделенной культуры, просматривают рост на поверхности скошенного агара, отмечая однородность роста, характер роста, пигмент, степень прозрачности. Визуально чистая культура характеризуется однородным ростом. Из культуры со скошенного агара готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Однородность роста культуры и микроорганизмов в мазках свидетельствует о чистоте культуры. Проводят определение биохимической активности чистой культуры микроорганизмов (сахаролитические и протеолитические свойства), определение подвижности культуры (посев на полужидкий агар), посев на среду Мюллера-Хинтона (для учета антибиотикограммы на 4 этапе).

#### **Методы определения чистоты исследуемой культуры**

Работа начинается с проверки чистоты культуры, для чего приготавливается мазок из трёх различных участков роста, окрашивают по Граму. Чистую культуру можно использовать для изучения биохимических, антигенных, вирулентных, токсигенных, и др. свойств.

#### **Классификация микроорганизмов по типам питания. Механизмы поступления питательных веществ в бактериальную клетку.**

Классификация микробов по типу питания: для осуществления процесса питания необходимо наличие питательных веществ, из которых микробы синтезируют составные части клетки и получают энергию путем окисления и восстановления различных субстратов.

По характеру использованного источника углерода и источнику энергии микробы делятся на: 1. Фототрофы, использующие свет как источник энергии; 2. Хемотрофы, использующие химические соединения как источник энергии; 3. Аутотрофы, использующие в качестве источника углерода CO<sub>2</sub> и различные неорганические соединения; 4. Гетеротрофы, утилизирующие органический углерод (углеводы, жирные кислоты).

По типу питания бактерии делятся на:

1. Фотоавтотрофы, использующие в качестве источника углерода неорганические вещества, а источника энергии - солнечный свет.
2. Фотогетеротрофы, использующие в качестве источника углерода органические вещества, а источника энергии - солнечный свет.
3. Хемоавтотрофы, использующие в качестве источника углерода  $\text{CO}_2$ , а источника энергии - восстановленные неорганические соединения.
4. Хемогетеротрофы, использующие в качестве источника углерода и энергии органические вещества.

Транспорт питательных веществ в бактериальную клетку осуществляется тремя путями:

- 1) Пассивная диффузия. Протекает без энергетических затрат, по градиенту концентрации. Таким путём в клетку поступают молекулярные вода, кислород, углекислый газ и азот.
- 2) Облегчённая диффузия. Не требует энергетических затрат. Протекает при участии мембранных белков-транслоказ.
- 3) Активный транспорт. Протекает с энергетическими затратами против градиента концентрации: а) при участии специальных белков-пермеаз. При этом каждая пермеаза переносит в клетку определённое соединение, б) при участии мембранных белков-транслоказ и фосфорилировании переносимой молекулы в процессе её прохождения через мембрану. Таким путём переносится глюкоза.

### **Ферменты микроорганизмов; их значение в метаболизме клетки. Конститутивные и индуцибельные ферменты**

Микроорганизмы синтезируют разнообразные ферменты. Эта способность определяется геномом и является достаточно стабильным признаком, который используют для идентификации. Ферменты участвуют в метаболических реакциях клетки, расщепляя макромолекулы на более простые соединения. Ферменты, которые постоянно синтезируются в микробных клетках в определённых концентрациях, называют конститутивными. Ферменты, концентрация которых резко возрастает в зависимости от наличия субстрата, называют индуцибельными.

### **Цель и методы изучения биохимической активности микроорганизмов в микробиологической практике**

Для определения способности микроорганизмов ферментировать углеводы (сахаролитические свойства) используют короткий и длинный «пестрый ряд». К первому относят жидкие среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. В состав среды Гисса входят пептонная вода, 1% углерода, 0,3 % индикатора (Андреде). Изменение цвета индикатора на розовый указывает на ферментацию углевода до кислоты. При расщеплении углевода до кислоты и газообразных продуктов, кроме того, наблюдается заполнение газом поплавка.

Изучение протеолитических свойств проводится методом Мореля - образование индола при посеве МПБ сопровождается окрашиванием индикаторной бумаги, пропитанной 1% раствором щавелевой кислоты в розовый цвет. Выделение сероводорода - индикаторная бумажка, пропитанная уксусно - кислым свинцом, чернеет.

### **Прямые и косвенные методы определения подвижности микроорганизмов**

Определение подвижности изучаемых микроорганизмов чаще проводят косвенным методом. Производят посев исследуемой культуры в столбик полужидкого агара. Это позволяет определить отношение культуры к молекулярному кислороду. Критерием учета и оценки является характер роста: рост только сверху среды - культура является аэробом, только в нижней части среды - анаэробом, сверху по уколу - факультативным анаэробом, рост на некотором расстоянии от поверхности среды - микроаэрофил.

При этом способе посева у факультативно- анаэробных микроорганизмов можно определить подвижность. Рост строго по уколу - культура неподвижна, рост диффузный - культура подвижна. Прямой метод изучения подвижности заключается в непосредственном микроскопировании живых микроорганизмов в препаратах «раздавленная капля».

### **Антибиотики: понятие, классификация антибиотиков по способу получения, химической структуре, механизму и спектру действия.**

Термин «антибиотик» был предложен С. Ваксманом в 1942 г. и обозначал продукты микроорганизмов, которые в малых концентрациях убивают или задерживают размножение других микроорганизмов. Но такое понятие исключает антимикробные химиопрепараты другого происхождения.

Антагонизм в мире микробов – распространенное явление, которое известно очень давно. Его наблюдали и даже использовали такие ученые как Л. Пастер, Жубер, Маннасеин, Полотебнов и др. Однако, впервые, в 1929 г. случайно Флеминг обнаружил штамм пенициллиума (*P. notatum*), продукты которого задерживали рост стафилококков. И лишь в 1940 г. Х. Флори и Э. Чейн получили стабильный препарат очищенного пенициллина – первого антибиотика, нашедшего широкое применение в клинике (за это открытие они вместе с Флемингом получили Нобелевскую премию).

С тех пор открыты и синтезированы десятки тысяч антимикробных химиопрепаратов, но лишь немногие из них оказались пригодными для клинического использования, сочетая высокую антибактериальную активность с необходимыми фармакологическими параметрами, прежде всего с безвредностью.

Существует множество классификаций антибиотиков, основанных на различных принципах.

**По происхождению** антибиотики бывают:

природные – продуцируемые различными микроорганизмами: актиномицетами – синтезируют большинство антибиотиков 80%; плесневыми грибами – синтезируют  $\beta$ -лактамы, фузидиевую кислоту; бактериями (бациллами, эубактериями, псевдомонадами и др.) – бацитрацин, полимиксин и др.;

полусинтетические – путем биосинтеза получают природный антибиотик, а затем его химически модифицируют;

синтетические – синтезируют химическим путем, это анналы природных антибиотиков, либо вновь синтезированные химические вещества.

**По типу действия** антибиотики делятся на:

бактерицидные – приводящие к гибели бактерии;

бактериостатические – ингибирующие рост и размножение бактерий, что в итоге приводит к их гибели.

Антибиотики **по спектру антимикробной активности** принято разделять на препараты узкого спектра действия – когда препарат активен в отношении небольшого количества разновидностей бактерий; широкого спектра действия – препараты действуют на большое количество разновидностей бактерий.

**По механизму антимикробного действия** антибиотики подразделяются на:

- ингибиторы синтеза клеточной стенки,
- ингибиторы синтеза белка на рибосомах,
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот,
- ингибиторы функции цитоплазматической мембраны.

Одной из главных классификаций антибиотиков является классификация **по химической структуре**, основанная на базисном сходстве молекул. Выделяют  $\beta$ -лактамы, содержащие  $\beta$ -лактамное кольцо, отвечающее за их антимикробную активность. При разрушении  $\beta$ -лактамного кольца, они теряют свою эффективность. Все  $\beta$ -лактамы обладают бактерицидным эффектом.

Включают пенициллины:

- **природные** – бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин и др. – узкого спектра действия. К ним чувствительны грамположительные бактерии (кроме MRSA, MRSE), некоторые грамотрицательные бактерии (*Neisseriae*), спирохеты, анаэробы (*B. fragilis*);
- **полусинтетические**:

- аминопенициллины (амоксициллин, ампициллин), спектр действия шире – на грамотрицательные бактерии, грамположительные бактерии, анаэробы, *H. pylori*,

- устойчивые к  $\beta$ -лактамазам – оксациллин – узкого спектра – на грамположительные бактерии.

- карбоксипенициллины – карбенициллин, тикарциллин – на грамположительные и грамотрицательные бактерии, кроме продуцируемых  $\beta$ -лактамазы,

- уреидопенициллины – азлоциллин, мезлоциллин – на грамположительные и грамотрицательные бактерии (но чувствительны к  $\beta$ -лактамазам) – широкого спектра действия,

- ингибиторозащищенные - широкого спектра действия, используется клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам - эти вещества имеют  $\beta$ -лактамное кольцо, за счет этого такие антибиотики не инактивируются  $\beta$ -лактамазами.

**Цефалоспорины** - один из наиболее обширных классов антибиотиков. По последовательности внедрения различают 4 поколения, которые отличаются по спектрам активности и фармакологическим свойствам. Общая особенность всех поколений - отсутствие клинически значимой активности в отношении MRSA, энтерококков и листерий.

К первому поколению относят - цефазолин, цефалексин и др. - узкого спектра действия - наибольшая активность в отношении грамположительных (кроме MRSA), некоторых грамотрицательных.

Второе поколение - цефуроксим, цефаклор - широкого спектра действия - на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Третье поколение - цефтриаксон, цефотиксим, цефоперазон - широкого спектра действия - на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Четвертое поколение - цефепим, цефпиром - широкого спектра действия - активен в отношении продуцентов  $\beta$ -лактамаз, в частности *Ps. aeruginosa* и других неферментирующих грамотрицательных бактерий и грамположительных микроорганизмов.

Ингибиторозащищенные - цефоперазон (сульбактам) - широкого спектра, к нему чувствительны неферментирующие грамотрицательные бактерии и энтеробактерии, продуцируемые  $\beta$ -лактамазы.

**Монобактамы** - азтреонам - применяется один антибиотик узкого спектра действия и используется для лечения инфекций, вызванных аэробной грамотрицательной микрофлорой, устойчивой к  $\beta$ -лактамазам, не действует на неферментирующие грамотрицательные бактерии.

**Карбапенемы** - имипенем (циластатин, карбапенем) широкого спектра действия. Применяются при лечении тяжелых жизнеугрожающих инфекций (препараты резерва). Действуют на многие грамположительные и грамотрицательные бактерии и анаэробные бактерии (кроме MRSA), на *Ps. aeruginosa* и другие неферментирующие грамотрицательные бактерии.

**Тетрациклины** - [первые тетрациклины были открыты еще в конце 40-х гг.] - полусинтетические (доксциклин), природные (тетрациклин) - обладают бактериостатическим эффектом - широкого спектра действия, однако сейчас многие бактерии к ним резистентны, действуют на некоторые грамположительные и грамотрицательные бактерии (вибрионы, листерии, бруцеллы, *H. pylori*, сибирской язвы, чумы, туляремии, спирохет, боррелий, риккетсий, хламидий, микоплазм и др.).

**Гликопептиды** - ванкомицин, тейкопланин (природные) [ванкомицин применяется с 1958 г., тейкопланин - с середины 80-х гг.]. Это препараты выбора при инфекциях, вызванных MRSA, MRSE, а также энтерококками, устойчивыми к ампициллину и аминогликозидам.

**Оксазолидиноны** - линезолид - новый класс синтетических антимикробных химиопрепаратов. Основное значение имеет как препарат для терапии инфекций, вызванных полирезистентными грамположительными кокками (MRSA, MRSE). Обладает бактериостатическим эффектом. Не действует на грамотрицательные микроорганизмы.

**Рифампицины** - рифампицин [применяется с 70-х гг.] - широкого спектра активности, но быстро формируется устойчивость. Обладает бактерицидным эффектом. Применяется для лечения туберкулеза.

**Полимиксины** - полимиксин В, полимиксин М - [были получены в конце 40-х гг.] - узкого спектра действия, высокотоксичны. Обладают бактерицидным действием, эффективны в отношении грамотрицательных бактерий.

**Аминогликозиды** - канамицин, стрептомицин (I поколение) - [получен в 1944 г.], гентамицин (II поколение), амикацин (III поколение). Оказывают бактерицидное действие в отношении грамотрицательных (НГОб), грамположительных (кроме MRSA).

**Макролиды** - на грамположительные микроорганизмы (кроме MRSA), возбудители дифтерии, спирохеты, хламидии, микоплазмы, обладает бактериостатическим эффектом:

- полусинтетические - азитромицин, кларитромицин, рокситромицин,
- природные - спирамицин, эритромицин, олеандомицин.

**Линкозамиды** - природный линкомицин, полусинтетический клиндамицин - узкого спектра действия в отношении

грамположительных (кроме MRSA) и анаэробных неспорообразующих микроорганизмов. Оказывает бактериостатическое действие. Быстро формируется устойчивость.

**Хинолоны** - [используются с начала 60-х гг.] - включают нефторированные хинолоны и фторхинолоны - налидиксовая кислота, пипелидовая кислота (в основном действуют на грамотрицательные микроорганизмы):

- фторхинолоны (ранние) - норфлоксацин, флорксацин, ципрофлоксацин,
- фторхинолоны (новые) - левофлоксацин, спарфлоксацин и др.,
- фторхинолоны более широкого спектра действия - на грамположительные микроорганизмы, грамотрицательные микроорганизмы.

**Нитроимидазолы** - метронидазол, тинидазол, орнидазол - синтетические антибиотики с повышенной активностью в отношении анаэробных инфекций и протозойных. Бактерицидный эффект.

### **Механизмы антимикробного действия антибиотиков.**

Общим для всех антимикробных химиопрепаратов (АМХ) является избирательность их действия. То есть они поражают такие мишени у микроорганизмов, которые отсутствуют в клетках макроорганизма. Еще одной особенностью действия АМХ является то, что они действуют на макроорганизмы в фазе активного роста и размножения. Это связано с тем, что АМХ вмешиваются в метаболизм микроорганизмов, обычно не повреждая готовые структуры. Этим можно объяснить их эффективность в отношении патогенных бактерий, так как они должны для значимой колонизации организма быстро размножаться и активно метаболизировать. Поэтому антибиотики при хронических инфекциях менее эффективны, чем при острых, и едва ли полезны при бессимптомном или малосимптомном носительстве болезнетворных бактерий, репликативная активность которых, в подобных случаях, не отличается от нормофлоры.

**По механизму антимикробного действия** антибиотики подразделяются на:

- ингибиторы синтеза клеточной стенки:

- клеточная стенка бактерий - идеальная мишень для высокоизбирательного антибактериального эффекта, т. к. ее структурная основа - пептидогликан уникальна для прокариот и отсутствует у эукариотных клеток;
- антипептидогликановые антибиотики действуют бактерицидно, вызывая лизис бактерий, исключение составляют хламидии, микоплазмы;
- β-лактамы связываются с транспептидазами, препятствуя, тем самым, завершению синтеза пептидогликанового каркаса;
- гликопептиды, циклосерин подавляют образование гликопептидных субъединиц и их полимеризацию в гликопептидные цепи.

- ингибиторы синтеза белка на рибосомах:

- по ряду признаков белоксинтезирующий аппарат прокариот отличается от рибосом эукариотических клеток. Бактериальные рибосомы состоят из меньших по размеру субъединиц (30s и 50s, что в сумме составляет 70s), у эукариот - 40s и 60s, что в сумме составляет 80s, более мелких РНК. Известно несколько точек приложения таких препаратов - это блокаторы 30s субъединиц рибосом (т. е. прерывают процесс до начала синтеза);
- блокаторы 50s субъединиц рибосом (обрывает процесс удлинения пептидных цепей);
- инактиваторы фермента транслоказы, что обрывает процесс удлинения пептидных цепей.

- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот:

- существует три способа:

- 1) блокада синтеза предшественников пуринопиримидиновых оснований (сульфаниламиды, триметоприм),
- 2) подавление репликации ДНК (хинолоны, нитроимидазолы, нитрофураны),
- 3) инактивация РНК-полимераз, что блокирует транскрипцию, т. е. синтез матричных РНК.

- ингибиторы функции цитоплазматической мембраны:

- полимиксины действуют как катионные детергенты, т. е. повреждают фосфолипидный матрикс клеточных мембран (т. к. мембраны бактерий и эукариот имеют много общего). Менее избирательны, следовательно, менее токсичны (сейчас не применяются);

- полиеновые антибиотики повреждают эргостерол ЦПМ грибов, что приводит к их гибели, т. е. применяют в лечении грибковых инфекций.

### **Антибиотикорезистентность микроорганизмов, ее механизмы.**

Активность антимикробных препаратов не является постоянной, а снижается со временем, что обусловлено формированием лекарственной устойчивости (резистентности). Резистентность – это неизбежное биологическое явление и предотвратить его практически невозможно.

Резистентность к антимикробным препаратам (АМП) имеет огромное социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением, чаще требуют госпитализации, увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, ухудшают прогноз для пациентов. При неэффективности препаратов выбор приходится на средства второго или третьего ряда, которые, зачастую, более дороги, менее безопасны и не всегда доступны. Все это повышает прямые и косвенные экономические затраты, а также повышает риск распространения резистентных штаммов в обществе. Необходимо учитывать глобальные тенденции в развитии резистентности.

Антибиотикорезистентность – это устойчивость к АМХ. Резистентность может быть природной и приобретенной.

**Природная устойчивость** – обусловлена отсутствием у некоторых микроорганизмов мишеней для АМХ (например, микоплазмы и хламидии не чувствительны к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, т. к. у них нет клеточной стенки), либо непроницаемости для данного препарата (например, у грамотрицательных бактерий клеточная стенка непроницаема для бензилпенициллина). Такая устойчивость постоянна и прогнозируема, она закодирована в хромосомных генах и является видовым признаком.

**Приобретенная устойчивость** – это свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Уже, начиная с 1940 г., («эра антибиотиков») бактерии стали очень быстро приспосабливаться, постепенно формируя устойчивость ко всем новым препаратам.

Возникновение антибиотикорезистентности может быть связано с изменениями в самой бактериальной хромосоме, возникающими в результате мутаций. Такой вид устойчивости называется хромосомной устойчивостью. Передаваться хромосомная устойчивость может при всех видах генетического обмена. Кроме того, возможно формирование внехромосомной устойчивости, что наблюдается значительно чаще. Ее основным механизмом является приобретение генов резистентности (г-генов), переносимых транспозонами и плазмидами. Плазида, содержащая г-гены, называется R-плазмидой. Они могут обеспечивать устойчивость либо к одному антибиотику, либо к нескольким. Полирезистентность возникает и в том случае, если бактериальная клетка содержит несколько разных R-плазмид.

Важно понимать, что антибиотики способствуют лишь селекции резистентных штаммов, из которых формируется устойчивая популяция – вплоть до устойчивого вида, как это случилось для пенициллинрезистентных стафилококков (резистентностью к природным пенициллинам обладают 90-98% циркулирующих штаммов *S. aureus*).

Приобретенная изменчивость непредсказуема! Известны следующие биохимические механизмы антибиотикоустойчивости бактерий:

- Инактивация антибиотиков – один из главных механизмов устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам. Микроорганизмы продуцируют  $\beta$ -лактамазы – ферменты, разрушающие  $\beta$ -лактамное кольцо и приводящие к разрушению антибиотиков. Все  $\beta$ -лактамазы делятся на 4 класса: А, В, С, D (некоторые из них являются БЛРС (бета-лактамазами расширенного спектра) – В, С, D).  $\beta$ -лактамазы встречаются у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов (важным исключением являются микроорганизмы рода *Streptococcus*).

Важным примером служит появление в 70-х гг. и по настоящее время метициллинрезистентных стафилококков, и, прежде всего *S. aureus* – MRSA (метициллинрезистентный *S. aureus*) – которые являются одним из ведущих возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций.

грамположительные бактерии (стафилококки) обычно продуцируют внеклеточные  $\beta$ -лактамазы. Они относятся к индуцибельным ферментам, причем в качестве индуктора выступают сами антибиотики, отсюда увеличение

дозировки не усиливает антибактериальный эффект, так как это ведет к гиперпродукции ферментов.

У грамотрицательных бактерий  $\beta$ -лактамазы концентрируются в периплазматическом пространстве или связаны с внутренней мембраной. Они часто конститутивны, т. е. продуцируются на постоянном уровне, который не меняется под влиянием антибиотиков, отсюда увеличение дозировки иногда помогает продлить резистентность (*N. g.* чувствительны к бензилпенициллину, но последние 30 лет его дозировку приходилось увеличивать).

- Модификация мишени действия антибиотиков. Мишень для  $\beta$ -лактамы-транспептидазы - изменение структуры белков рибосом 70S лежит в основе устойчивости к стрептомицину, аминогликозидам, макролидам, тетрациклинам и др. антибиотикам. Изменение структуры ДНК-гираз приводит к формированию устойчивости к хинолонам; РНК-полимераз - к рифампицину, пенициллинсвязывающих белков - к  $\beta$ -лактамам и др.
- Активное выведение антибиотиков из микробной клетки (эффлюкс) - наличие у микроорганизмов специальных транспортных систем, осуществляющих выведение препарата, в результате чего, он не успевает достичь своей мишени (например, *Ps. aeruginosa* выводит карбапенемы. Таким образом, выводится большинство других антибиотиков - тетрациклины, макролиды, хинолоны и др.).
- Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки - вследствие особенностей строения клеточной стенки у Гр+ и Гр- бактерий - наблюдается и разная чувствительность этих микроорганизмов к антибиотикам. Например, оболочка Гр- бактерий имеет поверхностную мембрану и служит барьером для гидрофобных АХП (тетрациклинов, аминогликозидов, макролидов и др.). Гидрофильные препараты осуществляют проникновение через поры клеточной стенки. В результате мутаций возможна полная или частичная утрата поринов, что обеспечивает резистентность к одной или нескольким группам антибиотиков ( $\beta$ -лактамам, аминогликозидам и др.). Это наименьший специфичный механизм устойчивости.
- Формирование метаболического «шунта» - образование бактериями «обходного пути» метаболизма для биосинтеза белка-мишени, который оказывается нечувствительным к данному химиопрепарату - механизм, который лежит в основе резистентности к сульфаниламидным препаратам.

Важно помнить, что микроорганизмы зачастую используют не один механизм резистентности, а сразу несколько.

### **Пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.**

Человечество начинает осознавать угрозу распространения бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Всемирная организация здравоохранения, совместно с Европейским союзом в 2001 г. приняла документ под названием «Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к АМХ». Стратегия включает меры, направленные на:

- осознание серьезности проблемы резистентности на государственном уровне;
- мониторинг антибиотикорезистентности в отделении, больнице, регионе для адекватного подхода к эмпирической терапии;
- внедрение разумного использования антибиотиков путем реализации мер образовательного характера на разном уровне.

Меры образовательного характера на разном уровне включают:

1. Применение антимикробных химиопрепаратов строго по показаниям.
2. Избегать применения антимикробных химиопрепаратов с профилактической целью.
3. Ограничение свободной продажи антимикробных химиопрепаратов в аптечной сети.
4. Ограничение распространения средств гигиены (мыло, зубные пасты, крема, гели и т.д.), содержащих антибактериальные вещества. Использовать только с лечебной целью.
5. Отказ от применения в ветеринарной практике (для ускоренного роста, профилактики и лечения заболеваний животных) антимикробных химиопрепаратов, используемых в медицине.
6. Отказ от использования антимикробных химиопрепаратов в качестве консервантов пищевых продуктов.
7. Адекватный выбор режима антимикробной химиотерапии.

Кроме этих мер систематически получают новые химиопрепараты, которые отличаются от существующих механизмом антибактериального действия. Перспективным направлением является химическая модификация антибиотиков с защищенными активными группами, устойчивыми к бактериальным ферментам.

### **Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.**

Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам делятся на 2 группы: диффузионные и методы разведения.

Диффузионные методы: с использованием дисков с антибиотиками; с помощью E-тестов.

Методы разведения: разведение в жидкой питательной среде (бульоне); разведение в агаре

При определении чувствительности **диско-диффузионным методом** на поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности (обычно эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland) и затем помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35<sup>0</sup>-37<sup>0</sup> С в течение 18 часов учитывают результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах (рис. 1).

Рис. 1. Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.

Определение чувствительности микроорганизма с помощью E-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску E-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (рис. 2). В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской E-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Рис. 2. Определение чувствительности микроорганизмов с помощью E-тестов.

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

**Методы разведения** основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например от 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон) или в агар. Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещают в бульон с антибиотиком или на поверхность агара в чашке. После инкубации в течение ночи при температуре 35-37<sup>0</sup>С проводят учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) или на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать минимальной подавляющей концентрацией (МПК). Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл (рис. 3).

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

Рис. 3. Определение значения МПК методом разведения в жидкой питательной среде.

*Интерпретация результатов определения чувствительности.*

На основании получаемых количественных данных (диаметра зоны подавления роста антибиотика или значения МПК) микроорганизмы подразделяют на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные. Для разграничения этих трех категорий чувствительности (или резистентности) между собой используют так называемые пограничные концентрации (breakpoint) антибиотика (или пограничные значения диаметра зоны подавления роста микроорганизма).

Пограничные концентрации не являются неизменными величинами. Они могут пересматриваться, в зависимости от изменения чувствительности популяции микроорганизмов. Разработкой и пересмотром критериев интерпретации занимаются ведущие специалисты (химиотерапевты и микробиологи), входящие в специальные комитеты. Одним из них является Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS). В настоящее время стандарты NCCLS признаны в мире и используются как международные для оценки результатов определения чувствительности бактерий при многоцентровых микробиологических и клинических исследованиях.

Существуют два подхода к интерпретации результатов определения чувствительности: микробиологический и клинический. Микробиологическая интерпретация основана на анализе распределения значений концентраций антибиотика, подавляющих жизнеспособность бактерий. Клиническая интерпретация основана на оценке эффективности антибактериальной терапии.

**Чувствительные микроорганизмы (susceptible)**

Клинически к чувствительным относят бактерии (с учетом параметров, полученных *in vitro*), если при лечении стандартными дозами антибиотика инфекций, вызываемых этими микроорганизмами, наблюдают хороший терапевтический эффект.

При отсутствии достоверной клинической информации подразделение на категории чувствительности базируется на совместном учете данных, полученных *in vitro*, и фармакокинетики, т.е. на концентрациях антибиотика, достижимых в месте инфекции (или в сыворотке крови).

### **Резистентные микроорганизмы (resistant)**

К резистентным (устойчивым) относят бактерии, когда при лечении инфекции, вызванной этими микроорганизмами, нет эффекта от терапии даже при использовании максимальных доз антибиотика. Такие микроорганизмы имеют механизмы резистентности.

### **Микроорганизмы чувствительные с увеличенной экспозицией (intermediate)**

Инфекция, вызванная такими штаммами, может иметь различный терапевтический исход. Однако лечение может быть успешным, если антибиотик используется в дозировке, превышающей стандартную, или инфекция локализуется в месте, где антибактериальный препарат накапливается в высоких концентрациях.

С микробиологической точки зрения к бактериям с промежуточной резистентностью относят субпопуляцию, находящуюся в соответствии со значениями МПК или диаметра зон, между чувствительными и резистентными микроорганизмами. Иногда штаммы с промежуточной резистентностью и резистентные бактерии объединяют в одну категорию резистентных микроорганизмов. Необходимо отметить, что клиническая интерпретация чувствительности бактерий к антибиотикам является условной, поскольку исход терапии не всегда зависит только от активности антибактериального препарата против возбудителя. Клиницистам известны случаи, когда при резистентности микроорганизмов, по данным исследования *in vitro*, получали хороший клинический эффект. И наоборот, при чувствительности возбудителя может наблюдаться неэффективность терапии. В определенных клинических ситуациях, когда недостаточно результатов исследования чувствительности обычными методами, определяют минимальную бактерицидную концентрацию. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) - наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9% микроорганизмов от исходного уровня в течение определенного периода времени. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) - это наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9% микроорганизмов от исходного уровня в течение определенного периода времени.

Значение МБК используют при терапии антибиотиками, обладающими бактериостатическим действием, или при отсутствии эффекта от антибактериальной терапии у особой категории больных. Частными случаями для определения МБК могут быть, например, бактериальный эндокардит, остеомиелит или генерализованные инфекции у пациентов с иммунодефицитными состояниями.

В заключение хотелось бы отметить, что на сегодняшний день не существует методов, которые позволили бы с абсолютной достоверностью прогнозировать клинический эффект антибиотиков при лечении инфекционных болезней. Однако, данные результатов определения чувствительности могут служить хорошим ориентиром клиницистам для выбора и коррекции антибактериальной терапии.

Таблица 1. Критерии интерпретации чувствительности бактерий.

### **Принципы эмпирической и рациональной терапии.**

Рациональную (этиотропную) антибактериальную терапию клиницисты проводят с учетом результатов бактериологического исследования, включающего выделение возбудителя из клинического материала, его идентификацию и определение чувствительности к антибиотикам.

В случае если возбудитель неизвестен, назначение антибактериальной терапии осуществляется эмпирическим путем. В этом случае основываются на вероятном спектре возбудителей и знании об их антибиотикорезистентности в данном конкретном стационаре и регионе. При этом, такая терапия должна назначаться в максимально ранние сроки.

### **Принципы классификации бактерий.**

Основной задачей классификации и систематики является распределение всех микроорганизмов, обладающих определённой степенью однородности, по группам, которые называют таксонами, а также установление родственных связей между ними. В основе современной систематики микроорганизмов лежат фенотипические признаки: морфологические, физиологические, биохимические.

Морфологические признаки характеризуют форму и структуру микробной клетки; физиологические – особенности роста микроорганизма на искусственных питательных средах в определённых условиях культивирования (температура, pH и др.), а также морфологию колоний на твёрдых средах и характер роста на жидкой среде; биохимические – тип окислительного и пластического метаболизма, ферментацию углеводов, протеолитические и другие признаки.

### **Понятия: вида микроорганизмов, внутривидовых категорий, штамма, клона.**

Вид определяют как эволюционно сложившуюся совокупность особей, имеющих единый тип организации, который в стандартных условиях проявляется сходными фенотипическими признаками: морфологическими, физиологическими, биохимическими и др. Однако генетические механизмы, лежащие в основе изменчивости микроорганизмов, обеспечивают только относительную стабильность перечисленных признаков, которые в пределах одного и того же вида могут варьировать. Отсюда сложившиеся понятия о вариантах (варах) микроорганизмов, отличающиеся отдельными признаками от стандартных видов. Так, различают морфовары, биовары, ферментовары, резистенсвары, фаговары, серовары, эковары, и патовары, которые отличаются по морфологическим, биологическим, ферментативным признакам, резистентностью к антибиотикам и фагам, экологическим нишам и патогенностью соответственно. Виды, связанные генетическим родством, объединяют в роды, роды – в семейства. Высшими таксономическими категориями являются царства и подцарства.

В микробиологии широко применяются специальные термины: штамм, клон, чистая культура. Штаммом называют культуру, выделенную из определённого источника, или из одного и того же источника в разное время. Обычно штаммы обозначают либо протокольными номерами, либо по источнику выделения (человек, животное, внешняя среда), либо по местности (городу), где он был выделен. Штамм – более узкое понятие, чем вид. Штаммы одного и того же вида могут быть идентичными или различаться по некоторым признакам, не выходящим за пределы вида.

Клоном называют культуру микроорганизма, выделенную из одной клетки (одноклеточная культура).

Чистая культура представляет собой микробные особи одного и того же вида, выращенные из изолированной колонии, выращенной на твёрдой питательной среде.

### **Бинарная номенклатура бактерий.**

Для обозначения микроорганизмов применяется биномиальная номенклатура, предложенная ещё в XVIII веке К. Линнеем. Согласно данной номенклатуре, первое слово означает род. Оно пишется с прописной буквы и является производным от какого-либо термина, характеризующего морфологический признак, или от фамилии автора, открывшего или изучившего данный микроорганизм. Второе слово обозначает вид. Оно пишется с прописной буквы и является производным существительного, определяющего источник происхождения микроба, название вызываемого им заболевания, фамилию автора или другие отличительные признаки. Например, *Bacillus anthracis* означает, что данный микроб относится к роду *Bacillus* – спорообразующих бактерий и является возбудителем сибирской язвы (anthrax).

### **Этапы определения вида бактерий при проведении бактериологического метода.**

В практических бактериологических лабораториях принадлежность выделенной культуры к определённому виду (идентификация культуры) проводится по фенотипическим признакам: морфологическим, тинкториальным (отношение к красителям, особенно к окраске по Граму), культуральным, биохимическим (ферментация углеводов, образование индола, сероводорода и других соединений), антигенным в серологических реакциях *in vitro*.

### **Методы идентификации бактерий с учётом морфо-тинкториальных, культуральных, биохимических свойств, подвижности.**

В ходе бактериологического метода получают чистую культуру возбудителя, которую необходимо идентифицировать – отнести к тому или иному виду, роду. Для этого изучают морфо-тинкториальные признаки данного микроорганизма, путём приготовления фиксированного препарата, его окраски и микроскопирования. Имеют значение культуральные особенности, которые определяют при изучении характера роста исследуемой культуры на плотных и жидких питательных средах. Биохимические свойства выявляют, учитывая результаты посева микроорганизмов на специальные, дифференциально-диагностические среды, например среды Гисса. Способность к образованию индола и сероводорода в белковой среде (МПБ), можно также обнаружить используя специальные индикаторные бумажки. Подвижность микробов определяют непосредственно наблюдая их движения в препарате «раздавленная капля» в процессе микроскопирования в живом состоянии или косвенно – внеся укол исследуемую культуру в столбик полужидкого агара. Полученные свойства сопоставляют с табличными данными, например международного «Определителя бактерий» Д.Берджи.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
2. Пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.
3. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, ее механизмы.
4. Механизмы антимикробного действия антибиотиков.
5. Антибиотики: понятие, классификация антибиотиков по способу получения, химической структуре, механизму и спектру действия.
6. Прямые и косвенные методы определения подвижности микроорганизмов.
7. Цель и методы изучения биохимической активности микроорганизмов в микробиологической практике.
8. Цель и последовательность выполнения 3 и 4 этапов бактериологического метода выделения аэробов.
9. Ферменты микроорганизмов; их значение в метаболизме клетки. Конститутивные и индуцибельные ферменты.
10. Классификация микроорганизмов по типам питания. Механизмы поступления питательных веществ в бактериальную клетку.
11. Принципы эмпирической и рациональной антибактериальной терапии.

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

### **1. ПОТРЕБНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФАКТОРАХ РОСТА:**

- 1) аэротолерантность;
- 2) паразитизм;
- 3) прототрофность;
- 4) инфекционность;
- 5) ауксотрофность;

### **2. КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, В ОСНОВНОМ:**

- 1) анаэробы;
- 2) метатрофы;
- 3) ауксотрофы;
- 4) фототрофы;
- 5) аутотрофы;

### **3. ФЕРМЕНТЫ, ПОСТОЯННО СИНТЕЗИРУЮЩИЕСЯ В МИКРОБНЫХ КЛЕТКАХ.:**

- 1) протеолитические;
- 2) сахаролитические;
- 3) индуцибельные;
- 4) конститутивные;
- 5) липолитические;

### **4. ФЕРМЕНТЫ, СИНТЕЗ КОТОРЫХ ЗАВИСИТ ОТ НАЛИЧИЯ СУБСТРАТА:**

- 1) индуцибельные;
- 2) конститутивные;
- 3) экзоферменты;
- 4) эндоферменты;
- 5) субстратные;

### **5. ПО ТИПУ ПИТАНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ВИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ:**

- 1) фотогетеротрофы;
- 2) хемоаутотрофы;
- 3) фотоаутотрофы;
- 4) хемогетеротрофы;
- 5) факультативные анаэробы;

### **6. ЦЕЛЬ III ЭТАПА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА:**

- 1) обнаружение возбудителя в исследуемом материале;
- 2) получение изолированных колоний;
- 3) накопление чистой культуры;
- 4) идентификация чистой культуры;
- 5) разобщение микробных клеток;

### **7. ЦЕЛЮЮ МИКРОСКОПИИ КУЛЬТУРЫ НА III ЭТАПЕ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ЯВЛЯЕТСЯ ОПРЕДЕЛЕНИЕ.:**

- 1) морфологической и тинкториальной однородности;
- 2) вирулентности;
- 3) антигенных свойств;
- 4) биохимической активности;
- 5) генотипа;

### **8. АНТИБИОТИКИ ДЕЙСТВУЮТ НА БАКТЕРИИ В.:**

- 1) стадии спорообразования;
- 2) лаг-фазе;
- 3) лог-фазе;

- 4) стационарной фазе;
  - 5) фазе отмирания;
9. «ИДЕАЛЬНАЯ» МИШЕНЬ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ КЛЕТКУ:
- 1) синтез клеточной стенки;
  - 2) функции ЦПМ;
  - 3) спорообразование;
  - 4) синтез белка;
  - 5) синтез нуклеиновых кислот;

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. У троих воспитанников детской школы-интерната был диагностирован шигеллез.

**Вопрос 1:** К какой группе по типу питания относятся бактерии, вызывающие инфекционные заболевания человека?;

**Вопрос 2:** Особенности микроорганизмов данной группы?;

- 1) Хемогетеротрофы.;
  - 2) Используют в качестве источника энергии и углерода органические вещества, синтезирующиеся в клетках человеческого организма; являются паразитами. Такой тип взаимоотношений сложился в процессе эволюции, и способствует сохранению видов этих микроорганизмов.;
2. При проведении бактериологической диагностики инфекционных заболеваний часто используется «пёстрый ряд»

**Вопрос 1:** Какие компоненты входят в состав сред "пестрого ряда"?

**Вопрос 2:** Назначение "пестрого ряда".;

- 1) Полужидкие среды Гисса, входящие в состав "пестрого ряда", готовятся на основе мясоептонного бульона (МПБ), содержат углеводы (глюкоза, лактоза, маннит) и индикатор (ВР).;
  - 2) Предназначен для изучения биохимических свойств микроорганизмов с целью их идентификации. Основой является определение промежуточных и (или) конечных продуктов метаболизма. Таксономическое значение имеют сахаролитические и протеолитические свойства бактерий, которые определяют на дифференциально-диагностических средах, входящих в состав «пёстрого ряда».;
3. Ребенок в возрасте двух лет заболел пневмонией. При бактериологическом исследовании была выделена культура *Klebsiella pneumoniae* и определена ее антибиотикограмма: амикацин – 12 мм, цефтриаксон – 29 мм, ципрофлоксацин – 25 мм, имипенем – 17 мм, цефоперазон – 24 мм.

**Вопрос 1:** Каким методом была определена антибиотикограмма и каковы критерии учета и оценки?;

**Вопрос 2:** Какие из предложенных антибиотиков целесообразно применять?;

- 1) Антибиотикограмма определена диско-диффузионным методом. Критерий учета – диаметр зоны задержки роста, критерий оценки – сопоставление полученных величин с табличными данными и отнесение культуры к одной из трех категорий – устойчивые, умеренно устойчивые, чувствительные.;
- 2) Целесообразно применять препараты, к которым культура чувствительна.;

#### 8. Рекомендованная литература по теме занятия

- **обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

- **дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 4.** Нормальная микрофлора организма человека. Неспецифические факторы защиты организма человека.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Иммуитет – это способ защиты организма от генетически чужеродных веществ экзогенного и эндогенного происхождения, направленный на поддержание и сохранение гомеостаза и биологической (антигенной) индивидуальности каждого организма и вида в целом. Естественные барьеры неспецифической (антигеннезависимой) иммунной защиты разделяют на механические и химические. Основные механические барьеры – кожа и слизистые оболочки – составляют первую линию защиты против возбудителя инфекции, секреты этих барьеров уничтожают либо ингибируют микроорганизмы. Если последние преодолевают эти поверхностные барьеры, то они сталкиваются с разнообразными конституциональными факторами (вторая линия неспецифических защитных механизмов. Последние принято делить на гуморальные и клеточные. Нормальная микрофлора является одним из первых барьеров, обеспечивающих неспецифическую резистентность и гомеостаз внутренней среды организма. Естественная микрофлора человека является неоднородной по составу и по роли отдельных ее компонентов в норме и при патологии. В ней заложена способность не только к нормофизиологическим функциям, но и к агрессии по отношению к организму-хозяину. В норме естественная микрофлора тела достаточно устойчива к действию повреждающих агентов, однако, под влиянием таких факторов как лекарственные препараты (антибиотики, гормоны, иммунодепрессанты), хирургические вмешательства, а также на фоне инфекционных и хронических заболеваний возможно нарушение качественного и количественного состава нормальной микрофлоры (дисбактериоз). При этом наряду со снижением колонизационной резистентности биотопа создаются благоприятные условия для размножения эндогенных условно-патогенных микроорганизмов, а также экзогенных патогенных бактерий, что в свою очередь приводит к развитию патологических процессов в пораженном органе и организме в целом.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать**, **уметь** окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Нормальная микрофлора организма человека: понятие, характеристика.**

Естественная аутомикрофлора тела – единый природный комплекс, состоящий из совокупности гетерогенных микробсообществ в различных участках человеческого организма.

Ткани и полости, сообщающиеся с внешней средой – кожа, верхние дыхательные пути, ротовая полость, желудочно-кишечный тракт, слизистые глаз и носа, – являются открытыми биологическими системами и колонизированы микроорганизмами.

Естественную микрофлору любых биотопов подразделяют по происхождению на постоянную (резидентную) и случайную (транзитную). В постоянной микрофлоре различают две фракции – облигатную и факультативную. Облигатная микрофлора является главной составляющей любого микробсообщества, обеспечивая колонизационную резистентность, участвуя в процессах ферментации, иммуностимуляции и т.д. Типичными представителями облигатной микрофлоры являются бифидобактерии и лактобактерии, колонизирующие кишечник и влагалище. Факультативная микрофлора в норме составляет меньшую часть постоянных обитателей биотопа, также выполняя важные физиологические функции. Кроме того, существуют микроорганизмы, связанные со стенками полостей (пристеночная микрофлора) и микроорганизмы, не фиксирующиеся в биотопе (полостная микрофлора).

#### **Микрофлора различных экотопов организма.**

Микроорганизмы, в норме колонизирующие кожные покровы, представлены различными видами коагулазоотрицательных и реже коагулазоположительных стафилококков (*Staphylococcus spp.*), сарцинами (*Sarcina spp.*), коринебактериями (*Corynebacterium spp.*), пропионибактериями (*Propionibacterium spp.*) и др. На коже

здоровых людей обычно отсутствуют энтеробактерии (*E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.* и др.), дрожжеподобные грибы рода *Candida*, бактероиды (*Bacteroides spp.*). Количество аэробных микроорганизмов на коже здорового человека в среднем составляет  $10^2$ - $10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup>, а анаэробных –  $10^4$ - $10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Концентрация микроорганизмов на коже более высокая в местах с повышенной влажностью. При этом анаэробные бактерии локализуются, в основном, на участках богатых солями железа.

Нормальная микрофлора половых путей способствует сохранению здоровья женщины. Ведущее место в вагинальном микробиоценозе занимают лактобациллы (80-90%), количество которых может достигать  $10^9$  КОЕ/мл. Выделяют более 6 видов лактобацилл: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* и др., объединенных общим названием – палочки Додерлейна (Doderlein). Кроме лактобацилл в состав влагалищного биотопа входят более 40 других видов бактерий, но их удельный вес не превышает 5%, а количество, в основном, составляет  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/мл. Это *Bifidobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* и др. Реже в составе нормальной микрофлоры обнаруживаются *Mobiluncus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Gardnerella vaginalis*. Поэтому при микроскопии мазка из влагалища, окрашенного по Граму, обнаружение единичных эпителиальных клеток соответственно фазе менструального цикла, единичных лейкоцитов (или их отсутствие), доминирование лактобацилл (другие морфотипы либо отсутствуют, либо их количество исчисляется единичными микробными клетками в редких полях зрения) свидетельствует о нормофлоре. Морфологически лактобациллы представляют собой прямые или слегка изогнутые грамположительные не образующие спор палочки размером 1,0-10,0 x 0,5-1,2 мкм.

ЖКТ, особенно толстая кишка, является наиболее заселенным экотопом организма человека. Качественный и количественный состав микрофлоры меняется в течение жизни и зависит от возраста, характера питания и др. У детей, находящихся на грудном вскармливании, доминирует бифидофлора. Это крупные грамположительные прямые или разветвленные палочки. При искусственном вскармливании и при переходе на смешанное питание отмечается увеличение разнообразия грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Микрофлора толстой кишки взрослого человека включает около 500 видов микроорганизмов и составляет до 30% сухой массы фекалий. Поэтому при микроскопическом исследовании выявляют разнообразные грамположительные и грамотрицательные палочки, кокки, извитые формы. Количество морфоваров микроорганизмов у взрослого человека может достигать 40, а в среднем составляет около 15. Наиболее многочисленными и постоянными обитателями кишечника взрослого являются бифидобактерии ( $10^8$ - $10^{10}$  КОЕ/г.), лактобактерии ( $10^6$ - $10^8$  КОЕ/г.), типичные *E. coli*, энтерококки, стафилококки и др.

### **Функции нормальной микрофлоры человека, влияющие на состояние здоровья.**

Колонизационная резистентность – комплекс механизмов поддержания стабильности микробиоценоза биотопов. Одним из этих механизмов является межмикробный антагонизм – образование продуктов, обладающих выраженной антагонистической активностью (молочная, уксусная кислоты и др.). Значительное место в поддержании колонизационной резистентности принадлежит конкуренции различных видов бактерий за пищевые субстраты и сайты адгезии на клетках эпителия.

Естественная микрофлора пищеварительного тракта также выполняет следующие физиологические функции:

1. Стимуляция процесса формирования иммунной системы у новорожденных и поддержание иммунного статуса у взрослых;
2. Участие в обменных процессах (синтез ферментов, витаминов группы В, К, D, поддержание водно-солевого баланса, регуляция газовой среды кишечника);
3. Участие в биохимических процессах пищеварения (ферментация пищевых субстратов, регуляция моторно-эвакуаторной функции кишечника);
4. Инактивация экзогенных и эндогенных токсических продуктов при помощи механизмов биотрансформации и биodeградации и т.д.

### **Дисбактериоз: понятие, причины возникновения, меры профилактики, микробиологическая диагностика**

Дисбактериоз – это клиничко-микробиологический синдром, который характеризует патологически измененное состояние микробиоценоза конкретного биотопа.

Факторами, способствующими возникновению дисбактериоза, являются:

- применение антибиотиков, гормонов, иммунодепрессантов, лучевой терапии;
- хирургические операции;
- длительное воздействие неблагоприятных экологических факторов в быту и на производстве;
- острые кишечные инфекции, различные хронические заболевания желудка, кишечника и печени;

- нервно-психические стрессы;
- голодание, нерациональное питание, авитаминоз.

Причины развития дисбактериоза у детей:

- в период новорожденности: осложненное течение беременности и родов; бактериальный вагиноз у матери; позднее прикладывание к груди;
- у детей раннего возраста: неблагоприятный преморбидный фон; раннее искусственное вскармливание; частые ОРВИ на первом году жизни; инфекционная и (или) соматическая патология;
- у детей дошкольного и школьного возраста: нерациональное питание; наличие хронических заболеваний; гормональная перестройка организма;
- вне зависимости от возраста: длительная антибактериальная терапия; длительная терапия гормонами, нестероидными противовоспалительными препаратами; кишечные инфекции; оперативные вмешательства; первичные и вторичные иммунодефициты; проведение химио- и (или) лучевой терапии онкологических больных.

Дисбактериоз кишечника – это количественные и качественные изменения микрофлоры, сопровождающиеся дефицитом бифидобактерий и другой защитной микрофлоры (лактобактерий, типичных эшерихий) и размножением различных условно-патогенных энтеробактерий, которые при нормальном биоценозе совсем отсутствуют или составляют незначительную часть общей микрофлоры.

Дисбактериоз кишечника является актуальной проблемой в педиатрии. Он служит предвестником отклонений в физиологическом статусе ребенка. При дисбактериозе кишечника происходит угнетение иммунобиологических факторов организма и повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям, склонность к их затяжному, хроническому течению и развитию осложнений. При дисбактериозе кишечника нарушаются процессы пищеварения и всасывания всех пищевых ингредиентов (белков, жиров, углеводов и др.), что приводит к гипотрофии, анемии, гиповитаминозам, ферментопатии. Снижение активности лизоцима способствует повышению уровня гистамина в органах и тканях и развитию различных аллергических реакций (пищевая аллергия, атопический дерматит и т.д.). У 93-98 % детей с различными формами пищевой аллергии регистрируется дисбактериоз кишечника. Снижение колонизационной резистентности при дисбактериозе кишечника может привести к развитию эндогенной инфекции.

Основным методом диагностики дисбактериоза кишечника является бактериологический метод.

С дисбактериозом влагалища связано развитие бактериального вагиноза (БВ). БВ – это неинфекционный невоспалительный синдром, характеризующийся чрезмерной концентрацией облигатно- и факультативно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов и резким снижением или отсутствием лактобацилл.

БВ – распространенная патология влагалища женщин детородного возраста. По данным различных исследований его обнаруживают у 21-33 % женщин. Наибольшую опасность БВ представляет для беременных женщин, т. к. может быть причиной многих осложнений в течении беременности, родов, послеродового периода у матери и патологией плода и новорожденного. Поэтому важной является профилактика БВ, своевременная диагностика и лечение, в т.ч. с использованием пробиотиков. Основной метод диагностики бактериального вагиноза – микроскопический. Для мазков от больных с бактериальным вагинозом, окрашенных по Граму, характерны следующие закономерности:

- наличие большого количества клеток поверхностных слоев вагинального эпителия, представленных в основном “ключевыми клетками”. Это зрелые клетки плоского эпителия, по всей поверхности которых в большом количестве адсорбированы грамвариабельные палочки и/или коккобактерии;
- лактобациллы отсутствуют или определяются как единичные не во всех полях зрения;
- наличие большого или массивного количества грамвариабельных и/или грамотрицательных палочек и/или коккобактерий (*Bacteroides spp.*, *Gardnerella vaginalis*), а также изогнутых грамвариабельных палочек (*Mobiluncus spp.*);
- лейкоцитарная реакция, как правило, отсутствует.

### Принципы коррекции нормальной микрофлоры человека

- Назначение пробиотиков
- Назначение пребиотиков
- Назначение синбиотиков
- Назначение метаболитов бактерий-симбионтов
- Назначение аутопробиотиков

Наиболее распространенным является использование специально подобранных пробиотических микроорганизмов (преимущественно представителей нормальной микрофлоры пищеварительного тракта) в виде пробиотических

лекарственных препаратов, биологически активных пищевых добавок или продуктов питания (пробиотики).

#### **Основные группы пробиотиков (Шендеров Б.А.):**

- пробиотики на основе живых микроорганизмов (монокультуры или их ассоциации);
- пробиотики на основе метаболитов или структурных компонентов микроорганизмов - представителей нормальной микрофлоры;
- пробиотики на основе соединений микробного или иного происхождения, стимулирующих рост и активность бифидобактерий и лактобацилл - представителей нормальной микрофлоры;
- пробиотики на основе комплекса живых микроорганизмов, их структурных компонентов, метаболитов в различных сочетаниях и соединений, стимулирующих рост представителей нормальной микрофлоры;
- пробиотики на основе генно-инженерных штаммов микроорганизмов, их структурных компонентов и метаболитов с заданными характеристиками;
- пробиотические продукты питания на основе живых микроорганизмов, их метаболитов, других соединений микробного, растительного или животного происхождения, способные поддерживать и восстанавливать здоровье через коррекцию микробной экологии организма хозяина.

#### **Требования к микроорганизмам, используемым в качестве основы пробиотиков:**

- должны быть изолированы из организма тех видов животных и человека, для которых они и будут предназначены;
- должны обладать полезным воздействием на организм хозяина, подтвержденным лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями;
- при введении в больших количествах они должны обладать минимальной способностью к транслокации из просвета пищеварительного тракта во внутреннюю среду макроорганизма; при длительном использовании они не должны вызывать побочные эффекты;
- должны обладать колонизационным потенциалом (быть устойчивыми к низким значениям pH, желчным кислотам, антимикробным субстанциям, продуцируемым индигенной микрофлорой; хорошо адгезироваться к эпителию соответствующих слизистых оболочек);
- должны обладать стабильными характеристиками как в клиническом, так и в технологическом плане;
- должны обладать высокой скоростью роста и размножения в условиях, близким таковым в кишечном тракте;
- должны иметь четкую физиолого - биохимическую и генетическую маркировку как для исключения фальсификации, так и для периодического контроля идентичности исходных пробиотических штаммов и производственных культур в процессе их эксплуатации.

#### **Микроорганизмы, используемые при изготовлении пробиотиков:**

*Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*

*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*

*Escherichia coli*

*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*

*Lactococcus spp.*

*Leuconostoc spp.*

*Pediococcus spp.*

*Propionibacterium acnes*

*Saccharomyces boulardii*

*Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *S. salivarius subsp. thermophilus*

*Clostridium butyricum*

*Bacillus subtilis*

Систематическое использование пробиотических препаратов, биологически активных добавок и продуктов питания повышает колонизационную резистентность, усиливает иммунитет, предотвращает развитие аллергических осложнений, нормализует пул гистамина и щавелевой кислоты, оказывает гипохолестеринемический

противоопухолевый и другие положительные эффекты на организм человека. Исходя из этого, создание пробиотиков и продуктов функционального питания на основе пробиотических штаммов микроорганизмов, обладающих специфическим позитивным действием на организм человека, рассматривают как стратегическое направление альтернативной медицины, направленное на поддержание и восстановление здоровья человека.

К сожалению, с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков стала накапливаться информация, что положительный эффект пробиотиков даже при длительном применении нередко носит транзитный характер, а порой и полностью отсутствует. Более того, хотя безопасность использования пробиотических препаратов, добавок и продуктов питания является достаточно хорошо установленным фактом, появились отдельные сообщения о возникновении у лиц, длительно принимающих живые пробиотические микроорганизмы, различных осложнений (лактоидемии у грудных детей, аутоиммунные заболевания, аллергические проявления, оппортунистические инфекции, дисбиотические состояния, обусловленные назначением больших доз пробиотических препаратов и т.д.).

Одной из главных причин случаев неэффективности пробиотиков может быть чужеродность входящих в их состав микроорганизмов, недостаточный учет высокой видовой, индивидуальной и анатомической специфичности автохтонной микрофлоры лиц, которым назначают эти средства коррекции микробиологических нарушений (Шендеров Б.А.).

Во все больших масштабах для профилактики и коррекции микробиологических нарушений в пищеварительном тракте в настоящее время используют, так называемые, **пребиотики**, селективно стимулирующие рост «полезных» микроорганизмов (прежде всего, бифидобактерий и лактобацилл), и как результат, улучшающие разнообразные физиологические функции и метаболические реакции, связанные с функционированием симбиотической микрофлоры (устойчивость к инфекциям, снижение риска возникновения злокачественных новообразований в толстом кишечнике, улучшение биодоступности кальция и магния, колонизации кишечника грудных детей полезными микроорганизмами, снижение уровня сывороточного холестерина и т.д.).

Среди пребиотиков наиболее популярны поли- и олигофруктаны, соевые олигосахариды, галактоолигосахариды, изолированные из природных источников или получаемые биотехнологическим или синтетическим методами (Шендеров Б.А.). Также в качестве пребиотических субстанций используются также различные блокаторы адгезии и ингибиторы роста патогенных и оппортунистических микроорганизмов (лектины, антиадгезины, модуляторы синтеза секреторных иммуноглобулинов, дефензины различных типов, структурные компоненты пробиотических микроорганизмов, их метаболиты и т.д.).

Пребиотики реализуются самостоятельно, в виде обогащающих добавок к разнообразным продуктам питания, а также в комбинации с пробиотическими микроорганизмами (**синбиотики**).

**Понятие иммунитета:** Иммунитет - совокупность биологических явлений (процессов и механизмов, направленных на сохранение постоянства внутренней среды (гомеостаза) и защиты организма от инфекционных и других генетических чужеродных для него антигенов.

#### **Виды иммунитета:**

**Врожденный** (видовой) - представляет собой невосприимчивость одного вида животных или человека к микроорганизмам, вызывающим заболевания у других видов (невосприимчивость человека к чуме собак, невосприимчивость животных к возбудителям гонорей и кори).

**Приобретенный** - невосприимчивость к антигену чувствительного к нему организма человека, животных и др., приобретаемая после встречи с ним. Он может быть естественным и искусственным. Каждый из них может быть активным и пассивным. **Активный иммунитет** - обусловлен активным вовлечением в процесс иммунной системы при встрече с данным антигеном. **Пассивный** приобретается за счет введения в организм уже готовых антител и иммунных лимфоцитов, взятых у другого иммунизированного организма.

**Постинфекционный** (естественный активный) - приобретается после перенесенного инфекционного заболевания. Может быть стерильным (сохраняется при освобождении организма от возбудителя болезни) и нестерильным (сохраняется в течение времени нахождения возбудителя в организме (туберкулез, сифилис)).

**Поствакцинальный** (искусственный активный) - после введения в организм вакцины.

**Трансплацентарный** (естественный пассивный) - антитела передаются плоду через плаценту и с материнским молоком.

**Постсывороточный** (искусственный пассивный) - после введения сывороток и иммуноглобулинов.

Активный иммунитет может быть пожизненным (постинфекционный) либо сохраняться несколько месяцев или лет (поствакцинальный). Пассивный иммунитет в отличие от активного длится непродолжительное время (от 3-6

месяцев при трансплацентарном до 15-20 дней при постсывороточном), до тех пор, пока "чужие" антитела сохраняются в организме.

Антимикробный - направлен против различных видов микроорганизмов, принадлежащим к определенным видам и антигенным вариантам (сероварам).

Антитоксический - иммунная защита направлена на обезвреживание бактериальных токсинов (токсины возбудителей газовой гангрены, столбняка, ботулизма, дифтерии).

Местный - невосприимчивость чувствительной ткани в области входных ворот инфекции (кожа - бациллы сибирской язвы, слизистая кишечника - энтеробактерии).

Системный (общий) - вовлечение в процесс всей иммунной системы.

### **Факторы неспецифической резистентности:**

Врожденные (эволюционно более древние) многообразны, но их объединяет неспецифичность действия. Естественные барьеры на путях проникновения инфекции разделяют на механические и химические. Основные механические барьеры - кожа и слизистые оболочки составляют первую линию защиты против возбудителя инфекции, секреты этих барьеров уничтожают либо ингибируют микроорганизмы. Если последние преодолевают эти поверхностные барьеры, то они сталкиваются с разнообразными конституциональными факторами (вторая линия неспецифических защитных механизмов). Последние принято делить на гуморальные и клеточные.

#### **Кожа:**

Кожные покровы практически непреодолимы для большинства патогенов. Удалению патогенов способствует слущивание омертвевших клеток и замещение их новыми, а также секреты кожных желез, проявляющие прямую бактерицидную активность либо снижающие рН кожи до значений, неблагоприятных для размножения микроорганизмов. Нарушение их целостности, например, при травмах и ожогах создает серьезные предпосылки для инфицирования.

#### **Слизистые оболочки:**

Слизистые оболочки (СО) полости рта, глотки пищевода, мочевыводящих путей, влагалища и ряда других органов покрыты многослойным эпителием (слизистые оболочки кожного типа), тогда как просвет желудка, кишечника, воздухоносных путей, матки и маточных труб выстлан тонким однослойным эпителием секреторного и всасывательного характера (слизистые оболочки кишечного типа). Слизистые оболочки (особенно кишечного типа) легко травмируются под влиянием разнообразных причин, делая подлежащие ткани (внутренняя среда организма) доступными для микроорганизмов. На уровне слизистых оболочек существует множество разных механизмов противомикробной защиты.

Слизистые оболочки кишечного типа покрыты слоем слизи (отсюда их название) - организованной гелеобразной гликопротеидной решеткой, задерживающей и фиксирующей различные объекты, в том числе микроорганизмы. Слизь гидрофильна и доступна для диффузии различных веществ, образующихся в организме, в том числе бактерицидных (например, лизоцима и пероксидаз). Реснички мерцательного эпителия, погруженные в слизь, формируют волны однонаправленных колебательных движений и тем самым перемещают пленку слизи и заключенные в ней объекты по поверхности эпителия. Примером может служить вынос слизи из воздухоносных путей (мукоцилиарный транспорт).

Сурфактант - в нижних отделах воздухоносных путей и в дыхательном отделе легкого слизи нет, но поверхность эпителия покрыта слоем ПАВ, способного фиксировать и уничтожать многих возбудителей.

Собственный слой слизистой оболочки кишечного типа - лимфоидная ткань, содержащая множество иммунокомпетентных клеток, осуществляющих защитную функцию.

### **Гуморальные факторы**

#### **Комплемент:**

Микроорганизмы, преодолевшие поверхностные барьеры, встречают факторы второй линии защиты. Значительная часть компонентов этого комплекса индуцибельна и находится в тканях в неактивной форме; активацию вызывают различные вещества или медиаторы. Ключевые факторы - комплемент и фагоциты - дополняются прочими биологически активными продуктами.

Система комплемента состоит, по меньшей мере, из 26 белков, опосредующих воспалительные реакции с участием

гранулоцитов и макрофагов, ее составляющие также участвуют в реакциях свертывания крови и способствуют межклеточным взаимодействиям, необходимым для процессинга АГ; вызывают лизис бактерий и вирусов. В условиях физиологической нормы компоненты системы находятся в неактивной форме. Белки системы комплемента обозначают латинской буквой С и арабскими цифрами (С1, С2,...С9 и т.д.).

Пути активации комплемента:

Классический путь. Каскад протеазных реакций, начинающихся с С1-компонента, известен как классический путь активации; он чаще реализуется в присутствии комплексов антиген-антитело (АГ-АТ) с участием в связывании антигена по крайней мере одной молекулы JgM или двух молекул IgG. Далее в реакции участвуют последовательно активированные компоненты С4, С2, С3, С5. На компоненте С5 путем присоединения белков С6-С9 образуется мембраноатакующий комплекс, который нарушает целостность мембраны, и клетка погибает в результате осмотического лизиса.

Если активация комплемента по классическому пути происходит при участии иммунного комплекса эритроцит-антиэритроцитарный Ig, происходит гемолиз эритроцита; если иммунный комплекс состоит из бактерий и антибактериального Ig - происходит лизис бактерий (бактериолиз).

Альтернативный путь. Проникновение бактерий, особенно грамотрицательных, запускает более быстрый путь - альтернативный путь активации, реализующийся без участия антител. Каскадная цепная реакция начинается со взаимодействия антигена с протеинами В, D и пропердином (Р) с последующей активацией компонента С3. Далее реакция идет также, как при классическом пути с образованием мембраноатакующего комплекса.

Лектиновый путь: инициируется маннозосвязывающим белком сыворотки крови, который после взаимодействия с остатками маннозы на поверхности микробных клеток катализирует С4. Далее присоединяются С2, С3-С5, С6-С9.

В процессе активации комплемента образуются продукты протеолиза его компонентов - субъединицы С3а, С3b, С5а и С5b и др., являющиеся биологически активными веществами - хемоаттрактантами (С3а и С5а), опсонинами (С3b), ускоряющими фагоцитоз и способствующими более быстрой элиминации возбудителя.

#### **Пропердин:**

В альтернативном пути активации комплемента необходимо участие сывороточного белка пропердина, который активен лишь в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и требует участия еще двух сывороточных белков: факторов В и D. Фактор D в активной форме является протеиназой, расщепляющей фактор В, с образованием фрагмента Вb. Последний способен в комплексе с С3b играть роль С3-конвертазы. Фрагменты С3а и С5а названы анафилактическими по совокупности биологического эффекта - освобождение гистамина из тучных клеток, хемотаксис фагоцитов, нарушение проницаемости сосудов и др. Играют роль в патогенезе иммунных комплексов. Основные функции компонентов комплемента в защитных реакциях: стимуляция фагоцитоза, нарушение целостности клеточных стенок микроорганизмов мембраноповреждающих комплексов (МПК), особенно у видов, устойчивых к фагоцитозу (например, гонококков, и индукция синтеза медиаторов воспалительного ответа, например ИЛ-1).

#### **Интерфероны:**

А. Айзексом и Д. Линдеманом в 1957 г. был открыт белок, который образуется в клетках макроорганизма, защищая их от вирусной инфекции. Он получил название интерферон. Его защитное действие оказалось неспецифическим, т. е. один и тот же интерферон защищал клетки от разных вирусов. В тоже время он обладал видовой специфичностью. Интерферон, образованный клетками человека, функционально активен только в организме человека, но не животных. Индукторы интерферона-интерфероногены (РНК-геномные вирусы, двунигчатые РНК, различные полианионы, бактериальные ЛПС). Интерфероны оказывают действие:

- 1) противовирусное;
- 2) противоопухолевое;
- 3) иммуномодулирующее;
- 4) радиопротективное.

Их подразделяют на три класса:  $\alpha$ -интерферон (лейкоцитарный),  $\beta$ -интерферон (фибробластный),  $\gamma$ -интерферон (иммунный).

#### **Лизоцим:**

Лизоцим продуцируется моноцитами крови и тканевыми макрофагами. Он вызывает лизис многих сапрофитных

бактерий, оказывая менее выраженное литическое действие на ряд патогенных микроорганизмов и неактивен в отношении вирусов.

Механизм бактериолитического действия лизоцима состоит в гидролизе связей между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в полисахаридных цепях пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий.

Заживление ран в области слизистых оболочек, имеющих контакт с большим количеством микроорганизмов, в том числе и патогенных, в известной степени объясняется наличием лизоцима

### **Трансферрин**

Трансферрин-б-глобулин, белок острой фазы, может взаимодействовать с Zn и Cu; переносит  $Fe^{3+}$ , участвует в регуляции концентрации свободного Fe, предотвращая его избыточное накопление и потерю его с мочой. Содержание его снижается при воспалительных процессах, нефротическом синдроме.

### **Клеточные факторы**

#### **Фагоцитоз:**

Фагоцитоз у млекопитающих осуществляют две системы клеток - полиморфоядерные лейкоциты (или гранулоциты) и макрофаги. Гранулоциты разделяют на нейтрофилы, базофилы и эозинофилы. Две трети всех гранулоцитов в крови человека составляют нейтрофилы. Чужеродные частицы поглощаются ими и деградируются их ферментными системами. Происхождение макрофагов: клетки предшественники в костном мозге промоноцит - моноцит (подвижные макрофаги крови). Последние остаются в циркуляции несколько часов, а затем мигрируют в ткани и дифференцируются в тканевые макрофаги. К макрофагально-моноцитарной системе относятся гистиоциты, купферовские клетки печени, свободные и фиксированные макрофаги селезенки, лимфоузлов, серозных полостей, легочные и перитонеальные.

Процесс фагоцитоза (или поглощения твердого объекта) состоит из 4-х стадий: хемотаксис, адсорбция, захватывание микробных клеток, внутриклеточное переваривание:

Хемотаксис - целенаправленное передвижение фагоцитов в направлении химического градиента хемоаттрактантов в окружающей среде. Способность к хемотаксису связана с наличием на мембране специфических рецепторов для хемоаттрактантов, в качестве которых могут выступать бактериальные компоненты, продукты регрессии тканей организма, активированные фракции системы комплемента - C5a, C3a, лимфокины - продукты лимфоцитов.

Адсорбция. Одним из условий успешного поглощения является эффективная адгезия к субстрату; образно говоря в отличие от бактерий, фагоциты не умеют "плавать", но хорошо "бегают", т.е. свои поглотительные свойства они способны реализовывать только на какой-либо плотной поверхности (например, на эпителии). В свою очередь подвижность бактерий существенно ограничивают опсонины (АТ, С3b, фибронектин, сурфактант), обволакивающие микроорганизмы и делающие поглощение более эффективным; последнее обусловлено прочностью рецептор-опосредованных взаимодействий опсонов с соответствующими рецепторами на мембране фагоцита (к Fc-фрагментам АТ, компонентам комплемента, фибронектину и др.). Отсутствие указанных рецепторов приводит к резкому снижению функциональной активности; например, врожденный дефицит С3b-рецепторов сопровождается высокой частотой бактериальных инфекций и даже выделен в отдельную нозологическую форму как синдром дефицита адгезивности лейкоцитов.

Поглощение и переваривание. Принципы поглощения у бактерий идентичны таковым у амёб: в результате образуется фагосома с заключенным внутри объектом. К ней устремляются лизосомы и выстраиваются по ее периметру. Затем оболочки фагосомы и лизосомы сливаются в фаголизосому. Некоторые бактерии, снабженные капсулой, могут быть устойчивы к действию лизосомальных ферментов, другая часть патогенов способна блокировать слияние фагосомы и лизосом. В подобных случаях фагоцитоз носит незавершенный характер, и возбудитель выживает в цитоплазме поглотившей его клетки.

#### **Завершенный и незавершенный фагоцитоз:**

Завершенный фагоцитоз начинается по мере поглощения микробов и других объектов. Происходит в фаголизосомах, образующихся за счет слияния первичных лизосом с фаголизосомами. Захваченные фагоцитами микроорганизмы погибают в результате осуществления механизмов микробоцидности этих клеток. Различают кислородозависимые механизмы микробоцидности, связанные с «окислительным взрывом», и кислородонезависимые механизмы, опосредованные катионными белками и ферментами (в т.ч. лизосом).

Незавершенный фагоцитоз. Многие вирулентные бактерии часто не погибают и могут длительно персистировать внутри фагоцитов. Факультативные и облигатные внутриклеточные паразиты после эндоцитоза сохраняют жизнеспособность и размножаются внутри фагоцитов, вызывая их гибель и разрушение. Механизмы,

обеспечивающие персистенцию микроорганизмов: препятствуют слиянию фагосом с лизосомами (токсоплазма, микобактерии туберкулеза), устойчивы к действию ферментов лизосом (гонококки, стафилококки), после эндоцитоза покидают фагосому и длительно персистируют в цитоплазме фагоцитов (риккетсии).

Презентативная функция макрофагов состоит в фиксации к антигенным эпитопам микроорганизмов. В этом виде они бывают представлены макрофагами для их специфического распознавания клеткам иммунной системы - Т-лимфоцитам.

### **Факторы, влияющие на фагоцитоз:**

Секреторная функция заключается в секреции биологически активных веществ-моноккинов мононуклеарными фагоцитами. К ним относятся вещества, оказывающие регулирующее действие на пролиферацию, дифференциацию и функции фагоцитов, лимфоцитов, фибробластов и др. Интерлейкин-1 (ИЛ-1) активирует многие функции Т-лимфоцитов, продукцию лимфокинов и интерлейкина-2 (ИЛ-2). ИЛ-1 и ИЛ-2 - являются клеточными медиаторами, участвующими в регуляции иммуногенеза и разных форм иммунного ответа. Одновременно ИЛ-1 обладает свойствами эндогенного пирогена, поскольку он индуцирует лихорадку, действуя на ядра переднего гипоталамуса. Макрофаги продуцируют и секретируют такие важные регуляторные факторы, как простагландины, лейкотриены, циклические нуклеотиды с широким спектром биологической активности.

Фагоцитоз стимулируют антитела (опсонины), комплемент, соли Са, Mg, гормоны (адреналин, гистамин). Микробы имеют приспособления, препятствующие фагоцитозу. Это капсула (чумная палочка, пневмококки, некоторые виды стрептококков), лейкоцидин, разрушающий лейкоциты (у стафилококков). Угнетают фагоцитоз ацетилхолин, кортикостероиды, антигистаминные вещества (димедрол).

### **Значение фагоцитоза в функционировании иммунной системы:**

Макрофаги играют важную роль в реализации иммунных реакций организма. Они распознают, захватывают чужеродную субстанцию и осуществляют ее "переработку", в результате которой гидролизуются большая, неиммунная часть этой субстанции. Молекулы, имеющие признаки антигенной чужеродности не расщепляются, а концентрируются в мембране фагоцита (процессинг и презентация антигена), причем иммуногенность такого антигена значительно возрастает. Макрофаг представляет процессированный антиген Т-хелперам. После распознавания антигена Т-хелперы выделяют медиаторы, оказывающие помощь В-лимфоцитам в индукции, пролиферации и трансформации в антителопродуценты. Макрофаги имеют большое значение также в цитотоксическом противоопухолевом иммунитете.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Возрастные особенности формирования нормальной микрофлоры у новорожденных и детей раннего возраста (на примере микробиоценоза кишечника и вагины).
2. Влияние метода родоразрешения, условий пребывания в роддоме, характера вскармливания ребенка на формирование нормальной микрофлоры ребенка.
3. Микрофлора урогенитального тракта: микробный пейзаж, роль в физиологических процессах, методы изучения.
4. Функции нормальной микрофлоры человека, влияющие на состояние здоровья.
5. Роль нормальной микрофлоры человека в развитии эндогенных инфекций.
6. Микрофлора пищеварительного тракта: микробный пейзаж, роль в физиологических процессах, методы изучения.
7. Микробиологическая диагностика дисбактериоза.
8. Понятие «иммунитет» и его виды.
9. Неспецифические клеточные факторы защиты организма человека: кожа и слизистые оболочки, нормальная микрофлора; фагоцитоз; их характеристика.
10. Микрофлора кожи: микробный пейзаж, роль в физиологических процессах, методы изучения.

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ОСНОВОПОЛОЖНИК УЧЕНИЯ О НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЕ:

- 1) П.В. Циклинская;
- 2) Л.Г. Перетц;
- 3) Р. Кох;
- 4) И.И. Мечников;
- 5) Д.И. Ивановский;

2. ПРИ ГРУДНОМ ВСКАРМЛИВАНИИ ПРЕОБЛАДАЮЩЕЙ ФЛОРОЙ КИШЕЧНИКА ЯВЛЯЮТСЯ:

- 1) коринебактерии;
- 2) кишечные палочки;
- 3) бифидобактерии;
- 4) энтерококки;
- 5) клостридии;

3. ЭКЗОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОСТАВ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ:

- 1) пол;
  - 2) возраст;
  - 3) заболевания желудочно-кишечного-тракта;
  - 4) характер питания;
  - 5) аномалии развития зубочелюстной системы;
4. В СОСТАВЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПЕРЕДНИХ ОТДЕЛОВ НОСА ДОМИНИРУЮТ:
- 1) стрептококки;
  - 2) стафилококки;
  - 3) энтеробактерии;
  - 4) лактобациллы;
  - 5) энтеровирусы;
5. ФАГОЦИТОЗ - ЭТО:
- 1) специфический фактор резистентности;
  - 2) феномен бактериофагии;
  - 3) реакция взаимодействия антиген-антитело;
  - 4) приобретенная реакция организма;
  - 5) врожденная реакция организма;
6. ФАКТОРЫ, УСКОРЯЮЩИЕ ФАГОЦИТОЗ (ОПСОНИНЫ):
- 1) комплемент, интерферон;
  - 2) антибиотики;
  - 3) комплемент, антитела;
  - 4) лейкоцидин, лизоцим;
  - 5) кортикостероиды;
7. ФАКТОРЫ, ПОДАВЛЯЮЩИЕ ФАГОЦИТОЗ:
- 1) антитела;
  - 2) антигистаминные препараты;
  - 3) комплемент;
  - 4) адреналин;
  - 5) гистамин;
8. АНТИФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ СВЯЗАНА С:
- 1) фимбриями;
  - 2) жгутиками;
  - 3) спорой;
  - 4) капсулой;
  - 5) цитоплазматической мембраной;
9. ТРАСФЕРРИН:
- 1) мурамидаза;
  - 2) участвует в активации комплемента;
  - 3) обладает Fe-связывающей активностью;
  - 4) способен к самосборке;
  - 5) синтезируется лейкоцитами;
10. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ КОМПЛЕМЕНТА:
- 1) бактерицидная;
  - 2) противоопухолевая;
  - 3) фагоцитарная;
  - 4) репарационная;
  - 5) антителообразующая;

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. У пациента после повторного курса антибактериальной терапии появились жалобы на метеоризм, жидкий стул, чередующийся с запорами, снижение аппетита.

**Вопрос 1:** С чем, на Ваш взгляд, связано нарушение функции кишечника?;

**Вопрос 2:** Какое лабораторное исследование необходимо провести?;

**Вопрос 3:** Назовите препараты, применяемые для коррекции данного состояния.;

1) Дисбактериоз кишечника развился вследствие длительного приема антибактериальных препаратов.;

2) Бактериологическое исследование.;

3) Пробиотики (эубиотики): бифидумбактерин, бифиформ, линекс, энтерол, хилак-форте.;

2. У женщины во время прохождения профилактического осмотра взят мазок из влагалища. В бланке-ответе из лаборатории указано: эпителиальные клетки 4-5, лейкоциты 2-3, палочки Грам (+) единичные, «ключевые клетки» в большом количестве

**Вопрос 1:** Ваш диагноз?;

**Вопрос 2:** Ваши рекомендации пациентке?;

1) Бактериальный вагиноз.;

- 2) Пройти обследование для выявления причины развития бактериального вагиноза. Рекомендовать включить в комплексную терапию пробиотики, содержащие лактобактерии.;
3. При изучении фагоцитарной активности сегментоядерных лейкоцитов крови пациента с частыми респираторными заболеваниями в 40 из 100 клеток обнаружено 540 латексных частиц

**Вопрос 1:** Назовите цель проведения данного исследования? Какие показатели необходимо определить?;

**Вопрос 2:** Оцените полученные результаты.;

1) Определение фагоцитарной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов используют в клинической практике для оценки иммунного статуса индивидуума. Фагоцитоз является одним из основных клеточных неспецифических механизмов защиты организма человека. Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов оценивают фагоцитарный показатель и фагоцитарный индекс.;

2) Фагоцитарный показатель – процент нейтрофилов, содержащих частицы латекса (бактерии). В данном примере – 40%. Фагоцитарный индекс – среднее число латексных частиц (микроорганизмов), поглощенных одним фагоцитом. Для определения фагоцитарного индекса в препаратах подсчитывается 100 нейтрофилов и количество поглощенных ими частиц (бактерий). Фагоцитарный индекс равен  $13,5 (540/40)$ . Для оценки иммунного статуса с учетом данных показателей необходимо сопоставить их с нормой, установленной для каждого субъекта РФ и для данной возрастной категории. В норме для жителей Красноярского края фагоцитарный показатель должен составлять у взрослых 75-80%, у детей – 60%. Следовательно, у данного обследуемого изученные показатели снижены, что может свидетельствовать о снижении иммунитета.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 5.** Учение об инфекции и иммунитете. Иммунопрофилактика, иммунотерапия инфекционных заболеваний.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): В 1998 году в России принят закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней человека. В соответствии с этим законом вакцинация является частью государственной политики в области здравоохранения. Эффективность иммунопрофилактики многих инфекций доказана многолетним мировым опытом. Триумфом этого явилась ликвидация натуральной оспы во всем мире. Однако после определенного периода благополучия наблюдается увеличение заболеваемости многими инфекциями. Это связано с рядом причин: миграция и рост численности населения, урбанизация, скученности, низкий уровень жизни, изменения экологии, климата, эволюция микроорганизмов, большое число противопоказаний к вакцинации, отказ и необоснованный отвод от вакцинации и многие другие факторы. Вакцины спасают ежегодно жизнь трех миллионов детей. По расчетным данным с помощью новых вакцин, которые будут разработаны в ближайшие 5-15 лет, можно будет предотвратить гибель 8 млн. детей в год.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Вакцины. Понятие, современная классификация вакцин: живые, убитые, субклеточные, субвирионные, рекомбинантные, дивергентные, трансгенные. Достоинства и недостатки различных типов вакцин.**

Иммунопрофилактика - способ предупреждения инфекционных заболеваний в коллективе и у отдельных индивидуумов путём создания искусственного специфического иммунитета. Существует две основные формы иммунизации: активная - введение в организм микробных АГ (вакцин) с целью создания активного иммунитета; пассивная - введение в организм препаратов, содержащих специфические антитела (иммунные сыворотки, гамма-глобулины), с целью создания искусственного пассивного иммунитета.

Термин «вакцина» произошел от французского *vaccin* - корова. Его ввел Л. Пастер в честь Дженнера, применившего вирус коровьей оспы для иммунизации людей против натуральной оспы человека.

Вакцины - все препараты, используемые для искусственного создания приобретённого активного специфического иммунитета против определённых возбудителей или их токсинов. Они должны быть иммуногенными, безопасными, не реактогенными, не вызывать аллергических реакций, не обладать тератогенностью, онкогенностью; штаммы, из которых готовят вакцину, должны быть генетически стабильными, вакцина должна обладать длительным сроком хранения, производство ее должно быть технологичным, а способ применения - по возможности, простым и доступным для массового применения.

К вакцинам относят препараты, получаемые из бактерий, вирусов и других микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности. Их можно разделить на две основные группы: **инактивированные вакцины и живые вакцины.**

Инактивированные вакцины подразделяют на следующие подгруппы:

**Корпускулярные (цельновирионные) вакцины** представляют собой бактерии и вирусы, инактивированные путем химического (формалин, спирт, фенол) или физического (тепло, ультрафиолетовое облучение) воздействия. Для приготовления корпускулярных вакцин используют, как правило, вирулентные штаммы микроорганизмов, поскольку они обладают наиболее полным набором АГ, а для изготовления отдельных вакцин (например, антирабической культуральной) — аттенуированные штаммы. Примерами корпускулярных вакцин являются коклюшная (компонент АКДС), антирабическая, лептоспирозная, гриппозные цельновирионные инактивированные вакцины, вакцины клещевого и японского энцефалита и ряд других препаратов.

**Химические вакцины** представляют собой антигенные компоненты, извлеченные из микробной клетки, которые определяют иммуногенные потенции последней. Для их приготовления используют различные физико-химические методики. К такого рода вакцинам относятся вакцины менингококковые групп А и С полисахаридные, вакцина

гемофилус инфлюэнца в полисахаридная, вакцина пневмококковая полисахаридная, вакцина брюшнотифозная — Vi-АГ брюшнотифозных бактерий. Относительно ряда бактериальных вакцин может быть определена их химическая структура.

**Рекомбинантные вакцины.** Их примером является вакцина гепатита В, для производства которой применяют рекомбинантную технологию, встраивая субъединицу вируса в дрожжевые клетки. После завершения процесса культивирования дрожжей из последних выделяют белок HBsAg, который подвергают тщательной очистке от дрожжевых белков и используют в качестве иммуногенного компонента препарата.

Инактивированные бактериальные и вирусные вакцины выпускают как в сухом (лиофилизированном), так и в жидком виде. Последние, как правило, содержат консервант. Для создания полноценного иммунитета обычно необходимо двукратное или трехкратное введение инактивированных вакцин. Продолжительность развивающегося после этого иммунитета относительно кратковременна, и для поддержания его на высоком уровне требуется проведение ревакцинаций.

**Живые вакцины** изготавливают на основе аттенуированных штаммов со стойко закрепленной авирулентностью. Будучи лишенными способности вызывать инфекционную болезнь, они, тем не менее, сохраняют способность к размножению в организме вакцинированного. Развивающаяся вследствие этого вакцинальная инфекция, хотя и протекающая у большинства привитых без выраженных клинических симптомов, тем не менее, приводит к формированию, как правило, стойкого иммунитета. Вакцинные штаммы, применяемые в производстве живых вакцин, получают разными путями: путем выделения аттенуированных мутантов от больных (вакцинный штамм вируса краснухи); из внешней среды путем селекции вакцинных клонов (штамм СТИ сибирской язвы); длительного пассирования в организме экспериментальных животных (штамм 17D вируса желтой лихорадки). Иммунитет, развивающийся после прививок большинством ЖИВЫХ вакцин, сохраняется значительно дольше, чем после прививок инактивированными вакцинами. Так, после однократного введения коревой, краснушной и паротитной вакцин, продолжительность иммунитета достигает 20 лет, вакцины желтой лихорадки — 10, туляремийной вакцины - 5 лет.

Этим определяются и значительные интервалы между 1-й и последующей прививками данными препаратами. Вместе с тем, для достижения полноценного иммунитета против полиомиелита трехвалентная живая вакцина на 1-ом году жизни вводится трехкратно, а ревакцинации проводятся на 2-ом и 3-ем году жизни. Ежегодно осуществляется и иммунизация живыми гриппозными вакцинами.

Живые вакцины, за исключением полиомиелитной, выпускают в лиофилизированном виде, что обеспечивает их стабильность в течение срока годности.

Живые и инактивированные вакцины чаще используются в виде монопрепаратов. Единственным ассоциированным препаратом, выпускаемым в нашей стране, является АКДС-вакцина. Значительно большее количество ассоциированных вакцин выпускается за рубежом. К ним можно отнести вакцину против коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита (тетракок), вакцину против кори, эпидемического паротита и краснухи (MMR) и различные сочетания входящих в нее компонентов, ассоциацию АКДС-вакцины с полисахаридной вакциной гемофилус инфлюэнца В.

**Анатоксины.** Эти препараты представляют собой бактериальные экзотоксины, обезвреженные длительным воздействием формалина при повышенной температуре. Подобная технология получения анатоксинов, сохраняя антигенные и иммуногенные свойства токсинов, делает невозможным реверсию их токсичности.

В процессе производства анатоксины подвергаются очистке от балластных веществ (питательной среды, продуктов метаболизма и распада микробной клетки) и концентрации. Эти процедуры снижают их реактогенность и позволяют использовать для иммунизации небольшие объемы препаратов

Для активной профилактики токсинемических инфекций (дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, стафилококковой инфекции) применяют препараты анатоксинов, сорбированных на различных минеральных адсорбентах. В России в качестве последних используют гидроксид алюминия.

Адсорбция анатоксинов значительно повышает их антигенную активность и иммуногенность. Это обусловлено, с одной стороны, созданием «депо» препарата в месте его введения с постепенным поступлением антигенов в систему циркуляции, а с другой — адьювантным действием сорбента, вызывающего, благодаря развитию местного воспаления, усиление плазмацитарной реакции в регионарных лимфатических узлах.

Анатоксины выпускают в виде монопрепаратов (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый и др.) и ассоциированных препаратов (дифтерийно-столбнячный, ботулинический трианатоксин).

В последние годы разработан препарат коклюшного анатоксина, который в ряде зарубежных стран вошел в число

компонентов бесклеточной коклюшной вакцины. В России коклюшный анатоксин рекомендован к практическому применению в виде монопрепарата для вакцинации доноров, чью сыворотку (плазму) используют для изготовления иммуноглобулина человека коклюшного антитоксического, предназначенного для лечения тяжелых форм коклюша.

Для достижения напряженного антитоксического иммунитета препараты анатоксинов требуют, как правило, двукратного введения и последующей ревакцинации. При этом их профилактическая эффективность достигает 95-100% и сохраняется в течение нескольких лет.

Важной особенностью анатоксинов является также то, что они обеспечивают сохранение в организме привитого стойкой иммунологической памяти. Поэтому при повторном их введении людям, полноценно привитым 10 и более лет назад, происходит быстрое образование антитоксина в высоких титрах.

Именно это свойство препаратов обуславливает оправданность их применения при постэкспозиционной профилактике Дифтерии в очаге и столбняка в случае экстренной профилактики. Другой, не менее важной чертой анатоксинов, является их относительно низкая реактогенность, позволяющая свести к минимуму перечень противопоказаний к применению.

Дивергентные вакцины. В качестве вакцинных штаммов используют микроорганизмы, находящиеся в близком родстве с возбудителями инфекционных болезней. Антигены таких микроорганизмов индуцируют иммунный ответ, перекрестно направленный на антигены возбудителя. Наиболее известны и длительно применяются вакцина против натуральной оспы (из вируса коровьей оспы), БЦЖ для профилактики туберкулеза (из микобактерий бычьего туберкулеза).

### **Тактика применения вакцин. Адьюванты. Аутовакцины.**

Вакцинные препараты вводят внутрь, подкожно и/или внутривенно, парентерально, интраназально и ингаляционно. Способ введения определяют свойства препарата. Живые вакцины можно вводить подкожно (скарификацией), интраназально или перорально; анатоксины вводят подкожно, а неживые корпускулярные вакцины – парентерально. При массовых иммунизациях выбирают наиболее экономичный способ, обеспечивающий быстрое и эффективное создание иммунной прослойки (невосприимчивых лиц) в популяции, особенно в эпидемический период. По степени необходимости выделяют плановую (обязательную) вакцинацию и вакцинацию по эпидемиологическим показаниям. Первую проводят в соответствии с регламентированным календарем иммунопрофилактики наиболее распространенных или опасных инфекций. Вакцинацию по эпидемиологическим показаниям проводят для срочного создания иммунитета у лиц, подвергающихся риску развития инфекции.

**Адьювант** – вещество, неспецифически усиливающее иммунный ответ на антигены. По происхождению адьюванты могут быть: минеральные (минеральные коллоиды, растворимые соединения, кристаллоиды), растительные (сапонины), микробные (корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахаридобелковые комплексы), цитокины и пептиды со свойствами цитокинов; синтетические вещества (полинуклеотиды, пептиды, гликопептиды, липопептиды, полиэлектролиты), препараты тимусного происхождения, препараты костномозгового происхождения, сложные искусственные адьювантные системы.

Нет универсальных адьювантов, каждый имеет свои особенности. Существуют два основных способа действия адьювантов, один из них направлен на изменение свойства антигена, другой – на стимуляцию функций иммунной системы организма.

Влияние адьювантов на свойства антигена касается изменения его структуры, молекулярного веса, полимерности, растворимости и других физико-химических параметров антигена. В использовании адьювантов нуждаются высокоочищенные вакцины из бактериальных лизатов, анатоксины, рекомбинантные и синтетические вакцины.

Механизмы действия адьювантов:

- создание «депо» антигена, замедление его всасывания;
- появление воспалительной реакции;
- усиление реакции со стороны лимфатических узлов;
- изменение физико-химических параметров антигена.
- усиление синтеза белков;
- активация системы комплемента;
- усиление процессинга и презентации антигена Т-клеткам;
- усиление функции вспомогательных клеток;
- ускорение транспорта антигена к иммунокомпетентным клеткам;
- стимуляция пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-клеток и их взаимодействия;
- стимуляция образования цитокинов.

## **Гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины. Способы получения, применения.**

*Гомологичные сыворотки и иммуноглобулины.* Эти препараты представляют собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную путем фракционирования по методу Кона из сыворотки или плазмы здоровых людей, у которых отсутствуют антитела к ВИЧ, вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).

Действующим началом являются иммуноглобулины, обладающие активностью антител различной специфичности. Препараты содержат почти исключительно (95%) IgG; период их полувыведения из организма человека составляет около 4 нед., а максимальный уровень антител в крови после внутримышечного введения достигается в интервале 24-48 ч.

По своим свойствам иммуноглобулины человека (ИГЧ) подразделяют на 2 группы - ИГЧ нормальный (старое название противокоревой гамма-глобулин) и специфические ИГЧ. То обстоятельство, что для изготовления одной серии ИГЧ нормального используют кровь не менее чем от 1000 человек, позволяет получить препарат с высоким уровнем антител к возбудителям тех заболеваний, которые ранее перенесло большинство из них или против которых они были вакцинированы в плановом порядке: корь, коклюш, грипп, полиомиелит, гепатит А и др. Специфические иммуноглобулины (противостолбнячный, противоботулинический, против клещевого энцефалита, гепатита В, коклюшный антитоксический) получают из сыворотки (плазмы) доноров или целенаправленно привитых соответствующим препаратом или отобранной по результатам определения в них высокого уровня антител. За рубежом выпускают также ИГЧ антирабический, против вируса ветряной оспы, цитомегаловирусной инфекции. Помимо вышеперечисленных препаратов, предназначенных для внутримышечного введения, номенклатура ИГЧ включает и специально выпускаемые препараты, предназначенные для внутривенного введения, которые лишены антикомплементарных свойств, содержат большее количество фрагментов и предназначены исключительно для лечения инфекционных болезней. Необходимо иметь в виду, что ИГЧ, не предназначенные для внутривенного введения, не должны применяться последним способом, поскольку при этом может наступить развитие коллаптоидных реакций.

К группе ИГЧ для внутривенного введения, выпускаемых в России или рекомендованных к применению, относятся: ИГЧ нормальный, ИГЧ антистафилококковый, ИГЧ противоботулинический, ИГЧ противодифтерийный. Внутривенно также применяют специфическую иммунную плазму человека - антистафилококковую, антипротейную, антисинегнойную.

ИГЧ относятся к слабо реактогенным препаратам и единственным абсолютным противопоказанием к их применению с профилактической целью является наличие в анамнезе сведений о тяжелых аллергических реакциях на введение препаратов крови. При использовании ИГЧ, предназначенных для внутривенного введения, в целях профилактики коллаптоидных реакций необходимо соблюдать указания инструкций о разведении препарата и скорости его введения.

*Гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины.* Препараты гетерологичных сывороток используют в основном для экстренной профилактики и лечения токсинемических (столбняк, дифтерия, ботулизм, газовая гангрена), а также некоторых вирусных (бешенство, клещевой энцефалит, японский энцефалит, венесуэльский энцефаломиелит лошадей, лихорадка Эбола) и бактериальных (сибирская язва, лептоспироз) инфекций.

Помимо вышеуказанных препаратов выпускаются иммунные сыворотки, нейтрализующие яд змей (гюрзы, эфы, кобры) и паука каракурта.

Получение антитоксических и антимикробных сывороток основано на многократной иммунизации животных (в основном, лошадей) препаратами анатоксинов и токсинов (антитоксические сыворотки) или микробными клетками. Нативные сыворотки подвергают очистке от белковых фракций, не содержащих специфические АТ, и концентрируют. Являясь чужеродным для человека белком, они потенциально опасны, неся угрозу развития тяжелых аллергических реакций, в том числе сывороточной болезни и анафилактического шока.

## **Побочные эффекты при серотерапии и их профилактика. Работы А.М. Безредка.**

Препараты гетерологичных сывороток, являясь для организма человека чужеродным белком, при первом введении вызывают у значительной части привитых развитие сенсibilизации, а при повторном - развитие аллергических реакций немедленного типа, в том числе анафилактического шока. Аллергические реакции немедленного типа у лиц, сенсibilизированных ранее продуктами лошадиного происхождения, могут развиваться и после первого введения гетерологичных сывороток.

Наиболее грозным осложнением после применения сывороточных препаратов является анафилактический шок. Клиника данного осложнения, развивающегося, как правило, непосредственно после инъекции препарата, характеризуется развитием острой сердечно-сосудистой недостаточности и острого бронхоспазма.

Первые симптомы шока – беспокойство, общая слабость или возбуждение, чувство страха, головокружение, шум в ушах, холодный пот, боль за грудиной или в животе, затрудненное дыхание. В ряде случаев симптомам шока предшествует генерализованный зуд кожи, появление аллергических сыпей и отеков. В тяжелых случаях, особенно при отсутствии экстренной медицинской помощи, через 5-30 мин может наступить летальный исход.

Для профилактики развития анафилактического шока в 1907 году известный отечественный микробиолог А.М. Безредка разработал метод десенсибилизации – дробного введения сывороточных препаратов в малых дозах, снижающих чувствительность организма к сенсibiliзирующему агенту (аллергену).

Перед введением любой гетерологичной сыворотки обязательна постановка кожной пробы с разведенной 1:100 лошадиной сывороткой. Разведенную сыворотку вводят строго внутрикожно в сгибательную поверхность предплечья в объеме 0,1 мл. учет реакции проводят через 20 мин. Пробу считают *отрицательной*, если диаметр отека и/или покраснения, появляющегося на месте введения, меньше 1 см. Пробу считают *положительной*, если диаметр отека и/или покраснение достигают в диаметре 1 см и более.

При отрицательной кожной пробе неразведенную сыворотку вводят в объеме 0,1 мл подкожно в область средней трети плеча. При отсутствии местной или общей реакции через 30-60 мин внутримышечно вводят назначенную дозу сыворотки, подогретой до температуры 36<sup>0</sup>С. Максимальный объем препарата, вводимого в одно место, не должен превышать 10 мл. Больной, получивший сыворотку, должен находиться под наблюдением врача в течение часа.

При положительной кожной пробе, а также при развитии реакции на подкожное введение 0,1 мл неразведенной сыворотки, препарат применяют только по жизненным показаниям. Для десенсибилизации сыворотку, разведенную 1:100, вводят подкожно последовательно в объеме 0,5 мл, 2,0 мл, 5,0 мл с интервалами 15-20 мин, затем с теми же интервалами вводят подкожно 0,1 мл и 1,0 мл неразведенной сыворотки и при отсутствии реакции вводят назначенную дозу сыворотки.

Одновременно с началом десенсибилизации больному вводят средства противошоковой терапии. В случае появления симптомов анафилактического шока на одну из вышеуказанных доз последующее введение сыворотки проводят под наркозом.

Еще один из побочных эффектов введения гетерологичных препаратов – сывороточная болезнь. Заболевание обычно начинается с повышения температуры (от субфебрильной до высоких цифр), появления полиморфной сыпи (уртикарной, кореподобной, папуловезикулезной) различной степени выраженности (от единичных элементов до местами сливной). Появление сыпи сопровождается сильным зудом, иногда отеками. Характерным является также появление артралгий или артрозов, лимфаденопатии, в отдельных случаях может наблюдаться увеличение селезенки. Заболевание может осложниться развитием миокардита, гломерулонефрита, периферического неврита.

Сроки развития сывороточной болезни после введения гетерологичной сыворотки во многом определяются очередностью инъекций последнего. Так, после первого введения симптоматика заболевания проявляется в среднем через 7-10 дней, а при повторном через более короткий срок, - от нескольких часов до 2-3 дней. Продолжительность заболевания зависит от его тяжести и составляет от нескольких дней до 2 недель. У отдельных больных возможно рецидивирующее течение болезни.

Ряд гетерологичных сывороток имеет аналоги в виде иммуноглобулинов человека (дифтерийный для внутривенного введения, противостолбнячный, противоботулинический для внутримышечного и внутривенного введения, против клещевого энцефалита), и при наличии обоих видов препарата преимущество следует отдавать последним.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Иммунопрофилактика инфекционных заболеваний. Вакцины, классификация.
2. Гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины. Способы получения, применения.
3. Побочные эффекты при серотерапии и их профилактика. Работы А.М. Безредки.
4. Аллергическая реакция цитотоксического типа (тип II). Механизм развития, клинические проявления.
5. Аллергическая реакция иммунокомплексного типа (тип III). Механизм развития аллергической реакции, клинические проявления (сывороточная болезнь и др.). Десенсибилизация.
6. Аллергия: понятие, классификация аллергических реакций по Джелу и Кумбсу.
7. Аллергические реакции гуморального (немедленного) типа (тип I). Понятие о сенсibiliзации, механизм развития аллергических реакций гуморального типа, клинические проявления. Десенсибилизация.
8. Аллергические реакции клеточного (замедленного) типа (тип IV). Механизм развития, роль в патогенезе и иммунитете инфекционных заболеваний. Кожно-аллергические пробы, их диагностическое значение.
9. Национальный календарь профилактических прививок. Инфекции, подлежащие специфической профилактике в рамках Календаря. Характеристика вакцин, применяемых с профилактической целью.
10. Виды иммунитета. Характеристика иммунитета, формируемого при введении вакцин и сывороток (иммуноглобулинов).

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ХИМИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ:

- 1) содержат цельные микробные клетки;
- 2) содержат протективные антигены;
- 3) содержат гаптены;
- 4) обладают иммуносупрессивным действием;
- 5) вводятся только однократно;

2. АДЪЮВАНТЫ:

- 1) супрессоры иммунитета;
- 2) депонируют антигены;
- 3) обеспечивают разрушение антигенов;
- 4) угнетают фагоцитоз;
- 5) анатоксины;

3. ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В:

- 1) живая;
- 2) инактивированная;
- 3) анатоксин;
- 4) рекомбинантная;
- 5) трансгенная;

4. ВАКЦИНОТЕРАПИЯ ПРОВОДИТСЯ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ:

- 1) острых;
- 2) генерализованных;
- 3) хронических;
- 4) смешанных;
- 5) вторичных;

5. ГОМОЛОГИЧНЫЕ ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ПОЛУЧАЮТ:

- 1) путем гипериммунизации животных;
- 2) путем однократной иммунизации животных;
- 3) из крови доноров;
- 4) методом аттенуации;
- 5) из крови близнецов;

6. ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ СЫВОРОТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ВВОДЯТ:

- 1) всю дозу сразу;
- 2) дробно по методу А.М. Безредки;
- 3) внутримышечно;
- 4) внутривенно;
- 5) внутрикожно;

7. ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ СОДЕРЖАТ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ:

- 1) с исходной вирулентностью;
- 2) с измененными антигенными свойствами;
- 3) со сниженной вирулентностью;
- 4) с повышенной вирулентностью;
- 5) инактивированные УФ-лучами;

8. АНАТОКСИНЫ СОДЕРЖАТ:

- 1) соматический антиген;
- 2) обезвреженные бактериальные экзотоксины;
- 3) обезвреженные бактериальные эндотоксины;
- 4) бактериальные экзотоксины;
- 5) антитоксины;

9. ДЛЯ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ ВАКЦИНЫ:

- 1) живые;
- 2) антительные;
- 3) рекомбинантные;
- 4) убитые;
- 5) антитоксины;

10. ПРЕИМУЩЕСТВА ЖИВЫХ ВАКЦИН:

- 1) высокая реактогенность;
- 2) высокая напряженность иммунитета;
- 3) иммунитет формируется сразу после введения;
- 4) иммунитет пожизненный;
- 5) относительная простота получения;

**7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. Пострадавшему в автомобильной катастрофе после оказания хирургической помощи была введена

противостолбнячная лошадиная сыворотка

**Вопрос 1:** Что содержит препарат и для чего он был использован?;

**Вопрос 2:** Возможны ли осложнения при введении препарата? Какие? Как правильно ввести препарат, чтобы избежать осложнений?;

1) Препарат содержит антитела к экзотоксину возбудителя столбняка; был введен с целью экстренной специфической профилактики столбняка.;

2) Осложнения возможны - анафилактический шок или сывороточная болезнь. Чтобы избежать осложнений необходимо ввести препарат дробно по методу А.М. Безредки.;

2. В подготовительной группе детского сада пять дней назад заболел ребенок. Диагноз "Дифтерия" подтвержден лабораторно.

**Вопрос 1:** Имеют ли дети, не болевшие ранее дифтерией, иммунитет против дифтерии? Если да, охарактеризуйте его.;

**Вопрос 2:** Какова вероятность заболеть дифтерией у остальных детей, контактировавших с больным ребенком?;

**Вопрос 3:** Назовите методы определения иммунитета к дифтерии, суть, критерии учета, оценки.;

1) Все дети должны быть привиты вакцинами, имеющими в своем составе дифтерийный анатоксин, согласно Национальному календарю. Иммунитет - приобретенный, искусственный, активный, антитоксический.;

2) Вероятность остальных детей заболеть невысока, т.к. практически все дети привиты по возрасту по календарю прививок против дифтерии.;

3) Состояние антитоксического иммунитета определяют с помощью реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). РПГА - двухкомпонентная реакция с использованием диагностикума эритроцитарного дифтерийного антигенного, который представляет собой эритроциты с адсорбированным на них дифтерийным анатоксином, и антитоксических противодифтерийных антител, находящихся в сыворотке крови обследуемых. При наличии в исследуемой сыворотке антитоксина образуется специфический комплекс: антитоксин + сенсibilизированные анатоксином эритроциты. Результаты РПГА учитывают визуально - по степени агглютинации эритроцитов: ++++ гемагглютинат тонким слоем выстилает все дно лунки; +++ агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают дно лунки, но размер агглютината меньше, может наблюдаться фестончатое утолщение края осадка; ++ агглютинировавшие эритроциты располагаются в центральной части лунки, окружены слоем эритроцитов в виде кольца; + на дне лунки образуется широкое, плотное кольцо с незначительной агглютинацией по краю; - осадок в центральной части лунки в виде диска или кольца с ровным краем. Реакция в контролях на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана и на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума должна быть отрицательной. За титр испытуемой и контрольной сывороток принимают последнее разведение, дающее агглютинацию эритроцитов на два плюса (++). Критерий оценки - защитный титр 1:40 и выше.;

3. Гражданин «К» обратился за медицинской помощью в поликлинику по месту жительства в связи с укусом клеща. В поликлинике для экстренной профилактики клещевого энцефалита имелись два вида противоязвенного гамма-глобулина: лошадиный и человеческий.

**Вопрос 1:** Укажите особенности введения указанных препаратов.;

**Вопрос 2:** Какой гамма-глобулин необходимо ввести пациенту и как, учитывая, что у пациента отмечались аллергические реакции на антибиотики по типу отека Квинке?;

1) Человеческий - внутримышечно одномоментно; лошадиный - дробно по Безредке.;

2) Человеческий.;

4. В центр СПИД г. Красноярск поступила партия иммунобиологических препаратов: гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины различного назначения.

**Вопрос 1:** Назовите способы получения и применения данных препаратов.;

**Вопрос 2:** Приведите примеры.;

1) Гомологичные иммуноглобулины получают из сыворотки (плазмы) доноров, целенаправленно привитых соответствующим препаратом и/или имеющих высокие титры специфических антител. Получение гетерологичных антитоксических и антимикробных сывороток основано на многократной иммунизации животных (в основном, лошадей) препаратами анатоксинов и токсинов (антитоксические сыворотки) или микробными клетками. Являясь чужеродным для человека белком, они потенциально опасны, неся угрозу развития тяжелых аллергических реакций, в том числе сывороточной болезни и анафилактического шока. Чтобы избежать осложнений, необходимо ввести препарат дробно по методу А.М. Безредки, в концентрации строго по инструкции.;

2) К гомологичным иммуноглобулинам, применяемым для экстренной профилактики, относятся: противостолбнячный, противоботулинический, антирабический, против клещевого энцефалита, гепатита В, цитомегаловирусной инфекции. Препараты гетерологичных сывороток используют в основном для специфической терапии токсинемических бактериальных инфекций: столбняка, дифтерии, ботулизма, газовой гангрены.;

## 8. Рекомендованная литература по теме занятия

- обязательная:

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

**- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 6.** Серологический метод диагностики. Реакция агглютинации. Реакция преципитации. Реакции с участием меченых антител: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Реакции иммунитета применяются для диагностики инфекционных и аллергических заболеваний, трансплантационного иммунитета, анализа антигенной структуры микроорганизмов. Реакции иммунитета дают возможность судить о динамике защитных свойств организма в процессе инфекционных заболеваний, степени напряженности иммунитета после него и вакцинации. В основе механизма этих реакций лежит принцип тесной физико-химической связи между антигенами и антителами и специфичность их взаимодействия.

Современные сложные серологические реакции отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью и используются в диагностике большинства инфекционных заболеваний. Реакции, протекающие с участием меченых антигенов или антител, основаны на выявлении иммунного комплекса антиген - антитело по метке одного из участников реакций. Результат выявляется визуально или с помощью специальных высокочувствительных приборов, позволяющих количественно выявить меченый субстрат и, следовательно, искомым антиген или антитело. В качестве метки используют флюоресцирующий в ультрафиолетовом свете краситель либо фермент, выявляемый по изменению окраски соответствующего субстрата (иммуноферментный анализ - ИФА), либо изотоп, выявляемый радиометрией (радиоиммунный анализ - РИА).

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

Становление иммунологических методов распознавания заболеваний пришлось на конец XIX начало XX веков. Поскольку взаимодействия иммунной системы и антигенов (АГ) изучали с применением антител (АТ) сыворотки крови, эти методы получили название **серологические** (от лат. serum, сыворотка, + logos, учение) **реакции**.

Но, прежде чем перейти к изучению серологических реакций, необходимо выяснить, что такое АГ и АТ.

Антигены - это вещества, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций.

Антигенные вещества представляют собой высокомолекулярные соединения, обладающие определенными свойствами: чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью и определенной молекулярной массой. Антигенами могут быть разнообразные вещества белковой природы, а также белки в соединении с липидами и полисахаридами. Антигенными свойствами обладают клетки животного и растительного происхождения, яды животного и растительного происхождения. Антигенными свойствами обладают вирусы, бактерии, микроскопические грибы, простейшие, экзо - и эндотоксины микроорганизмов. Все антигенные вещества имеют ряд общих свойств:

**Антигенность** - это способность антигена вызывать иммунный ответ. Степень иммунного ответа организма на различные антигены неодинакова, т. е. на каждый антиген вырабатывается неодинаковое количество антител.

**Специфичность** - это особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Ее определяет антигенная детерминанта, т. е. небольшой участок молекулы антигена, который соединяется с выработанным на него антителом.

**Иммуногенность** - это способность создавать иммунитет. Это понятие относится, главным образом, к микробным антигенам, обеспечивающим создание иммунитета к инфекционным болезням. Антиген, чтобы быть иммуногенным, должен быть чужеродным и иметь достаточно большую молекулярную массу. С увеличением молекулярной массы иммуногенность нарастает. Корпускулярные антигены (бактерии, грибы, эритроциты) более иммуногены, чем растворимые. Среди растворимых антигенов наибольшей иммуногенностью обладают высокомолекулярные соединения.

Антигены подразделяют на полноценные и неполноценные. Полноценные антигены вызывают в организме синтез антител или сенсibilизацию лимфоцитов и вступают с ними в реакцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Для полноценных антигенов характерна строгая специфичность, т. е. они вызывают в организме выработку только специфических

антител, вступающих в реакцию только с данным антигеном.

Неполноценные антигены (гаптены) представляют собой сложные углеводы, липиды и другие вещества, не способные вызвать образование антител в организме, но вступающие с ними в специфическую реакцию. Добавление к гаптенам небольшого количества белка придает им свойства полноценного антигена.

Аутоантигены - антигены, образованные из белков собственных тканей, изменивших свои физико-химические свойства под воздействием различных факторов (токсины и ферменты бактерий, лекарственные вещества, ожоги, обморожения, облучение). Такие, измененные белки становятся чужеродными для организма, и организм отвечает выработкой антител, т. е. возникают аутоиммунные заболевания.

Если рассматривать антигенные свойства микроорганизма, то можно отметить, что антигенный состав - это достаточно постоянная характеристика любого микроорганизма. В антигеном комплексе чаще всего встречаются общеродовые антигены (общие для представителей данного рода), группоспецифические (присущие определенной группе), видоспецифические (присущие всем особям данного вида), и штаммоспецифические.

По локализации антигены могут быть поверхностные (К-антигены - антигены клеточной стенки), соматические (О-антигены, локализованы во внутреннем слое клеточной стенки, термостабильны) и жгутиковые (Н-антигены, присутствуют у всех подвижных бактерий, термолабильны). Многие из них активно секретируются клеткой в окружающую среду. В тоже время, существуют гидрофобные антигены, прочно связанные с клеточной стенкой.

Кроме того, патогенные микроорганизмы способны выделять ряд экзотоксинов. Экзотоксины обладают свойствами полноценных антигенов с выраженной неоднородностью в пределах рода и вида. Споры бактериальной клетки также обладают антигенными свойствами: они содержат антиген, общий для вегетативной клетки и споры.

Патогенные микроорганизмы ведут постоянную борьбу с иммунной системой путем изменения структуры поверхностных антигенов. Изменения чаще всего появляются в результате точечных мутаций, в результате появляются варианты существующих антигенов.

Антитела - белки, относящиеся к иммуноглобулинам, которые синтезируются лимфоидными и плазматическими клетками в ответ на попадание в организм антигена, обладающими способностью специфически связываться с ним. Антитела составляют более 30% белков сыворотки крови, обеспечивают специфичность гуморального иммунитета благодаря способности связываться только с тем антигеном, который стимулировал их синтез.

Первоначально антитела условно классифицировали по их функциональным свойствам на нейтрализующие, лизирующие и коагулирующие. К нейтрализующим были отнесены антитоксины, антиферменты и вируснейтрализующие лизины. К коагулирующим - агглютинины и преципитины; к лизирующим - гемолитические и комплементсвязывающие антитела. С учетом функциональной способности антител были даны названия серологическим реакциям: агглютинация, гемолиз, лизис, преципитация и др.

В соответствии с Международной классификацией сывороточные белки, несущие функцию антител, получили название иммуноглобулинов (Ig). В зависимости от физикохимических и биологических свойств различают иммуноглобулины классов IgM, IgG, IgA, IgE, IgD.

Имуноглобулины - белки с четвертичной структурой, т. е. их молекулы построены из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых и двух легких, связанных между собой дисульфидными мостиками. Легкие цепи - структура общая для всех классов иммуноглобулинов. Тяжелые цепи имеют характерные структурные особенности, присущие определенному классу, подклассу.

Антитела, входящие в определенные классы иммуноглобулинов, обладают различными физическими химическими, биологическими и антигенными свойствами.

Имуноглобулины содержат три вида антигенных детерминант: изотипические (одинаковые для каждого представителя данного вида), аллотипические (детерминанты, различные у представителей данного вида) и идиотипические (детерминанты, определяющие индивидуальность данного иммуноглобулина и являющиеся различными у антител одного класса, подкласса).

Антитела вырабатывают плазматические клетки селезенки, лимфатических узлов, костного мозга, пейеровых бляшек. Плазматические клетки (антителопродуценты) происходят из предшественников В-клеток после их контакта с антигеном. Механизм синтеза антител аналогичен синтезу любых белков и происходит на рибосомах. Легкие и тяжелые цепи синтезируются отдельно, затем соединяются на полирибосомах, а окончательная их сборка происходит в пластинчатом комплексе.

Динамика образования антител. При первичном иммунном ответе в антителообразовании различают две фазы: индуктивную (латентную) и продуктивную. Индуктивная фаза - это период от момента парентерального введения

антигена до появления антигенреактивных клеток (продолжительность не более суток). В эту фазу происходит пролиферация и дифференцировка лимфоидных клеток в направлении синтеза IgM. Вслед за индуктивной фазой наступает продуктивная фаза антителообразования. В этот период, примерно до 10-15 суток уровень антител резко возрастает, при этом уменьшается число клеток, синтезирующих IgM, и нарастает продукция IgG.

Знание механизмов взаимодействия антигенов и антител раскрывает сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных факторов.

Реакции между антителами и антигенами, которые происходят в живом организме, могут быть воспроизведены в лабораторных условиях с диагностической целью.

Выявление антител к инфекционному агенту дает возможность не только выявить выраженную текущую информацию, но и установить факт первичного инфицирования. Серологические реакции активно применяют при проведении полного объема диагностических исследований. Увеличение титров АТ – зачастую единственный дифференциально – диагностический признак, указывающий на инфекционное заболевание. Выявление антител особенно актуально при неудачных попытках выделить возбудителя инфекции. Классические реакции выявления микробных антигенов и антител к ним имеют значение в экспресс-диагностике бактериальных инфекций. С одной стороны, такие реакции чувствительны к значительным титрам антител, появляющимся к концу первой недели болезни, что не позволяет поставить диагноз на начальных этапах развития патологического процесса. С другой стороны – при выявлении микробных антигенов в серологических реакциях с помощью коммерческих антител необходимо адекватное количество антигена, избыток или недостаток антигена блокирует достаточное для «прочтения» реакции образованных иммунных комплексов. Проявление этого – «зоны задержки» (феномен прозоны) – отсутствие агглютинации или преципитации при малых или больших разведениях сыворотки крови. Серологические реакции остаются важным инструментом диагностики заболеваний и идентификации возбудителей. Современный арсенал методов лабораторного распознавания возбудителей составляют десятки иммунодиагностических тестов. Их объединяет общее свойство – все тесты сравнительно редко дают ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

С помощью известных АТ (диагностическая сыворотка) появилась возможность установить видовую, типовую принадлежность микроорганизма – **серологическая идентификация** микроба по антигенной структуре.

С помощью известных АТ (диагностикум) можно определять наличие АТ в сыворотке крови больного или обследуемого – **серологическая диагностика** инфекционных заболеваний. В целях диагностики используют: величину диагностического титра, величину нарастания титра АТ при повторном исследовании (исследование парных сывороток), принадлежность выявленных антител к тому или иному классу иммуноглобулинов.

Определение антигенной структуры микробов и их токсинов позволило разработать не только диагностикумы и лечебные сыворотки, но и сыворотки диагностические.

Иммунные диагностические сыворотки – препараты, содержащие антитела, полученные из крови животных (лошадей, кроликов, морских свинок), иммунизированных живыми или убитыми микроорганизмами, отдельными антигенами микробов, их токсинами или анатоксинами. Эти сыворотки используют для идентификации микробов или экзотоксинов по антигенной структуре при помощи постановки серологических реакций (агглютинации, пассивной гемагглютинации, преципитации, связывания комплемента и др.). Иммунные диагностические сыворотки, обработанные флюорохромом, используются для экспресс – диагностики инфекционных заболеваний методом иммунной флюоресценции.

Классификация диагностических сывороток:

1. По составу:

- Поливалентные – содержат антитела к сложному комплексу антигенов, общих для родственных микроорганизмов, используются для определения рода возбудителя в реакции простой агглютинации (сероидентификация).

- Моновалентные – содержат антитела к одному виду возбудителя, используются для определения вида возбудителя в реакции простой агглютинации (сероидентификация).

- Монорецепторные – содержат антитела к одному специфическому антигену, используются для определения специфического антигена возбудителя в реакции простой агглютинации (сероидентификация).

2. По типу реакции иммунитета:

- Агглютинирующие сыворотки – сыворотки, содержащие антитела (агглютинины) под влиянием которых происходит склеивание (агглютинация) микробов, что сопровождается выпадением хлопьев или осадка, применяются для определения рода, вида, типа возбудителя в реакции агглютинации (РА). Агглютинирующие

сыворотки могут быть неадсорбированными или нативными и адсорбированными. Неадсорбированные сыворотки содержат групповые антитела к нескольким близкородственным видам микробов. Адсорбированные сыворотки содержат антитела к одному или нескольким антигенам одного вида микроба.

- Преципитирующие сыворотки- сыворотки, содержащие антитела (преципитины), под действием которых происходит осаждение растворимых антигенов с образованием кольца или полос преципитации, применяются для постановки реакции преципитации (РП).

- Гемолитические сыворотки- сыворотки, содержащие антитела (гемолизины), образующиеся при иммунизации животных эритроцитами, применяются для постановки реакции связывания комплемента (РСК) и реакции гемолиза для определения титра комплемента.

- Люминесцирующие сыворотки- сыворотки, содержащие, меченные по Fc-фрагменту флюорохромом (чаще используют ФИТЦ – флюоресцеина изотиоцианат) антитела, применяются для постановки прямой и непрямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

- Сыворотки меченные пероксидазой – сыворотки, содержащие, меченные пероксидазой хрена по Fc-фрагменту антитела, применяются для постановки прямой и непрямой реакции иммуноферментативного анализа (ИФА).

- Антитоксические (нейтрализующие) сыворотки – сыворотки, содержащие антитоксические антитела (антитоксины), применяются для постановки реакции нейтрализации (РН).

Диагностикумы – препараты, содержащие взвесь обезвреженных микроорганизмов или определенные антигены.

Необходимость использования диагностикумов для серологических реакций связана не только с явным их преимуществом перед живыми культурами микробов (безопасность в работе), но еще и потому, что для приготовления диагностикумов подбираются штаммы микроорганизмов с высокой чувствительностью к антителам и способностью длительно сохранять антигенные свойства.

В серологических реакциях (реакции агглютинации, реакции пассивной гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции торможения гемагглютинации) для выявления специфических антител применяются: бактериальные, эритроцитарные и вирусные диагностикумы.

Бактериальные диагностикумы могут содержать инактивированную микробную взвесь или отдельные антигенные компоненты бактерий: О, Н или Vi-антигены и используются в реакциях агглютинации.

Эритроцитарные диагностикумы представляют собой эритроциты (обработанные танином или формалином) с адсорбированными на них антигенами, извлеченными из бактерий, и применяются в РПГА (реакции пассивной гемагглютинации). В том случае, когда РПГА используется для выявления антигена в выделениях больных, в тканях и др., применяют «антительные диагностикумы», т. е. эритроциты, сенсibilизированные антителами.

Вирусные диагностикумы — препараты, содержащие инактивированные вируссодержащие жидкости (культуральные, из куриных эмбрионов или организма животных, зараженных соответствующим вирусом), применяются в РСК (реакции связывания комплемента), реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции нейтрализации.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии:

- специфическая – непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой.

- неспецифическая – вторая стадия, когда, отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс выпадает в осадок. Эта стадия возможна в присутствии раствора электролита и визуально проявляется по-разному, в зависимости от физического состояния антигена.

Если антигены корпускулярные, то имеет место феномен агглютинации (склеивания различных частиц и клеток). Образующиеся конгломераты выпадают в осадок, при этом клетки морфологически не изменяются, теряя подвижность, они остаются живыми. Корпускулярные антигены дают феномен агглютинации, лизиса, связывания комплемента, иммобилизации.

Растворимые антигены дают феномен преципитации, нейтрализации.

Реакции между антигенами и антителами называются серологическими. Они могут быть простые с участием только антител, антигена и раствора электролита: РА, РП.

Серологические реакции характеризуются специфичностью и чувствительностью. Корпускулярные антигены дают феномен агглютинации, растворимые антигены – преципитации.

Реакция агглютинации (РА) – это реакция склеивания корпускулярных антигенов: бактерий, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, клеток тканей, а также химических частиц с адсорбированными на них антигенами под действием специфических антител в системе электролита.

Реакция преципитации (РП) – реакция осаждения антигена, находящегося в дисперсном, коллоидном состоянии под воздействием специфических антител в растворе электролита. Феномен РП состоит в помутнении всего прозрачного коллоидного раствора при смешивании гомологичных антител и антигенов или в появлении кольца помутнения при наслаивании антигена на иммунную сыворотку, или образование линии преципитации при диффузии антигена и антител в геле. Практическое применение: РП характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью.

### **Реакции, протекающие с участием меченных антигенов или антител.**

Тесты основаны на выявлении взаимодействия антигена с антителом с использованием специальной метки или меченых антител.

В качестве метки используется либо флюоресцирующий в ультрафиолетовом свете краситель (изоцианат флюоресцеина), либо фермент (пероксидаза, щелочная фосфатаза), выявляемый по изменению окраски соответствующего субстрата.

В нашей стране в течение многих лет используются **иммунофлюоресцентный метод (РИФ)**, разработанный А. Кунсом и получивший его имя. Прямая РИФ включает обработку материала на предметном стекле (мазок, биоптат) меченой флюорохромом диагностической сывороткой. Если на предметном стекле был искомый антиген, антитела фиксируются на нем, и, после отмывки стекла от несвязавшихся антител, антиген выявляется в люминисцентном микроскопе по яркому свечению. Другая модификация – *непрямая РИФ* – основана на использовании меченой антиглобулиновой сыворотки. От прямого метода этот вариант отличается тем, что используется немеченая диагностическая сыворотка, а ее присоединение к антигену выявляется с помощью меченой антиглобулиновой сыворотки, для которой иммуноглобулины человека являются антигенами.

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

Для проведения **иммуноферментного анализа (ИФА)** используют 96-луночные полистироловые планшеты, т. к. на полистироле легко адсорбируются антитела, а после специальной обработки – различные антигены. Для работы с этими планшетами используются многоканальные автоматические пипетки, позволяющие вносить ингредиенты одновременно в несколько лунок панели, а также автоматические и полуавтоматические устройства для промывания лунок. Существуют и специальные автоматы, позволяющие осуществлять все этапы ИФА практически без участия человека. Преимуществом ИФА перед классическими серологическими реакциями (РА, РНГА, РСК) является возможность определения количества антител (или антигена) без использования серийных разведений. Интенсивность окраски в лунке пропорциональна количеству фермента, следовательно, количеству искомого антител (или антигена). Измеряя с помощью спектрофотометра оптическую плотность содержимого лунки и сравнивая ее с контролем, определяют количество искомого компонента.

Достоинством ИФА при серодиагностике инфекционных заболеваний является также возможность определения классов специфических антител (Ig M, Ig G, Ig A), что имеет значение для определения периода инфекционного процесса, выявления носительства возбудителя и контроля проводимой терапии.

При этом использование для постановки ИФА моноклональных антител позволяет достичь высокой специфичности, что в сочетании с высокой чувствительностью делает ИФА одним из наиболее распространенных методов в прикладной иммунологии.

*Постановка* (на примере серодиагностики ВИЧ-инфекции): для определения специфических антител используют специальные панели из полистирола, в лунках которых фиксирован инактивированный вирус или его антигены. В лунки вносят сыворотки обследуемых и инкубируют. При этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к нему. Не прикрепившиеся антитела удаляют промыванием буферным раствором. Затем в лунки вносят антитела против иммуноглобулинов (антител) человека, меченные пероксидазой. Если в исследуемой сыворотке присутствовали искомые антитела, то на данном этапе они, выступая в качестве антигена, прореагируют с мечеными античеловеческими антителами. После отмывки добавляется субстрат (ортофенилендиамин – ОФД), что позволяет учесть результаты реакции. Образование продукта, окрашенного в желто-коричневый цвет, оценивается как положительная реакция.

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

## 5. Вопросы по теме занятия

1. Понятие иммунитета, его виды.
2. Механизм РИФ; критерии оценки результатов.
3. Антигены, их характеристика. Антигены микробной клетки.
4. Механизм ИФА, критерии оценки результатов.
5. Антитела, классы иммуноглобулинов, их характеристика.
6. Понятие серологической реакции, возможности ее практического применения.
7. Практическое использование РИФ.
8. Иммуноферментный анализ: значение в медицинской практике, возможности применения.
9. Реакция преципитации, ее разновидности и практическое применение.

## 6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов

1. ПАРНЫЕ СЫВОРОТКИ - ЭТО:
  - 1) сыворотки однояйцевых близнецов;
  - 2) сыворотки, взятые из разных вен;
  - 3) сыворотки двух обследуемых при диагностике одного заболевания;
  - 4) сыворотки одного обследуемого, взятые в динамике заболевания с интервалом 7-10 дней;
  - 5) сыворотки одного обследуемого, взятые с интервалом 4-6 часов;
2. ФЕРМЕНТ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТКОЙ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ:
  - 1) РА;
  - 2) РП;
  - 3) РСК;
  - 4) ИФА;
  - 5) РИФ;
3. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ - ЭТО РЕАКЦИЯ:
  - 1) осаждения растворимого антигена;
  - 2) осаждения корпускулярного антигена;
  - 3) связывания комплемента;
  - 4) иммунного гемолиза;
  - 5) иммунного прилипания;
4. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ - ЭТО РЕАКЦИЯ МЕЖДУ:
  - 1) моноклональными антителами;
  - 2) поликлональными антителами;
  - 3) полноценными антигенами;
  - 4) антителами и антигенами;
  - 5) неполными антителами;
5. АВИДНОСТЬ АНТИТЕЛ - ЭТО:
  - 1) количество антигенсвязывающих центров;
  - 2) скорость и прочность связывания с антигеном;
  - 3) способность ускорять фагоцитоз;
  - 4) способность проникать через плацентарный барьер;
  - 5) титр специфических антител в крови больного;
6. МАТЕРИАЛ ОТ ОБСЛЕДУЕМОГО ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ С ЦЕЛЬЮ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ:
  - 1) сыворотка обследуемого;
  - 2) диагностикум;
  - 3) культура, выделенная от обследуемого;
  - 4) агглютинирующая сыворотка;
  - 5) физиологический раствор;
7. ЦЕЛЬ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ):
  - 1) серодиагностика инфекционного заболевания;
  - 2) определение фагоцитарной активности нейтрофилов;
  - 3) выявление аутоантител;
  - 4) сероидентификация возбудителя в исследуемом материале;
  - 5) оценка иммунного статуса;
8. КРИТЕРИЙ ДОСТОВЕРНОСТИ РА:
  - 1) отсутствие спонтанной агглютинации в контролях антигена и антител;
  - 2) помутнение в контроле сыворотки;
  - 3) спонтанная агглютинация в контроле сыворотки;
  - 4) спонтанная агглютинация в контроле антигена;
  - 5) феномен агглютинации в опыте;
9. В НЕПРЯМОЙ РИФ, В ОТЛИЧИЕ ОТ ПРЯМОЙ, ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ::
  - 1) биологический материал, взятый у пациента;

- 2) щелочная фосфатаза;
- 3) гемолитическая система;
- 4) комплемент;
- 5) антиглобулиновая сыворотка, меченая флюорохромом;

### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. С материалом от обследуемого К. с клиническим диагнозом «Урогенитальный хламидиоз?» была поставлена РИФ непрямая.

**Вопрос 1:** С какой целью была поставлена РИФ?;

**Вопрос 2:** Что является критерием оценки РИФ?;

- 1) С целью сероидентификации предполагаемого возбудителя.;
  - 2) При положительной РИФ происходит соединение антигена и специфических антител, меченных флюорохромом. При освещении УФ-лучами наблюдается ярко-желтое или зеленое свечение клеток микроорганизмов, сходных по морфологии с предполагаемым возбудителем.;
2. В женскую консультацию обратилась пациентка для постановки на учет по беременности. Был взят анализ крови на ВИЧ.

**Вопрос 1:** Какая серологическая реакция была поставлена с целью серодиагностики ВИЧ? Опишите ее суть.;

**Вопрос 2:** Перечислите компоненты данной реакции.;

- 1) ИФА с сывороткой пациентки. В основе ИФА лежит иммунная реакция антигена с антителом, а присоединение к антителам ферментной метки позволяет учитывать результат реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению ее уровня.;
  - 2) Диагностикум (антигены ВИЧ) на твердой фазе; сыворотка обследуемой; антиглобулиновая сыворотка (моноклональные АТ, меченые ферментом пероксидазой); хромогенный субстрат для фермента.;
3. При постановке развернутой реакции агглютинации с сывороткой обследуемого с подозрением на брюшной тиф и О-брюшнотифозным диагностикумом, получен результат: реакция достоверна по контролям, титр реакции равен 1:400.

**Вопрос 1:** Интерпретируйте полученный результат с учетом того, что диагностический титр в данном случае составляет 1:200 у взрослых, 1:100 у детей;

**Вопрос 2:** Назовите критерии учета развернутой реакции агглютинации;

**Вопрос 3:** Назовите критерии достоверности реакции агглютинации;

- 1) РРА положительна, результаты достоверны;
- 2) Наличие феномена агглютинации с интенсивностью не менее ++;
- 3) Отсутствие агглютинации в контролях сыворотки и диагностикума;

### 8. Рекомендованная литература по теме занятия

- **обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

- **дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 7.** Контрольное занятие: инфекция, иммунитет, аллергия.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, вступающие в непосредственные взаимоотношения с человеком. Противоречие между хозяином и паразитом рождает инфекционный процесс, который либо находит клиническое выражение, либо ограничивается внутренним конфликтом. О последнем судят по иммунным сдвигам в зараженном организме. Целью занятия является систематизация и контроль знаний студентов по теме Инфекция, иммунитет, аллергия.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Вакцины. Понятие, современная классификация вакцин: живые, убитые, субклеточные, субвирионные, рекомбинантные, дивергентные, трансгенные. Достоинства и недостатки различных типов вакцин.**

Иммунопрофилактика - способ предупреждения инфекционных заболеваний в коллективе и у отдельных индивидуумов путём создания искусственного специфического иммунитета. Существует две основные формы иммунизации: активная - введение в организм микробных АГ (вакцин) с целью создания активного иммунитета; пассивная - введение в организм препаратов, содержащих специфические антитела (иммунные сыворотки, гамма-глобулины), с целью создания искусственного пассивного иммунитета.

Термин «вакцина» произошел от французского *vaccin* - корова. Его ввел Л. Пастер в честь Дженнера, применившего вирус коровьей оспы для иммунизации людей против натуральной оспы человека.

Вакцины - все препараты, используемые для искусственного создания приобретённого активного специфического иммунитета против определённых возбудителей или их токсинов. Они должны быть иммуногенными, безопасными, не реактогенными, не вызывать аллергических реакций, не обладать тератогенностью, онкогенностью; штаммы, из которых готовят вакцину, должны быть генетически стабильными, вакцина должна обладать длительным сроком хранения, производство ее должно быть технологичным, а способ применения - по возможности, простым и доступным для массового применения.

К вакцинам относят препараты, получаемые из бактерий, вирусов и других микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности. Их можно разделить на две основные группы: **инактивированные вакцины и живые вакцины.**

Вакцинные препараты вводят внутрь, подкожно и/или внутривенно, парентерально, интраназально и ингаляционно. Способ введения определяют свойства препарата. Живые вакцины можно вводить *накожно* (скарификацией), интраназально или *преорально*; анатоксины вводят подкожно, а неживые корпускулярные вакцины - парентерально. При массовых иммунизациях выбирают наиболее экономичный способ, обеспечивающий быстрое и эффективное создание иммунной прослойки (невосприимчивых лиц) в популяции, особенно в эпидемический период. По степени необходимости выделяют плановую (обязательную) вакцинацию и вакцинацию по эпидемиологическим показаниям. Первую проводят в соответствии с регламентированным календарем иммунопрофилактики наиболее распространенных или опасных инфекций. Вакцинацию по эпидемиологическим показаниям проводят для срочного создания иммунитета у лиц, подвергающихся риску развития инфекции.

**Гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины. Способы получения, применения.**

*Гомологичные сыворотки и иммуноглобулины.* Эти препараты представляют собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную путем фракционирования по методу Кона из сыворотки или плазмы здоровых людей, у которых отсутствуют антитела к ВИЧ, вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).

Действующим началом являются иммуноглобулины, обладающие активностью антител различной специфичности.

Препараты содержат почти исключительно (95%) IgG; период их полувыведения из организма человека составляет около 4 нед., а максимальный уровень антител в крови после внутримышечного введения достигается в интервале 24-48 ч.

По своим свойствам иммуноглобулины человека (ИГЧ) подразделяют на 2 группы - ИГЧ нормальный (старое название противокоревой гамма-глобулин) и специфические ИГЧ. То обстоятельство, что для изготовления одной серии ИГЧ нормального используют кровь не менее чем от 1000 человек, позволяет получить препарат с высоким уровнем антител к возбудителям тех заболеваний, которые ранее перенесло большинство из них или против которых они были вакцинированы в плановом порядке: корь, коклюш, грипп, полиомиелит, гепатит А и др. Специфические иммуноглобулины (противостолбнячный, противоботулинический, против клещевого энцефалита, гепатита В, коклюшный антитоксический) получают из сыворотки (плазмы) доноров или целенаправленно привитых соответствующим препаратом или отобранной по результатам определения в них высокого уровня антител. За рубежом выпускают также ИГЧ антирабический, против вируса ветряной оспы, цитомегаловирусной инфекции. Помимо вышеперечисленных препаратов, предназначенных для внутримышечного введения, номенклатура ИГЧ включает и специально выпускаемые препараты, предназначенные для внутривенного введения, которые лишены антикомплементарных свойств, содержат большее количество фрагментов и предназначены исключительно для лечения инфекционных болезней. Необходимо иметь в виду, что ИГЧ, не предназначенные для внутривенного введения, не должны применяться последним способом, поскольку при этом может наступить развитие коллаптоидных реакций.

К группе ИГЧ для внутривенного введения, выпускаемых в России или рекомендованных к применению, относятся: ИГЧ нормальный, ИГЧ антистафилококковый, ИГЧ противоботулинический, ИГЧ противодифтерийный. Внутривенно также применяют специфическую иммунную плазму человека - антистафилококковую, антипротейную, антисинегнойную.

ИГЧ относятся к слабо реактогенным препаратам и единственным абсолютным противопоказанием к их применению с профилактической целью является наличие в анамнезе сведений о тяжелых аллергических реакциях на введение препаратов крови. При использовании ИГЧ, предназначенных для внутривенного введения, в целях профилактики коллаптоидных реакций необходимо соблюдать указания инструкций о разведении препарата и скорости его введения.

*Гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины.* Препараты гетерологичных сывороток используют в основном для экстренной профилактики и лечения токсинемических (столбняк, дифтерия, ботулизм, газовая гангрена), а также некоторых вирусных (бешенство, клещевой энцефалит, японский энцефалит, венесуэльский энцефаломиелит лошадей, лихорадка Эбола) и бактериальных (сибирская язва, лептоспироз) инфекций.

Помимо вышеуказанных препаратов выпускаются иммунные сыворотки, нейтрализующие яд змей (гюрзы, эфы, кобры) и паука каракурта.

Получение антитоксических и антимикробных сывороток основано на многократной иммунизации животных (в основном, лошадей) препаратами анатоксинов и токсинов (антитоксические сыворотки) или микробными клетками. Нативные сыворотки подвергают очистке от белковых фракций, не содержащих специфические АТ, и концентрируют. Являясь чужеродным для человека белком, они потенциально опасны, неся угрозу развития тяжелых аллергических реакций, в том числе сывороточной болезни и анафилактического шока.

### **Побочные эффекты при серотерапии и их профилактика. Работы А.М. Безредки.**

Препараты гетерологичных сывороток, являясь для организма человека чужеродным белком, при первом введении вызывают у значительной части привитых развитие сенсibilизации, а при повторном - развитие аллергических реакций немедленного типа, в том числе анафилактического шока. Аллергические реакции немедленного типа у лиц, сенсibilизированных ранее продуктами лошадиного происхождения, могут развиваться и после первого введения гетерологичных сывороток.

Наиболее грозным осложнением после применения сывороточных препаратов является анафилактический шок. Клиника данного осложнения, развивающегося, как правило, непосредственно после инъекции препарата, характеризуется развитием острой сердечно-сосудистой недостаточности и острого бронхоспазма.

Первые симптомы шока - беспокойство, общая слабость или возбуждение, чувство страха, головокружение, шум в ушах, холодный пот, боль за грудиной или в животе, затрудненное дыхание. В ряде случаев симптомам шока предшествует генерализованный зуд кожи, появление аллергических сыпей и отеков. В тяжелых случаях, особенно при отсутствии экстренной медицинской помощи, через 5-30 мин может наступить летальный исход.

Для профилактики развития анафилактического шока в 1907 году известный отечественный микробиолог А.М. Безредка разработал метод десенсibilизации - дробного введения сывороточных препаратов в малых дозах,

снижающих чувствительность организма к сенсibiliзирующему агенту (аллергену).

Перед введением любой гетерологичной сыворотки обязательна постановка кожной пробы с разведенной 1:100 лошадиной сывороткой. Разведенную сыворотку вводят строго внутрикожно в сгибательную поверхность предплечья в объеме 0,1 мл. учет реакции проводят через 20 мин. Пробу считают *отрицательной*, если диаметр отека и/или покраснения, появляющегося на месте введения, меньше 1 см. Пробу считают *положительной*, если диаметр отека и/или покраснение достигают в диаметре 1 см и более.

При отрицательной кожной пробе неразведенную сыворотку вводят в объеме 0,1 мл подкожно в область средней трети плеча. При отсутствии местной или общей реакции через 30-60 мин внутримышечно вводят назначенную дозу сыворотки, подогретой до температуры 36<sup>0</sup>С. Максимальный объем препарата, вводимого в одно место, не должен превышать 10 мл. Больной, получивший сыворотку, должен находиться под наблюдением врача в течение часа.

При положительной кожной пробе, а также при развитии реакции на подкожное введение 0,1 мл неразведенной сыворотки, препарат применяют только по жизненным показаниям. Для десенсибилизации сыворотку, разведенную 1:100, вводят подкожно последовательно в объеме 0,5 мл, 2,0 мл, 5,0 мл с интервалами 15-20 мин, затем с теми же интервалами вводят подкожно 0,1 мл и 1,0 мл неразведенной сыворотки и при отсутствии реакции вводят назначенную дозу сыворотки.

Одновременно с началом десенсибилизации больному вводят средства противошоковой терапии. В случае появления симптомов анафилактического шока на одну из вышеуказанных доз последующее введение сыворотки проводят под наркозом.

Еще один из побочных эффектов введения гетерологичных препаратов - сывороточная болезнь. Заболевание обычно начинается с повышения температуры (от субфебрильной до высоких цифр), появления полиморфной сыпи (уртикарной, кореподобной, папуловезикулезной) различной степени выраженности (от единичных элементов до местами сливной). Появление сыпи сопровождается сильным зудом, иногда отеками. Характерным является также появление артралгий или артрозов, лимфаденопатии, в отдельных случаях может наблюдаться увеличение селезенки. Заболевание может осложниться развитием миокардита, гломерулонефрита, переферического неврита.

Сроки развития сывороточной болезни после введения гетерологичной сыворотки во многом определяются очередностью инъекций последнего. Так, после первого введения симптоматика заболевания проявляется в среднем через 7-10 дней, а при повторном через более короткий срок, - от нескольких часов до 2-3 дней. Продолжительность заболевания зависит от его тяжести и составляет от нескольких дней до 2 недель. У отдельных больных возможно рецидивирующее течение болезни.

Ряд гетерологичных сывороток имеет аналоги в виде иммуноглобулинов человека (дифтерийный для внутривенного введения, противостолбнячный, противоботулинический для внутримышечного и внутривенного введения, против клещевого энцефалита), и при наличии обоих видов препарата преимущество следует отдавать последним.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Клеточные неспецифические факторы защиты организма человека: кожа и слизистые оболочки, фагоцитоз, нормальная микрофлора, естественные киллеры.
2. Гомологичные и гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины: состав, показания к применению, пути введения, возможные осложнения.
3. Аллергическая реакция II типа: механизм развития, клиническое значение.
4. Аллергическая реакция III типа: механизм развития, клиническое значение.
5. Аллергическая реакция IV типа: механизм развития, клиническое значение.
6. Аллергическая реакция I типа: механизм развития, клиническое значение.
7. Гуморальные неспецифические факторы защиты организма человека: лизоцим, система комплемента, интерфероны и др.; их физико-химические и биологические свойства.
8. Серологические реакции: РА, РП, РИФ прямая и непрямая, ИФА. Компоненты, механизмы, практическое использование.
9. Вакцины: классификация, состав, показания к применению, пути введения.

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. В РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ::

- 1) преципитирующая сыворотка;
- 2) агглютинирующая сыворотка;
- 3) сыворотка обследуемого;
- 4) комплемент;
- 5) фагоциты;

2. АКТИВНЫЙ, ЕСТЕСТВЕННО ПРИОБРЕТЕННЫЙ ИММУНИТЕТ:

- 1) постинфекционный;
- 2) поствакцинальный;

- 3) трансплацентарный;
  - 4) постсывороточный;
  - 5) неспецифический;
3. ПЕНТАМЕРАМИ ЯВЛЯЮТСЯ.:
- 1) JgE;
  - 2) IgM;
  - 3) IgG;
  - 4) IgD;
  - 5) IgA;
4. ФЕРМЕНТ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТКОЙ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ:
- 1) РА;
  - 2) РП;
  - 3) РСК;
  - 4) ИФА;
  - 5) РИФ;
5. ПРЕИМУЩЕСТВА ЖИВЫХ ВАКЦИН:
- 1) высокая реактогенность;
  - 2) высокая напряженность иммунитета;
  - 3) иммунитет формируется сразу после введения;
  - 4) иммунитет пожизненный;
  - 5) относительная простота получения;
6. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СОДЕРЖАТ:
- 1) вакцинные штаммы;
  - 2) убитые микроорганизмы;
  - 3) адъюванты;
  - 4) анатоксины;
  - 5) специфические антитела;
7. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ.:
- 1) нейтрофилами;
  - 2) Т-лимфоцитами;
  - 3) плазматическими клетками;
  - 4) тромбоцитами;
  - 5) макрофагами;
- 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. Большинство живых вакцин вводят ребенку по календарю прививок только с 12 месяцев.

**Вопрос 1:** Почему дети до 6 месяцев жизни исключительно редко болеют некоторыми инфекционными заболеваниями (например, корью, краснухой и др.)?;

**Вопрос 2:** С чем могут быть связаны неудачи вакцинации от некоторых инфекций в более ранние сроки?;

1) В первые месяцы жизни новорожденный невосприимчив к дифтерии, краснухе и кори и др. заболеваниям благодаря материнским антителам, которые получил трансплацентарно и впоследствии при грудном вскармливании.;

2) Материнские IgG препятствуют вакцинации живыми вирусными вакцинами, т.к. они нейтрализуют вакцинные вирусы. Поэтому введение таких вакцин проводится не ранее, чем в возрасте 12 мес. Возможна вакцинация детей более младшего возраста, если они родились от серонегативных матерей.;

2. Дайте характеристику иммунитета:

**Вопрос 1:** Ребенок, 7 лет, прививался АДС (адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин).;

**Вопрос 2:** Реконвалесцент по брюшному тифу (возбудитель брюшного тифа экзотоксина не образует).;

**Вопрос 3:** Ребенку 2-х лет, не привитому против кори и имевшему контакт с больным корью, был введен противокоревой иммуноглобулин.;

**Вопрос 4:** Ребенку 21 день. Мать ребенка в течение жизни прививалась, болела инфекционными заболеваниями.;

**Вопрос 5:** Человек, как вид, невосприимчив к чуме собак.;

1) Приобретенный искусственный активный антитоксический.;

2) Приобретенный естественный активный антибактериальный.;

3) Приобретенный искусственный пассивный.;

4) Приобретенный естественный пассивный.;

5) Врожденный (видовой).;

3. Гражданин «К» обратился за медицинской помощью в поликлинику по месту жительства в связи с укусом клеща. В поликлинике для экстренной профилактики клещевого энцефалита имелись два вида противоязвенного гамма-глобулина: лошадиный и человеческий.

**Вопрос 1:** Укажите особенности введения указанных препаратов.;

**Вопрос 2:** Какой гамма-глобулин необходимо ввести пациенту и как, учитывая, что у пациента отмечались

аллергические реакции на антибиотики по типу отека Квинке?;

1) Человеческий - внутримышечно одномоментно; лошадиный - дробно по Безредке.;

2) Человеческий.;

4. У больного через 12 дней после травмы руки, полученной при работе на дачном участке, развились симптомы заболевания, диагностированного в инфекционном отделении как столбняк. Больному был введен лечебный препарат; спустя несколько минут после его введения у него появились одышка, частый пульс, упало артериальное давление, больной потерял сознание.

**Вопрос 1:** Какой лечебный препарат вводился больному?;

**Вопрос 2:** Какое осложнение развилось у больного после введения данного препарата?;

**Вопрос 3:** К какому типу реакций оно относится?;

**Вопрос 4:** Какие мероприятия нужно провести для профилактики подобного осложнения?;

1) Лошадиная противостолбнячная сыворотка.;

2) Анафилактический шок.;

3) Аллергия I (немедленного) типа.;

4) Дробное введение препарата по методу Безредко с предварительной внутрикожной пробой на чувствительность.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 8.** Микробиологическая диагностика стафилококковых и стрептококковых инфекций.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): *S. aureus* остается одним из важнейших возбудителей инфекций человека, вызывая широкий спектр заболеваний: от легких и средней тяжести поражений кожи и мягких тканей до угрожающих жизни пневмоний, сепсиса и синдрома токсического шока. Изучение инфекций, вызываемых метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA) является особо актуальным, в связи с увеличением во всем мире доли в этиологической структуре нозокомиальных и внебольничных стафилококковых инфекций разной локализации. MRSA способны вызывать разнообразные клинические формы, как внутрибольничных инфекций, так и инфекций, возникших вне стационаров, включая наиболее тяжелые, такие как: бактериемия, пневмония, синдром септического шока, септический артрит, остеомиелит и другие, которые требуют длительного и дорогостоящего лечения. Появление осложнений, вызванных MRSA, приводит к увеличению сроков госпитализации, показателей летальности, значительным экономическим потерям. Практическое значение внебольничных MRSA определяется их повышенной вирулентностью, а также необходимостью пересматривать подходы к эмпирической терапии внебольничных инфекций. Появление CA-MRSA представляет серьезную проблему уже в настоящее время, и согласно существующим прогнозам, их частота будет прогрессивно увеличиваться, что необходимо учитывать при выборе терапии. Это свидетельствует о необходимости контроля за частотой встречаемости и распространением MRSA не только в глобальном масштабе, но и на локальном уровне, а также необходимости разработки методов, позволяющих провести быструю и точную дифференциацию нозокомиальных и внебольничных MRSA. Среди бактериальных инфекций болезни, вызываемые стрептококками, относятся к ведущим в инфекционной патологии. Об этом свидетельствуют данные по носительству стрептококков, заболеваемости и смертности. Данные, по ряду стран, указывают на то, что носительство стрептококков группы А в верхних дыхательных путях у школьников достигает 10-30%. Установлено, что носительство стрептококков среди населения достигает более чем 30% в зонах с умеренным климатом; в субтропических и тропических зонах эта цифра колеблется от 9 до 50%. Инфекция, вызываемая стрептококками группы А, продолжает оставаться одной из наиболее частых и общих причин заболеваемости детей. Стрептококки группы В занимают одно из ведущих мест в неонатальной патологии, а стрептококки группы С и В, обладающие некоторыми факторами группы А, индуцируют системные постстрептококковые осложнения (ревматическая лихорадка, ревматическое поражение сердца, острый гломерулонефрит). Кроме этого, стрептококки могут являться возбудителями внутрибольничных инфекций. Исходя из этого, задачами бактериологии является: 1. Своевременная диагностика стрептококковых инфекций. 2. Микробиологическая диагностика постстрептококковых осложнений. 3. Специфическая и неспецифическая профилактика данных инфекций.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агаре и методом серийных разведений., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

Стафилококки принадлежат к группе наиболее популярных объектов медицинской микробиологии. Являясь симбионтами человека и животных, они не всегда ограничивают свои взаимоотношения с хозяином рамками безвредного сожительства.

Гнойные осложнения ран и ожогов известны с древнейших времен. Роль стафилококков была установлена независимо друг от друга Пастером и Огстеном (1880 г). Более подробное описание сделал в 1884 г. Розенбах.

Свой вклад в изучение биологических свойств, диагностики, профилактики и лечения стафилококковых инфекций

внес и Б.М. Зельманович.

Среди возбудителей инфекционных заболеваний одно из ведущих мест во многих развитых странах мира принадлежит микроорганизмам семейства *Micrococcaceae*, рода *Staphylococcus*. Род *Staphylococcus* включает 37 видов ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)), различающихся по значению в патологии человека. В организме человека и приматов обнаруживают более 15 видов стафилококков, однако наиболее патогенным представителем которого является *Staphylococcus aureus*. Для практики наиболее важна идентификация *S. aureus*. *S. epidermidis* и стафилококки редких видов часто объединяют в группу коагулазонегативных (CoNS), так как в отличие от *S. aureus* они неспособны вызвать коагуляцию плазмы крови. В то же время необходимо отметить, что способность к плазмокоагуляции не является исключительным признаком *S. aureus*, этим признаком могут обладать также *S. intermedius*, *S. hyicus* и *S. schleiferi subsp. coagulans*.

Стафилококки отнесены к группе грамположительных факультативно анаэробных кокков. В чистой культуре для стафилококков характерно расположение в виде виноградной грозди, но нет такого расположения при микроскопии патологического материала, следовательно микроскопия материала является малоинформативной с позиции диагностики заболевания. Для стафилококков характерна способность к росту в температурном интервале от 6,5 до 45 °С, при рН среды в пределах 4,2 - 9,3, и 40% желчи, что подчеркивает их пластичность и приспособляемость к различным условиям.

Стафилококки обладают выраженной биохимической активностью. Они каталазоположительные, восстанавливают нитрат до нитрита или газообразного азота, гидролизуют белки, гиппурат, жиры, твины, расщепляют большое число углеводов в аэробных условиях с образованием уксусной кислоты и незначительных количеств СО<sub>2</sub>, однако эскулин и крахмал, как правило, не гидролизуют, индол не образуют. Золотистый стафилококк ферментирует манит. Растут на простых питательных средах. При культивировании в анаэробных - требуют дополнительно урацил и ферментируемые источники углерода. Клеточная стенка содержит два главных компонента - пептидогликан и связанные с ним тейхоевые кислоты, снаружи белки и гидрофильная часть липотейхоевой кислоты, являются адгезином.

Имеют полисахаридную капсулу.

Спор не образуют, но из бесспорных м/о они одни из наиболее устойчивых во внешней среде. Могут выживать в окружающей среде от нескольких часов до нескольких дней, до 190 сут. Растут в присутствии повышенных концентраций NaCl (до 15%), что используется при их выделении.

На плотных питательных средах образуют округлые выпуклые, с ровным краем колонии, непрозрачные. В аэробных условиях могут образовывать водонерастворимые пигменты - дельта-каротин и рубиксантин. На КА формируют зону гемолиза, на ЖСА - лецитиназная активность. На жидких питательных средах - равномерное помутнение.

**Антигенная структура.** В оболочке стафилококков обнаружено около 30 белковых антигенов. Антигенами также являются пептидогликан, тейхоевые кислоты, полисахариды капсулы, ферменты-токсины. Видовую и групповую антигенную специфичность связывают с тейхоевыми кислотами, вариантную и штаммовую - с полисахаридами и белками клеточной стенки. Количественный и качественный состав антигенов у разных штаммов и у одного и того же штамма в разных условиях широко варьирует, что является одной из причин низкой эффективности иммунного ответа. А также затрудняет диагностику, основанную на антигенной структуре. Серологическая дифференцировка штаммов стафилококков не является общепризнанной. Только по капсульному полисахариду золотистый стафилококк может быть разделен на 11 серотипов.

### **Экология, эпидемиология**

Стафилококки входят в состав нормальной микрофлоры кожных покровов и слизистых оболочек человека. С наибольшим постоянством стафилококки обнаруживают на слизистых оболочках глотки, крыльев носа, на коже промежности и в подмышечных впадинах. Вторая по значимости экологическая ниша для *S. aureus* - кожа, особенно участки с повышенной влажностью. Колонизация кожи создает основу для ее пиогенных инвазий. В небольшом количестве *S. aureus* присутствует в толстом кишечнике и влагалище. Изредка это служит причиной местных поражений или системных инвазий.

Взаимоотношения человека и стафилококков обычно характеризуют как симбиотические, однако при нарушении целостности кожи и слизистых оболочек они проникают в ткани и проявляют патогенные свойства. Т.е. являются эндогенной инфекцией. Повышенная чувствительность характерна для лиц с ослаблением иммунитета - местного или общего, специфического или неспецифического. Таких больных принято называть иммунокомпрометированными, а возбудители, которым они не оказывают должного сопротивления, - микробами-оппортунистами, или оппортунистическими патогенами (от англ. opportunity - удобный, подходящий случай). Нередко иммунитет компрометируют врачебные процедуры, напр. использование иммунодепрессантов или инструментальных вмешательств, нарушающих целостность кожных покровов. Поэтому большинство

оппортунистических инфекций относится к внутрибольничным (госпитальным) осложнениям.

На слизистой оболочке крыльев носа *S. aureus* у разных групп людей обнаруживают с частотой 20-40%. Носительство стафилококков может быть как постоянным, так и транзиторным. У постоянных носителей генетически неразличимые изоляты бактерий обнаруживают в течение многих месяцев и лет. Длительные наблюдения свидетельствуют о том, что приблизительно 20% (12-30%) людей относятся к постоянным носителям, у которых тот же штамм выделяется месяцы и даже годы, 60% (16-70%) - к транзиторным, (освобождаются от носительства в течение нескольких дней или недель), а у 20% (16-69%) *S. aureus* не обнаруживают. Носители являются одним из наиболее вероятных источников инфицирования окружающих, эпидемиологически опасным считается присутствие более 10 млн бактерий в 1 мл назального секрета.

При этом доказано, что носительство *S. aureus* значительно увеличивает вероятность возникновения инфекционного процесса, обусловленного собственными микроорганизмами.

1. *S. aureus*, а также коагулазонегативные стафилококки, способны вызвать инфекции не только у человека — есть данные о возможности развития данного типа инфекций у собак и лошадей и др. животных. Кроме того, есть сообщения о передаче возбудителей от человека собакам, причём последние могут быть резервуарами для последующих эпизодов реинфекции.

Стафилококки являются частыми возбудителями госпитальных инфекций. Особенно велико их значение в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), где на их долю приходится до 50% всех случаев инфекционных осложнений. Наибольшее клиническое значение среди стафилококков имеет золотистый стафилококк (*S. aureus*). Среди возбудителей послеоперационных инфекционных осложнений данный микроорганизм занимает одно из ведущих мест. Выделение *S. aureus* в высоком титре (10<sup>5</sup> КОЕ/мл или КОЕ/г) из клинического материала практически всегда свидетельствует о его этиологической значимости. *S. aureus* является одним из наиболее актуальных возбудителей госпитальных инфекций практически любой локализации, но наиболее значима его роль при инфекциях кожи и мягких тканей, пневмонии (особенно связанной с искусственной вентиляцией легких - ИВЛ), эндокардите, менингите, катетерассоциированной ангиогенной инфекции.

Контингент, находящийся в стационарах является восприимчивым к инфекциям, обусловленным *S. aureus*, что связано с появлением дополнительных возможностей (входных ворот) для микробной инвазии: инфицирование ран после хирургического вмешательства, ожогов; применение диагностических и лечебных процедур, травмирующих кожу и слизистые оболочки (бронхоскопия, катетеризация и др.), наличие иммунодефицита.

Важным механизмом передачи является воздушно-капельный, воздушно-пылевой. Контаминированные стафилококками частицы аэрозоля или комочки слизи больного и носителя оседают на поверхности объектов, высыхают и вместе с пылью поднимаются в воздух вновь. Накоплению в воздухе способствует относительно высокая устойчивость стафилококков к высыханию и действию рассеянного света. Выживаемость стафилококков в капельной фазе аэрозоля колеблется от нескольких минут до нескольких часов. В пылевой фазе выживают еще дольше.

Контаминация предметов стафилококками происходит помимо указанного при выделении гноя, испражнений, слущенного эпителия, волос, мочи и др., а также в случаях мануальных и инструментальных диагностических и лечебных мероприятиях.

Для нозокомиальных штаммов стафилококков характерен эпидемический уровень распространения, регистрация во всех больничных стационарах, полиорганность нозологических форм, множественность источников инфекции, многообразие и своеобразие путей и факторов передачи, многочисленность и постоянная сменяемость групп лиц с повышенным риском заболеваемости.

Передача стафилококков может происходить через пищу (накопление экзотоксина). Основной формой болезни в этом случае будет стафилококковая интоксикация. Нередко встречаются групповые заболевания, вызванные приемом контаминированных молочных продуктов. Источником при этом являются больные и/или носители - работники пищевого производства, лица, занятые производством готовой продукции, приготовлением пищи. Передача алиментарным путем, факторы передачи - молоко и молочные продукты, кремы, кондитерские изделия и др. Инкубационный период 2-4 ч.

#### **Факторы патогенности и их роль в патогенезе.**

У *S. aureus* известен ряд факторов вирулентности - около 70, выполняющих следующие функции в патогенезе стафилококковых инфекций: • адгезия микроорганизма к кожным покровам (поверхностные белки, капсула); Обладает сложным набором поверхностных белков - адгезинов, которые обеспечивают прикрепление к различным биологическим субстратам - муцин слизистых оболочек, протеогликаны соединительной ткани и эндотелиоцитов, фиксируются на белках экстрацеллюлярного матрикса (коллагене, фибронектине, витронектине,

фибриногене, и др.), В сочетании с транскрипционной регуляцией адгезинов и связанной с ней адаптивной (фазовой) изменчивостью адгезивных свойств это объясняет почти неограниченные возможности золотистого стафилококка в колонизации тканей хозяина. Тейхоевые кислоты запускают активацию комплемента по альтернативному пути, активируют свертывающую и калликреин-кининовую систему и также адгезию. • *инвазия тканей* (гиалуронидаза, лейкоцидин, киназы). Гиалуронидаза – гидролиз гиалуроновой кислоты в соединительной ткани. Коллагеназа – гидролиз коллагена. Липаза (лецитиназа) – разрушение липидов клетки, разрушение жировой пробки в устьях волосяных фолликулов. Фибринолизин (стафилокиназа) – растворение фибриновых сгустков. • *препятствие фагоцитозу* (белок А, капсула); Белок А – в составе клеточной стенки, неспецифически связывает Fc-фрагмент молекул IgG, приводит к подавлению опсонической активности антител (угнетение активности фагоцитоза), активации комплемента по классическому и альтернативному путям и усиливает активацию естественных киллеров. Наиболее известной таксономически значимой характеристикой *S. aureus* является способность коагулировать плазму крови, которая обусловлена продукцией внеклеточно секретируемого протеина с молекулярной массой около 44 kDa. Путем взаимодействия с протромбином плазмокоагулаза активирует процесс превращения фибриногена в фибрин. Образовавшийся сгусток защищает микробные клетки от действия бактерицидных факторов макроорганизма и обеспечивает благоприятную среду для их размножения. Впоследствии в результате растворения фибринового сгустка размножившиеся микроорганизмы поступают в кровяное русло, что может приводить к развитию генерализованных форм инфекции. • *обеспечение выживания микроорганизма внутри фагоцитов* (каталаза, каротеноиды); Каталаза – защищает бактерии от активных форм кислорода при окислительном взрыве при фагоцитозе. • *цитотоксичность* (гемолизин, лейкотоксин, лейкоцидин Пантона-Валентайна); Почти все штаммы секретируют группу цитотоксинов, которая включает 4 гемолизина (стафилолизина) (альфа, бета, гамма и дельта), наиболее важен альфа-токсин. Он связывается с мембранными ганглиозидами, действуя как детергент, запускающий образование пор в зоне рецепции. Вслед за повышением проницаемости следует усиление трансмембранного потока ионов, которые извращают клеточный гомеостаз, приводя клетку к гибели. Повреждает эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, тучные клетки, фибробласты, миоциты, эпителиоциты и др. Лейкоцидины – действует как АДФ-рибозилаза на ферменты фосфолипидного метаболизма клеточных мембран, что увеличивает проницаемость ЦПМ для  $Ca^{2+}$ , что ведет к гибели. • *экзотоксины* (энтеротоксины, токсин синдрома токсического шока), обладающие свойствами суперантигенов. Основная функция этих ферментов состоит в превращении тканей хозяина в питательный субстрат, необходимый для размножения микроба. Некоторые штаммы продуцируют один или несколько дополнительных экзопротеинов, к их числу относятся токсин синдрома токсического шока, стафилококковые энтеротоксины (А, В, Сn, D, E, G, H, I) эксфолиативные токсины (ETA и ETB).

Многие эпидемические штаммы MRSA продуцируют пирогенные токсины, обладающие суперантигенной активностью (PTSAgs), к числу которых принадлежат энтеротоксины А, В, С и токсин синдрома токсического шока (TSST-1). Взаимодействуя с варибельной областью бета-цепи рецепторов Т-клеток PTSAgs активируют значительную популяцию (10 - 50%) Т-лимфоцитов, что приводит к выбросу большого количества цитокинов. Суперантигены способны разрушать эндотелиальные клетки и могут элиминировать нейтрофилы из очагов воспаления. Они являются причиной или осложняют патогенез острых и хронических заболеваний человека, таких как септический шок, сепсис, септические артриты, гломерулонефрит и некоторых других. Неменструальный синдром токсического шока может быть ассоциирован не только со штаммами-продуцентами TSST-1, но и со штаммами, продуцирующими энтеротоксины А, В и С. Следует иметь в виду, что распознавание постхирургического токсического шока нередко бывает затруднено вследствие отсутствия характерных для золотистого стафилококка признаков нагноения в области хирургической раны. Отмечена корреляция между сенсibilизацией стафилококковыми энтеротоксинами А и В и тяжестью течения таких заболеваний, как аллергический ринит, atopический дерматит, бронхиальная астма, реактивные артриты.

## Патогенез

Коагулазонегативные стафилококки (в частности, *S. epidermidis*) имеют гораздо меньшее клиническое значение. При их выделении из биологического материала прежде всего необходимо решить вопрос клинической значимости. Выделение коагулазонегативных стафилококков из ран, дыхательных путей, дренажей из брюшной полости следует скорее всего расценивать как колонизирующий микроорганизм (клинически незначимый). В то же время выделение этих микроорганизмов из крови (более чем в одной пробе) или мочи можно расценивать как клинически значимый результат. Коагулазонегативные стафилококки также имеют этиологическое значение у новорожденных (например, менингиты) и у пациентов, находящихся на перитонеальном диализе.

В основе клинического разнообразия стафилококковой патологии лежит способность *S. aureus*: 1. вызывать пиогенную инвазию кожи 2. проникать в кровь и индуцировать пиогенные (гнойно-деструктивные) поражения внутренних органов 3. вызывать интоксикации. Чаще всего *S. aureus* поражает кожу с развитием пиодермий. Слизистые поражаются редко, отличаются от стрептококков (*S. pyogenes*), которые чаще инфицируют слизистые оболочки. Следовательно сравнительно небольшое значение стафилококков при ангинах, отитах, гайморитах, пневмониях. Как вторичная инфекция. Типовым проявлением стафилококковой инфекции является абсцесс – ограниченный очаг гнойного воспаления. При пиодермиях поражаются волосяные фолликулы, сальные и потовые железы. Выделяют фолликулит (поражение волосяного фолликула), фурункул (поражение волосяного фолликула с

захватом близлежащих тканей), ячмень, карбункул (слияние нескольких фурункулов), гидраденит (воспаление апокриновых потовых желез), импетиго (поверхностные поражения кожи типа гнойничковой сыпи), синдром ошпаренной кожи – отслоение эпидермиса на значительной поверхности туловища и конечностей после слияния и изъязвления пузырьков под действием токсина – эксфолиатина (обычно дети до 12 мес., чаще в первые дни после рождения). В связи с особенностью стафилококковой инфекции – абсцедирование, редко эти микроорганизмы в норме могут вызывать инвазивные инфекции. Опасна локализация инфекционных процессов в носогубном треугольнике, с связи с со слабым развитием соединительной ткани, отсутствием клапанов в венах, напрямую связанных с мозговыми синусами, постоянным движением мимической мускулатуры, что создает угрозу попадания инфекции в головной мозг. Стафилококковые абсцессы могут осложняться бактериемией, которая угрожает сепсисом с формированием новых очагов. Септицемия – интоксикация и нарушение органных функций. Генерализация наиболее вероятна у ослабленных лиц, однако возможна и на фоне местных незначительных поражений, от которых казалось бы трудно ожидать серьезных последствий. Особенно при локализации в носогубном треугольнике. Чаще при генерализации инфицируется костный мозг – остеомиелит. Биопленки, хронизация процесса. При длительной бактериемии возможно поражение сердца – тяжелое осложнение. Обычно поражаются органически измененные клапаны (ревматизм, после хирургического вмешательства). Могут вызывать пневмонию, протекающую по типу пиогенной деструкции легких, завершаясь быстрой смертью или абсцедированием, которые могут прорываться в плевральную полость (эмпиема). Речь чаще идет о нозокомиальной пневмонии, однако во внебольничных условиях стафилококк вызывает часто вторичную пневмонию, например на фоне гриппа. Стафилококковая инвазия чревата интоксикацией вплоть до развития синдрома токсического шока. Могут вызывать пищевые токсикоинфекции. Таким образом, клинические проявления стафилококковых инфекций во многом определяются преобладанием процессов токсинообразования или инвазии тканей. При приеме пищи, контаминированной штаммами стафилококков, продуцирующих энтеротоксины, развивается типичная интоксикация. Синдром токсического шока вызывают штаммы, продуцирующие соответствующий токсин. Типичные инфекции кожи и мягких тканей – фурункулы, флегмоны, флебиты, маститы, а также остеомиелиты, эндокардиты, менингиты и пневмонии – связаны в основном с инвазивностью *S. aureus*. Все перечисленные нозологические формы инфекций могут быть как внебольничными, так и госпитальными.

**Гетерогенность стафилококков.** При этом не только гены антибиотикорезистентности, но и многие гены патогенности присутствуют в хромосоме в составе различных типов островов «патогенности», стафилококковых хромосомных каскадов (SCC), профагов. В разных штаммах эти генетические элементы существуют в виде аллельных форм и характеризуются различной степенью мобильности. Генетическое разнообразие внутри вида является следствием горизонтального переноса генов, расположенных на мобильных генетических элементах (МГЭ).

Это обеспечивает гетерогенность популяции стафилококков м\в проявляется практически по всем признакам, но особенно она выражена в антибиотикорезистентности, а также устойчивости к антисептикам, дезинфектантам, бактериофагам, бактериоцинам.

Установлена гетерогенность популяции стафилококков одного вида с позиции способности к синтезу факторов токсичности: разные штаммы обладают различной токсичностью. На экспрессию факторов патогенности оказывают влияние условия внешней среды и процесс индивидуального взаимодействия макроорганизма и бактерий, а также плотность популяции последних.

Одним из механизмов, диктующих экспрессию факторов вирулентности, служит феномен кооперативной чувствительности (quorum sensing) или чувство кворума. В наиболее общем виде данный феномен можно рассматривать как пример «социального» поведения бактерий, поскольку его смысл заключается в модификации физиологических функций бактерий в ответ на изменение их численности. Механизм реализации феномена кооперативной чувствительности заключается в продукции м\ми внеклеточных сигнальных молекул (аутоиндукторов, феромонов), детекции сигнальных молекул и генерации ответной реакции. Таким образом, увеличение численности стафилококков в организме выше этиологически значимого порога для бактерий –  $10^5$  КОЕ\мл способствует развитию инфекционного процесса.

Феномен кооперативной чувствительности регулирует также процесс формирование биопленки – несколько слоев микроорганизмов, покрытых общим гликокаликсом – сложной полимерной структурой полисахаридной природы.

**MRSA.** Особое беспокойство вызывает появление инфекций, вызванных метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA), доля которых в этиологической структуре нозокомиальных стафилококковых инфекций продолжает увеличиваться во всем мире. Распространение метициллинрезистентности относится к одной из наиболее серьезных проблем современного здравоохранения. Первым β-лактамом, устойчивым к гидролизу стафилококковыми β-лактамазами, был метициллин, внедренный в медицинскую практику в 1959 г., однако уже в 1961 г. появились сообщения о выделении штаммов стафилококков, устойчивых к данному антибиотику. Механизм устойчивости оказался связанным с приобретением микроорганизмами дополнительного пенициллинсвязывающего белка – ПСБ2а или ПСБ2\', который кодируется геном *mecA*, входящим в состав подвижного генетического элемента «стафилококковой хромосомной каскады *mec*» (staphylococcal cassette chromosome *mec* - SCC*mec*).

Данные метаанализа свидетельствуют о том, что летальность при бактериемиях, вызываемых метициллин-устойчивыми штаммами *S. aureus*, достоверно выше, чем при инфекциях, вызываемых чувствительными штаммами. Трудности лечения инфекций, вызываемых MRSA, связаны не только с их устойчивостью к  $\beta$ -лактамам, но и с устойчивостью к макролидам, фторхинолонам, аминогликозидам, тетрациклинам и другим препаратам, формирующейся в результате приобретения экзогенного генетического материала или мутаций в собственных генах. В связи с множественной устойчивостью MRSA, в течение долгого времени основными препаратами для лечения инфекций, вызываемых метициллин-устойчивыми стафилококками, остаются гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин), оксазолидиноны (линезолид). Однако клиническая эффективность этих препаратов нередко оказывается значительно ниже, чем у антибиотиков, используемых для лечения пациентов с осложнениями, вызванными метициллинчувствительными *S. aureus*. По данным Центра по контролю за заболеваниями (США), средняя продолжительность пребывания пациента в больнице в случае хирургического вмешательства составляет 6,1 дня, тогда как при возникновении осложнений, вызванных MRSA, она увеличивается до 29,1 дней, при этом средние расходы возрастают с 29455 \$ до 92363 \$ в пересчете на каждый случай.

Основным резервуаром и источником инфекции в госпитальной среде являются как инфицированные, так и колонизованные пациенты. Факторами, способствующими инфицированию пациентов MRSA, являются: длительное пребывание в стационаре, неправильное назначение антибиотиков, прием более одного антибиотика, продолжительность антибиотикотерапии более 20 дней, катетеризация, пожилой возраст, иммунодефицитные состояния, ожоги, хирургические раны, гемодиализ и др. При подозрении на развитие инфекции необходимо проведение микробиологического исследования отделяемого раны, кожных поражений, мест манипуляций, интравенозного катетера, трахеостомы и других видов стом, крови, мокроты, а также мочи у катетеризованных пациентов. В случае возникновения колитов или энтероколитов, ассоциированных с приемом антибиотиков, необходимо проводить исследование кала.

Колонизованными у пациента могут быть следующие эпителии: передние отделы слизистой оболочки полости носа (наиболее часто колонизируемый эпителий), слизистая оболочка глотки, область промежности, пупочное кольцо, влажные, разнообразные кожные поражения. Колонизация пациента MRSA в 30 - 60% случаев приводит к развитию инфекции. При соблюдении в надлежащем объеме профилактических санитарно-противоэпидемических мероприятий, наличие микроорганизмов в моче или кале менее значимо для распространения инфекции в окружающей среде лечебного учреждения.

Источниками MRSA в стационаре могут являться и медицинские работники, среди которых также наблюдается носительство на слизистой оболочке полости носа.

Распространение метициллинрезистентности относится к одной из наиболее серьезных проблем современного здравоохранения. Так, в США частота выявления нозокомиальных штаммов MRSA возросла до 60%, в странах Азии - до 70%. Благодаря жестким противоэпидемическим мероприятиям, в Европе этот показатель гораздо ниже - 1% в Нидерландах, Швеции и до 25% в остальных странах Европы. В России этот показатель достиг 46,5% (от 0 до 89,5%) (при этом максимальная вероятность MRSA инфекции наблюдалась в ожоговых (78%), травматологических (42%), онкогематологических отделениях и в ОПИТ (55%)). Выявляемость MRSA в больницах Красноярск составляет от 20-26% до 66-68% в зависимости от конкретного подразделения больницы.

В конце 80-х годов XX века на основании сходства фенотипических характеристик клинических изолятов MRSA, выделенных во время вспышек ВБИ в разных стационарах, сформировалось представление о способности некоторых госпитальных штаммов MRSA к эпидемическому распространению. При этом туризм, медицинский туризм, миграционные процессы, военные действия (заброс армии на вражескую территорию) способствуют переносу эпидемических клонов на разные территории и эволюции микроорганизмов.

Внедрение молекулярных методов типирования позволило выявить наличие доминирующих клонов MRSA, распространенных во всем мире. Среди эпидемических HA-MRSA клонов, ST239 MRSA является одним из наиболее распространенных во всем мире и изолирован в Азии, Северной и Южной Америке, Европе, Австралии, а также в России - Бразильский, Португальский, Венгерский, Венский, а также британские EMRSA-1, 4, и 11 клоны, Генотип ST239 MRSA преимущественно относится к типу *spa3*(t037), однако может относиться и к другим *spa* типам, таким как *spa351*(t030).

В течение многих лет метициллин-резистентные стафилококки рассматривались исключительно как госпитальные патогены (hospital-acquired MRSA - HA-MRSA), однако с 1990-х годов появились внебольничные штаммы. «community-acquired MRSA», резистентность которых развилась в амбулаторных условиях.

CA-MRSA отличаются от нозокомиальных по ряду показателей:

- у пациентов в анамнезе не выявляются факторы риска инфицирования нозокомиальными штаммами;
- с высокой частотой продуцируют лейкоцидин Пантона-Валентайна;

- генотипы внебольничных и нозокомиальных изолятов различаются;

К клонам внебольничных мрса относятся ST30, ST80, ST1, ST8.

В частности отличаются по структуре хромосомной кассеты – отсутствию гены резистентности к другим группам АМХ в отличии от внутрибольничных и следовательно часто устойчивы только к β-лактамам аβ.

Внебольничные штаммы MRSA вызывают преимущественно (95%) инфекции кожи и мягких тканей, такие как абсцесс, целлюлит, импетиго, фурункулы и другие, однако описаны случаи инфекций другой локализации – пневмония, эндокардит, синдром токсического шока и стафилококковый сепсис, бурситы, остеомиелит, септический артрит и др. некоторые, из которых могут приводить к летальному исходу.

Факторами риска для инфицирования CA-MRSA являются социальные факторы, несоблюдение личной гигиены, детский возраст, наличие травм кожного покрова. Инфицирование происходит в основном контактным путем. Группой риска являются спортсмены, занимающиеся контактными видами спорта; гомосексуалисты; заключенные; военнослужащие; лица имеющие татуировки, носящие пирсинг; дети, находящиеся в организованных коллективах.

Практическое значение CA-MRSA определяется их повышенной вирулентностью, а также необходимостью пересматривать подходы к эмпирической терапии внебольничных инфекций.

Для проведения адекватной терапии инфекционных заболеваний, вызванных такими микроорганизмами необходимо проводить дифференциацию внебольничных MRSA от нозокомиальных.

### **Рекомендации по лечению стафилококковых инфекций**

Лечение стафилококковых инфекций, обусловленных штаммами, не продуцирующими β-лактамазы, не вызывает затруднений, поскольку возможности выбора эффективных препаратов достаточно широки, начиная с бензилпенициллина. Однако в силу крайне широкого распространения среди стафилококков β-лактамаз применение природных и незащищенных полусинтетических пенициллинов нецелесообразно. В качестве стандартного антибиотика для лечения стафилококковых инфекций, вызванных метициллиночувствительными штаммами, рассматривается оксациллин.

В качестве альтернативы β-лактамам (например, при их непереносимости) можно рассматривать комбинации макролидов, аминогликозидов и фторхинолонов. Для лечения стафилококковых инфекций, вызываемых метициллиноустойчивыми штаммами, в качестве стандарта терапии рассматриваются гликопептиды, хотя, как уже было отмечено, эти антибиотики являются субоптимальными. Альтернативой гликопептидам могут быть разные комбинации рифампина, ко-тримоксазола, фузидиевой кислоты, аминогликозидов и тетрациклинов. Однако контролируемые клинические испытания, в которых бы надежно были обоснованы режимы использования перечисленных препаратов, не проводились.

В 1996 г. в Японии были выделены штаммы *S. aureus*, со сниженной чувствительностью к ванкомицину, в дальнейшем подобные штаммы были выделены и в других географических регионах. МПК ванкомицина в отношении таких штаммов варьирует в пределах 8,0-16,0 мкг/мл (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* или glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* – VISA или GISA). Кроме VISA штаммов, описаны также hVISA-(hetero vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*) – изоляты, отличающиеся нестабильностью свойств и значительной гетерогенностью микробной популяции по уровню устойчивости к ванкомицину, повышение МПК ванкомицина выявляется лишь в отношении менее чем 0,1% популяции. Считается, что hVISA-штаммы являются одним из этапов формирования VISA-штаммов. При лечении ванкомицином вызываемых такими микроорганизмами инфекций наблюдаются клинические неудачи. Снижение чувствительности к ванкомицину связано с усилением синтеза пептидогликана и уменьшением образования поперечных сшивок, клеточная стенка у штаммов GISA значительно толще, чем у чувствительных штаммов. В результате описанных изменений значительная часть ванкомицина связывается в верхних слоях клеточной стенки и не достигает мишени действия.

Кроме описанного механизма устойчивости, в эксперименте была показана возможность передачи стафилококкам от энтерококков плазмиды, кодирующей детерминанты высокого уровня устойчивости к ванкомицину, однако в клинической практике такой феномен не обнаруживали до 2002 г. В 2002 г. с небольшим интервалом появились два сообщения из США о выделении в разных географических регионах (Пенсильвания и Мичиган) штаммов *S. aureus* с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину, в последующее годы из США появилось еще несколько сообщений о выделении штаммов с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину. На август 2012 г. – 12 штаммов VRSA во всем мире. У выделенных штаммов был обнаружен ген *vanA*, характерный для ванкомициноустойчивых энтерококков. Вероятно, что ранее наблюдавшийся только в эксперименте феномен передачи от энтерококков к стафилококкам плазмиды, кодирующей устойчивость к ванкомицину, произошел и в клинической практике. Интересно отметить, что в двух случаях выделение устойчивых штаммов не было связано с лечением ванкомицином.

## Иммунитет

Золотистый стафилококк вызывает иммунный ответ, но сохраняет свою потенциальную болезнетворность. Но даже высокий титр антител не способен обеспечить полноценную защиту. Клеточно-гуморальный, нестойкий, малонапряженный.

## Специфическая профилактика

Ведутся разработки рекомбинантной вакцины, препятствующей формированию биопленок.

Созданные вакцины, к сожалению, не обладают эффективной защитой.

- Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный – профилактика стафилококковых инфекций у лиц с повышенным риском заболевания – промышленные и сельскохозяйственные рабочие, у которых частые травмы; больные, которым предстоит плановые операции.
- Вакцина стафило-протейно-синегнойная адсорбированная (смесь анатоксинов стафилококка, синегнойной палочки, Ag стафилококка и протейя) – для лиц 18-60 лет.

## Специфическая терапия хронической инфекции

- Вакцина стафилококковая – инактивированная. Для взрослых при хронических заболеваниях кожи стафилококко и стафило-стрептококковой этиологии.
- Вакцина стафилококковая для иммунотерапии – химическая. Для взрослых при хронических заболеваниях кожи стафилококковой этиологии.
- Вакцина стафилококковая лечебная (антифагин стафилококковый) – химическая – с 6 мес возраста при хронических заболеваниях кожи стафилококковой этиологии.
- Вакцина поликомпонентная из антигенов УПМ для иммунотерапии – химическая (Ag стафилококка, протейя, клебсиеллы, кишечной палочки) с 3 лет для лечения с инфекциями органов дыхания, назально, назально-орально.
- Анатоксин стафилококковый – для терапии хронических инфекций стафилококковой этиологии, для детей и взрослых.
- Иммуноглобулин антистафилококковый
- Бактериофаг стафилококковый
- Пиобактериофаг (включает стафилококковый, стрептококковый, протейный, синегнойный, коли-бактерий)
- Интести-бактериофаг

## Диагностика.

Выделение и идентификация стафилококков проводят с использованием «золотого стандарта» – бактериологического метода согласно стандартным методикам; также возможно использование ПЦР, однако при использовании не количественной ПЦР возникают трудности интерпретации результатов.

Определение чувствительности к антибиотикам:

- метод скрининга на среде с оксациллином для определения MR;
- диско-диффузионный метод и методы серийных разведений (в агаре и бульоне);
- ПЦР, мультиплексная ПЦР, секвенирование (выявление *mec A*-гена и генов, кодирующих устойчивость к разным группам антибиотиков (*aadD* – ген резистентности к тобрамицину и канамицину; *pT181* – интегрированная плазида, кодирующая резистентность к тетрациклину; *tetK* – ген резистентности к тетрациклину; *Tn554* – транспозон, содержащий ген резистентности к эритромицину (*ermA*) и др.)).

Более 40 лет фаготипирование было основным методом внутривидовой дифференциации *S. aureus*. Однако низкая чувствительность штаммов MRSA к бактериофагам Международного набора послужила толчком к бурному развитию молекулярно-генетических методов их типирования. В настоящее время фаготипирование следует рассматривать как вспомогательный метод, а результаты, полученные с его помощью, оценивать как предварительные, позволяющие выявить фенотипическое разнообразие исследуемых клинических изолятов MRSA.

Серодиагностика. Антитела к тейхоевой кислоте, главному компоненту клеточной стенки грамположительных бактерий, обычно выявляют при продолжительных или хронических стафилококковых инфекциях, таких как остеомиелит. Однако, клиническая значимость этого исследования сомнительна.

## Классификация и морфо-биологические свойства стрептококков.

Семейство: *Streptococcaceae*, род: *Streptococcus* и *Enterococcus*. В патологии человека наибольшее значение принадлежит следующим видам: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*.

Стрептококки - это грамположительные полиморфные кокки, располагающиеся цепочками в жидких питательных средах, с характерным придонно-пристеночным ростом на МПА, не подвижны, спор не имеют. Требовательны к питательным средам. Культивируются на питательных средах с добавлением глюкозы, сыворотки или крови. Температурный оптимум роста 37°C, рН-7,6-7,8, факультативные анаэробы. Пневмококки - это грамположительные диплококки ланцетовидной формы, окружены капсулой, не подвижны, спор не имеют. Потребность в питательных веществах, оптимум, кислотность, тип дыхания те же.

**Антигенное строение стрептококков.** Стрептококки имеют несколько типов антигенов, позволяющих их дифференцировать. Антигеном, позволяющим разделить стрептококки на серогруппы, является полисахарид (субстанция С). Существуют серогруппы А, В, С, D, Е и т. д. Полисахаридный антиген является компонентом клеточной стенки стрептококков. У серогруппы А - это рамнозо-N-ацетилглюкозамин. Полисахаридный антиген группоспецифичен. Внутри группы происходит деление на серовары, благодаря наличию других антигенов различной природы. В группе А - это белковые антигены М, Р и Т. В серогруппе А обнаружены перекрестно реагирующие антигены. У пневмококка есть полисахаридный антиген клеточной стенки, М-белок и капсульные антигены. По различию капсульных антигенов пневмококки разделены на серовары.

**Патогенность стрептококков.** Факторами патогенности стрептококков являются экзотоксины, ферменты, компоненты самих бактериальных клеток.

**Токсины:** О-стрептолизин, вызывающий гемолиз эритроцитов и оказывающий цитотоксическое действие на культуры клеток, обладающий кардиотоксическим действием; S-стрептолизин - лизирует эритроциты; лейкоцидин - лизирует полиморфноядерные лейкоциты; цитотоксины - нефритогенные токсины; эритрогенины - скарлатинозные токсины 14 серотипов.

**Ферменты:** гиалуронидаза, стрептокиназа.

**Элементы клеток:** М-антиген и капсула.

### **Экология, особенности эпидемиологии, патогенез стрептококковых и энтерококковых инфекций.**

**Заболевания, вызываемые стрептококками.** Стрептококки вызывают у человека специфические и неспецифические заболевания. К специфическим относятся: крупозная пневмония, рожистое воспаление, скарлатина. К неспецифическим относятся: нагноительные процессы (флегмоны, абсцессы, раневые инфекции, ангины, менингиты). Ревматизм и нефрит являются осложнениями стрептококковой инфекции.

Стрептококки серогруппы В (*S. agalactia*) могут вызывать послеродовые инфекции и сепсис новорожденных, эрозивный стоматит, урогенитальные инфекции у женщин, сепсис, менингит.

Стрептококки серогруппы С зарегистрированы как возбудители респираторных инфекций, заболеваний мочеполовой системы.

Стрептококки серогрупп Н и К выделены при эндокардитах.

Стрептококки серогруппы D (род *Enterococcus*) обитают в кишечнике здорового человека и при определенных условиях вызывают поражения желчевыводящих путей, могут вызвать эндокардит, а при попадании в раны - раневую гнойно-воспалительную инфекцию. При генерализации патологического процесса возникает сепсис.

Некоторые стрептококки (*S. mutans*, *S. salivarius* и др.), не содержащие группового антигена, обитают в полости рта. *S. mutans* участвует в развитии кариеса зубов и заболеваний пародонта.

Стрептококки других патологических групп редко обнаруживаются у человека.

**Этиопатогенетическая роль стрептококков.** Скарлатина - одна из клинических форм стрептококковой инфекции. Возбудителем является (гемолитический стрептококк группы А - *S. pyogenes*), продуцирующий эритрогенный токсин. Наиболее частым местом проникновения в организм является слизистая оболочка миндалин. Попадая на слизистую, стрептококк вызывает воспалительные и некротические изменения в месте внедрения. По лимфатическим и кровеносным сосудам возбудитель проникает в регионарные лимфоузлы. Токсин, попадая в кровь и имея тропизм к вегетативно-эндокринному и нервно-сосудистому аппарату, вызывает симптомы общей интоксикации и симптомы поражения сосудов. Формируется инфекционная аллергия, клинически проявляющаяся повышением температуры и высыпаниями (напоминает сывороточную болезнь). Измененная реактивность организма играет основную роль в патогенезе скарлатины, т. к. аллергическое состояние сопровождается повышенной проницаемостью сосудистой стенки, снижением иммунитета и нарушением барьерных функций, создавая благоприятные условия для микробной инвазии и реализации септического компонента.

**Ревматизм.** Доказана связь острой носоглоточной стрептококковой инфекции и недостаточно эффективное ее

лечение с возникновением ревматизма. Стрептококк оказывает прямое или опосредованное повреждающее действие на ткани за счет различных клеточных и внеклеточных антигенов и токсинов. Среди них большую роль играет М-протеин клеточной стенки, являющийся фактором вирулентности, Т-протеин, гиалуроновая кислота капсулы, способная подавлять фагоцитарную активность нейтрофилов; мукопептид, обладающий «эндотоксическим» действием; ЦПМ, в составе которой имеются перекрестно реагирующие антигены с миокардом. Кроме того, имеется большая группа экзоферментов. Это стрептолизины О и S, стрептокиназа и гиалуронидаза, протеины и дезоксирибонуклеаза В и др., в ответ на воздействие которых образуются противострептококковые антитела, обладающие патогенетическим действием. Для возникновения ревматизма нужна индивидуальная гипериммунная реакция организма на стрептококковые антигены и продолжительность этого ответа. Имеет значение и переживание стрептококков в организме в виде L-форм.

*Источники и пути передачи возбудителя.* Среди стрептококков различают возбудителей заболеваний только человека, человека и животных и условно-патогенные для человека варианты. Стрептококки человеческих экovarов обитают в полости рта, на слизистых оболочках верхних дыхательных путей человека, на коже, в кишечнике. Источником заражения являются больные люди и бактерионосители. Путь распространения экзогенных инфекций воздушно-капельный. У лиц с иммунодефицитами - эндогенный путь заражения.

### **Материалы и методы микробиологической диагностики.**

*Материалы* для исследования: слизь из зева (ангина); гной (абсцессы и т. д.); кровь (сепсис); соскоб с пораженного участка кожи (стрептодермия); спинномозговая жидкость (менингит); мокрота.

*Диагностика крупозной пневмонии.*

Методы диагностики - микроскопический, бактериологический, биологический. Основной метод диагностики - биологический. Мокроту засевают на кровяной агар и одновременно заражают внутрибрюшинно белых мышей. Мыши очень чувствительны к пневмококку, они погибают через 18-72 часа. Кровь из сердца мыши, кусочки внутренних органов и перитонеальную жидкость засевают на КА и в пробирку с сывороточным бульоном.

Колонии пневмококка мелкие, почти плоские, с вдавлением в центре, не прозрачные, с ореолом зеленого цвета вокруг ( $\alpha$ -гемолиз). Вид определяют, учитывая ланцетовидную форму диплококков, наличие капсулы, высокую вирулентность для белых мышей, растворение желчью и расщепление инулина.

*Диагностика скарлатины.*

Микробиологическая диагностика скарлатины используется в связи с относительной простотой клинической диагностики редко и имеет значение при проведении научных исследований. Применяют бактериологический метод исследования слизи из зева. В случае неясной картины можно вводить подкожно токсин Дика. Диагноз ставится в случае получения феномена «гашения сыпи» (токсин Дика - это очищенный эритрогенный токсин стрептококка, вызывающего скарлатину; применяется внутрикожно с целью определения напряженности антитоксического иммунитета при скарлатине).

*Диагностика ревматизма.*

Диагностика ревматизма осуществляется серологическими методами по выявлению антител к токсинам и ферментам стрептококков. При ревматизме изучают наличие антигиалуронидазы, анти-О-стрептолизина, антидеоксири-бонуклеазы, антистрептокиназы и др. Нарастание титра этих антител является достоверным показателем стрептококковой инфекции.

### **Иммунитет.**

По характеру иммунитет антитоксический и антибактериальный. Постинфекционный антимикробный иммунитет малонапряженный, исключение составляет скарлатина: у переболевших скарлатиной иммунитет стойкий, антитоксический.

### **Специфическая профилактика и терапия.**

Специфическая профилактика у нас в стране не разработана. Для специфической профилактики пневмококковой инфекции используют полисахаридную вакцину Пневмо 23, а также конъюгированную вакцину Превенар-13. Для специфической терапии используют стрептококковый бактериофаг, а при хронических заболеваниях рациональным является применение аутовакцины.

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Классификация и морфо-биологические свойства стафилококков.
2. Назовите специфические заболевания стрептококковой этиологии.

3. Обоснуйте возможность использования микроскопического метода диагностики пневмококковых и менингококковых инфекций.
4. Факторы вирулентности стафилококков.
5. Экология, эпидемиология и особенности патогенеза стафилококковых инфекций.
6. Роль стафилококков в развитии внутрибольничных инфекций (ВБИ).
7. Материал и методы микробиологической диагностики стафилококковых инфекций.
8. Специфическая профилактика и терапия стафилококковых инфекций.
9. Понятие нозокомиальные и внебольничные MRSA.
10. Этиотропная антимикробная химиотерапия стафилококковых инфекций. Особенности лечения заболеваний, вызываемых MRSA/MRSE.
11. Роль неспецифической профилактики в предупреждении ВБИ стафилококковой этиологии.
12. Особенности неспецифической профилактики ВБИ, вызываемых MRSA/MRSE.

**6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ФЕРМЕНТЫ АГРЕССИИ СТРЕПТОКОККОВ:

- 1) фибринолизин, гиалуронидаза;
- 2) эндонуклеаза, гиалуронидаза;
- 3) транспептидаза;
- 4) эндонуклеаза;
- 5) транспептидаза, ДНК-аза;

2. ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА СТРЕПТОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ:

- 1) только интоксикация;
- 2) флегмонозное воспаление и отсутствие осложнений;
- 3) ограниченный очаг воспаления;
- 4) органотропность;
- 5) флегмонозное воспаление, аутоиммунные процессы;

3. ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ПНЕВМОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ ИСПОЛЬЗУЮТ:

- 1) пенициллины;
- 2) витамины;
- 3) вакцину пневмо-23;
- 4) аутовакцину;
- 5) иммуномодуляторы;

4. СТАФИЛОКОККИ ОТНОСЯТСЯ К РОДУ:

- 1) Planococcus;
- 2) Enterococcus;
- 3) Staphylococcus;
- 4) Streptococcus;
- 5) Micrococcus;

5. НАИБОЛЕЕ ВИРУЛЕНТНЫЙ ВИД СТАФИЛОКОККОВ:

- 1) *S. epidermidis*;
- 2) *S. saprophyticus*;
- 3) *S. aureus*;
- 4) *S. intermedius*;
- 5) *S. haemolyticus*;

6. ЭЛЕКТИВНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ:

- 1) кровяной агар;
- 2) МПА;
- 3) МПБ;
- 4) желточно-солевой агар (ЖСА);
- 5) Эндо;

7. ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ СТАФИЛОКОККАМИ:

- 1) фурункулез;
- 2) мастит;
- 3) остеомиелит;
- 4) пневмония;
- 5) все вышеперечисленное;

8. ДЛЯ ПАТОГЕНЕЗА СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ ХАРАКТЕРНО:

- 1) органотропность;
- 2) чаще поражаются слизистые, чем кожа;
- 3) только острое течение;
- 4) абсцедирование;
- 5) невозможность развития инвазивных инфекций;

9. ОСНОВНОЙ ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ ПРИ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЯХ:

- 1) воздушно-пылевой;
  - 2) воздушно-капельный;
  - 3) трансплацентарный;
  - 4) алиментарный;
  - 5) контактный;
10. УЧАСТИЕ СТАФИЛОКОККОВ В РАЗВИТИИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ СВЯЗАНО С:
- 1) посещением больных родственниками;
  - 2) носительством стафилококков медицинским персоналом;
  - 3) отсутствием вакцинации сотрудников стафилококковой вакциной;
  - 4) высокой вирулентностью;
  - 5) соблюдением санитарно-эпидемиологического режима;
11. МЕРЫ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ В ЛПУ:
- 1) мытье рук;
  - 2) обработка рук антисептиками;
  - 3) ношение перчаток;
  - 4) санация носителей среди медицинского персонала;
  - 5) все вышеперечисленное;
12. ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ (MRSA) ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) оксациллин;
  - 2) ампициллин/сульбактам;
  - 3) цефазолин;
  - 4) цефаклор;
  - 5) ванкомицин;
13. МЕХАНИЗМ КЛАССИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СТАФИЛОКОККОВ К МЕТИЦИЛЛИНУ (MRSA):
- 1) снижение проницаемости клеточных мембран;
  - 2) эффлюкс антибиотиков;
  - 3) гиперпродукция  $\beta$ -лактамаз;
  - 4) модификация обычных ПСБ;
  - 5) продукция дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ-2а);

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. При исследовании раневого отделяемого, взятого у больного с клиническим диагнозом «флегмона предплечья», выделена культура *Enterococcus durans* в количестве  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл

**Вопрос 1:** Оцените полученный результат;

**Вопрос 2:** Обоснуйте возможность участия данного микроорганизма в развитии гнойно-воспалительного заболевания;

**Вопрос 3:** Зачем необходимо определять количество микроорганизмов;

1) Клинический диагноз подтвержден. Этиологическим фактором является *Enterococcus durans*;

2) *Enterococcus durans* является представителем нормальной микрофлоры ЖКТ, но при попадании в несвойственный для него биотоп, при увеличении количества способен вызывать гнойно-воспалительные заболевания кожи и мягких тканей;

3) Количество необходимо определять для доказательства этиологической роли микроорганизма в развитии данной патологии;

2. Юноша, 14 лет, обратился к дерматологу с жалобами на гнойные поражения лица, проявляющиеся в виде небольших пузырей, которые, высыхая, образуют тонкие корочки. После их удаления остаются розовые пятна. Врач поставил диагноз «стрептококковое импетиго». Для уточнения диагноза содержимое пузырьков было направлено в бактериологическую лабораторию

**Вопрос 1:** Назовите возбудителя, укажите его таксономическое положение (семейство, род, вид);

**Вопрос 2:** Какими методами можно провести лабораторное исследование для уточнения диагноза;

**Вопрос 3:** Как определяют у выделенной культуры принадлежность к серогруппе и серовару, какие серологические реакции используют;

1) Сем. *Streptococcaceae*, род *Streptococcus*, вид *Streptococcus pyogenes*;

2) Бактериологическое исследование с определением количества возбудителя;

3) Для определения принадлежности к серогруппе и серовару проводят серотипирование с использованием латекс-агглютинации;

3. Известно, что около 95% штаммов *S. aureus*, циркулирующих в стационарах РФ устойчивы к пенициллину, а порядка 40% являются MRSA. При этом с каждым годом количество таких штаммов увеличивается

**Вопрос 1:** Объясните причину и суть столь быстрого появления резистентности штаммов *S. aureus*;

**Вопрос 2:** Приобретение каких еще свойств может обеспечить данный процесс;

1) Вследствие горизонтальной передачи генов резистентности, закодированных в плазидах, транспозонах.

Устойчивость к пенициллину обусловлена синтезом пенициллиназ. Резистентность к метициллину обусловлена продукцией дополнительного ПСБ2а, закодированного в гене *mecA* (является частью SCC<sub>mec</sub> элемента, в

котором присутствуют гены, кодирующие резистентность к другим антимикробным препаратам);  
2) Посредством плазмид могут также передаваться гены, кодирующие резистентность к антисептикам, дезинфектантам; гены вирулентности; гены, кодирующие продукцию бактериоцинов, образование F-пилей;  
4. В ГКБ поступил пациент с абсцессом правого бедра. В момент поступления был забран патологический материал и проведен бактериологический метод диагностики, выделены – *S. aureus* и *S. epidermidis* в количестве 107 КОЕ/г. Через 5 суток пребывания в стационаре из раны был выделен MRSA

**Вопрос 1:** В результате чего произошла смена возбудителя;

**Вопрос 2:** Назовите генотипические методы, позволяющие доказать вашу точку зрения;

**Вопрос 3:** Что является основой генотипирования с целью выявления источника и путей распространения;

1) Вследствие нахождения в стационаре произошло присоединение внутрибольничной инфекции, вызванной MRSA. Возможными источниками инфекции являлись бактерионосители MRSA среди медицинского персонала, больные; возможными факторами передачи – руки, медицинский инструментарий, оборудование, предметы ухода и обихода вследствие нарушения санитарно-эпидемического режима;  
2) Для генотипирования выделенных штаммов используются методы: плазмидный анализ; рестрикционный анализ хромосомной ДНК; пульс-электрофорез; изучение полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-ПЦР); риботипирование; ПП-ПЦР; анализ нуклеотидной последовательности (секвенирование);  
3) Основой генотипирования является то, что клонально родственные изоляты имеют определенную характеристику, или признаки, посредством которых они могут быть дифференцированы от неродственных изолятов. Для подтверждения данной точки зрения необходимо установить соответствие выделенных штаммов от больного и штаммов, выделенных от медицинского персонала и с объектов окружающей среды;  
5. У новорождённого ребенка на фоне эритемы лицевой области началась интоксикация. Примерно через 48 часов возникшее поражение охватило значительную часть туловища. Затем на коже появились пузыри, наполненные серозным содержимым. При их самопроизвольном вскрытии обнажились глубокие слои эпидермиса, внешне напоминающие ожоговую поверхность.

**Вопрос 1:** Назовите предположительный диагноз?;

**Вопрос 2:** Какой микроорганизм чаще является возбудителем данного заболевания?;

**Вопрос 3:** Назовите фактор патогенности возбудителя, играющий ведущую роль в развитии заболевания.;

1) Синдром ошпаренной кожи;

2) *S. aureus*;

3) эксфолиативный токсин;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 9.** Микробиологическая диагностика анаэробных инфекций, вызванных спорообразующими (газовая гангрена, столбняк, ботулизм, псевдомембранозный колит) и неспорообразующими микроорганизмами.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Анаэробные инфекции могут быть вызваны двумя группами возбудителей: спорообразующими (клостридии) и неспорообразующими анаэробами (фузобактерии, бактероиды, вейллонеллы, пропионибактерии, пептострептококки и др.). Спорообразующие анаэробы являются возбудителями инфекций экзогенного происхождения (столбняк, газовая гангрена, ботулизм). Неклостридиальные анаэробы в основном вызывают гнойно-воспалительные процессы эндогенной природы (абсцессы внутренних органов, перитонит, пневмония, флегмона челюстно-лицевой области, отит, сепсис и др.). По современным представлениям, ведущая роль принадлежит условно-патогенным анаэробам, не образующим спор (неклостридиальные инфекции): около 90% хирургических инфекций имеют эндогенное происхождение и вызываются ассоциациями анаэробов с аэробами или несколькими анаэробами. Однако следует отметить, что клостридиальные инфекции, отличаясь тяжестью течения и высокой летальностью, остаются актуальной проблемой.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агаре и методом серийных разведений., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Классификация и морфо-биологические свойства спорообразующих анаэробных бактерий-клостридий анаэробной газовой гангрены, столбняка, ботулизма, псевдомембранозного колита.**

Возбудитель анаэробной инфекции *C.perfringens* был открыт в 1892 году У.Уэлчем и Г. Наттеллом, а его способность вызывать газовую гангрену установлена О. Меденшталем. Талантливый советский микробиолог И.М. Великанов (1899-1940 гг.) разработал метод получения и применения противогангренозной сыворотки, благодаря которой в годы Великой Отечественной Войны были спасены от газовой гангрены десятки тысяч раненых. *C.tetani* был обнаружен Н.Д. Монастырским в 1883 году и А. Николайером в 1894 году. Чистая культура возбудителя столбняка была получена в 1889 году Китазато. В нашей стране противостолбнячная сыворотка была получена и впервые применена З.И. Михайловым в 30-х годах 20 века.

Сем. *Bacillaceae*, род *Clostridium*. *C.botulinum* впервые выделена Э. Ван Эрменгеном в 1869 году. Его открытие было подтверждено русским исследователем В.С. Константиновым, который выделил возбудителя из рыбы, вызывавшей отравление. И.М. Великановым была предложена противоботулиническая сыворотка, которая спасла жизни сотням людей

#### **Возбудители газовой гангрены:**

Виды: *C.perfringens*, *C.novyi*, *C.septicum*, *C.histoliticum*, *C.sordelli*

#### **Возбудитель столбняка:**

*C.tetani*

#### **Возбудитель ботулизма:**

*C.botulinum*

### **Возбудитель псевдомембранозного колита**

*C.difficile*

Клостридии - крупные палочковидные бактерии. Грамположительны. Подвижны (кроме *C.perfringens*, которые неподвижны, но в отличие от прочих образуют капсулу). Образуют споры в организме человека и на питательных средах. Локализация спор: у *C.perfringens* и других возбудителей газовой гангрены центрально, *C.tetani* - терминально, *C.botulinum* - субтерминально.

Строгие анаэробы. *C.perfringens* типа А относительно толерантна по сравнению с другими клостридиями (может развиваться еще при 40 мм. рт. ст.), хорошо растут на питательных средах: Китта-Тароцци (помутнение и газообразование); на агаре Цейсслера (серые дисковидные колонии у *C.perfringens*; у других, обладающих активным движением, рост ползучий); в высоком столбике сахарного агара колонии *C.perfringens* напоминают чечевички, у остальных клостридий пушинки, комочки ваты; в среде Вильсона-Блера клостридии восстанавливающие сульфит Na с образованием FeS, окрашены в черный цвет.

По биохимическим свойствам клостридии можно разделить на 2 группы:

- 1) Обладающие преимущественно сахаролитическими свойствами: *C.perfringens*, *C.septicum*, *C.novyi*
- 2) Обладающие преимущественно протеолитическими свойствами: *C.histoliticum*, *C.botulinum*.

Только *C.tetani* биохимически мало активен и не может быть причислен ни к одной группе.

Антигенная структура: возбудителей газовой гангрены разделяют на серовары, отличающиеся по антигенным и биохимическим свойствам своих токсинов. *C.perfringens* - 6 сероваров (А,В,С,Д,Е,Ф). *C.novyi* - 4 серовара (А,В,С,Д). *C.septicum* - 2 серовара (А,В). *C.histoliticum* не типизируется.

Клостридии столбняка делятся на 10 сероваров. Разделение сероваров производят по Н-антигену, а на серогруппы по О-антигену. Представители всех сероваров продуцируют токсин, который нейтрализуется антитоксической сывороткой любого типа.

Возбудителей ботулизма по антигенным свойствам нейротоксина делят на семь сероваров (А,В,С,Д,Е,Ф,Г). Наиболее частой причиной заболевания ботулизмом являются токсины сероваров А, В и Е, и реже С,Д,Ф. Токсины серовара Г мало изучены. До настоящего времени изучение антигенов патогенных клостридий не нашло применения при идентификации выделенных культур.

### **Классификация и морфо-биологические свойства неспорообразующих анаэробных бактерий - бактероиды, превотеллы, порфидомонады, фузобактерии.**

Это представители родов: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*. Большинство из них представители нормальной микрофлоры полости рта, верхних отделов дыхательных путей, ЖКТ, и мочеполовой системы человека и млекопитающих. Это грамотрицательные неподвижные палочки, как правило, полиморфны. Хемоорганотрофы.

### **Ведущий фактор вирулентности патогенных клостридий и метод его определения.**

Патогенные клостридии образуют экзотоксины, обладающие сильным некротическим, гемолитическим и летальным действием.

### **Возбудители газовой гангрены.**

Образуют более 12 токсинов и ферментов, которые оказывают некротическое, гемолитическое, летальное действие, нарушают проницаемость стенок сосудов, что приводит к образованию желеобразного отека. Мишенью для действия основных токсинов являются клеточные мембраны; в основе механизма поражения лежат ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости, ведущее к отеку тканей, активации эндогенных протеаз и аутолизу тканей в области поражения. Коллагеназа возбудителей газовой гангрены вызывает некротический и летальный эффекты из-за способности растворять нативный коллаген. В мышце происходит полное исчезновение коллагена и ретикулина.

### **Возбудитель столбняка.**

Вырабатывает сильный токсин, состоящий из двух компонентов тетаноспазмина и тетанолизина. Основной компонент это тетаноспазмин, представленный белком, прочно связанным с бактериальной клеткой. Этот токсин

поражает двигательные клетки нервной ткани, что приводит к спазмическому сокращению мышц. Механизм действия – подавление высвобождения тормозных нейромедиаторов (глицина и гамма-аминомасляной кислоты) в синапсах. Тетанолизин гемолизует эритроциты, обладает кардиотоксическим и летальным эффектом.

### **Возбудитель ботулизма.**

Продуцирует самый сильный из биологических токсинов, состоящий из двух компонентов: нейротоксина и гемагглютинина. Поражающее действие токсина связано с его высокой тропностью к нервной ткани, в частности к синапсам. Мишень действия токсина – интегральные синаптические белки (например, токсины В, D, F расщепляют синаптобrevин, D и F – целлюбревин и т.д.). Доказано, что возбудитель ботулизма помимо экзотоксина еще вырабатывает протоксин, который в ЖКТ под действие протеолитических ферментов превращается в токсин, усиливая его действие в 50-100 раз.

### **Возбудитель псевдомембранозного колита**

Возбудитель продуцирует токсины А и В, обладающие цитотоксическими свойствами. Оба токсина после проникновения в цитоплазму клеток посредством УДФ-глюкозозависимого моногликозилирования инактивируют ряд сигнальных белков, обеспечивающих трансдукцию внутриклеточных сигналов (Rho, Rac, Cdc42). Это, в свою очередь, нарушает функцию фермента актинполимеразы. Угнетение активности актинполимеразы приводит к дезагрегации актиновых микрофиламентов цитоскелета эпителиоцитов кишечника, их деформации и в конечном итоге к гибели. Кроме токсинов, *C. difficile* вырабатывает ряд гидролитических ферментов: хондроитин-сульфатазу, гиалуронидазу, гепариназу, коллагеназу и протеазы.

### **Факторы вирулентности неспорообразующих анаэробных бактерий и механизм их действия.**

Грамотрицательные анаэробные бактерии проявляют низкую патогенность, и поражения у человека, как правило, вызывают ассоциации бактерий, в которых патогенный потенциал усиливается. К развитию данных поражений способствуют нарушения целостности кожных покровов и слизистых оболочек, травмы, хирургические вмешательства, метаболические расстройства, некротические процессы в тканях

### **Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза анаэробной газовой гангрены, столбняка, ботулизма, псевдомембранозного колита.**

Естественной средой обитания возбудителей газовой гангрены является кишечник человека и животных, а из кишечника человека и животных выделяются в почву в виде вегетативных форм и могут длительно там сохраняться в споровой форме. В организм человека в основном попадают при травматических ситуациях: ранениях, осложнениях открытой травмы. Обязательным условием развития инфекции является известная степень некротизации тканей и понижение в зоне ранения окислительно-восстановительного потенциала. В этих условиях быстро развивается некротический отек и нарушается микроциркуляция, создавая таким образом, благоприятные условия для размножения возбудителя и дальнейшего распространению в прилежащие ткани. В дальнейшем происходит выделение токсинов, разнообразных по своему действию.

*C. tetani* широко распространен в природе. Являясь естественным обитателем кишечника травоядных и 5-40% людей, он попадает вместе с фекалиями и длительно там сохраняется в виде спор, а в некоторых почвах и может размножаться. Возникновение заболевания связано с попаданием *C. tetani* в рану. Особенно опасны колотые или имеющие «карманы» раны, где создаются условия анаэробнозоза, способствующие размножению столбняка, развитие возбудителя сопровождается выработкой высокопатогенного экзотоксина (тетаноспазмина), который влияет на передачу импульсов в головном и спинном мозге. Продвижение токсина происходит по двигательным волокнам периферических нервов в спинной мозг, продолговатый мозг и ретикулярную формацию ствола. Происходит паралич вставочных нейронов полисинаптических рефлекторных дуг. Вследствие чего импульсы, вырабатываемые в мотонейронах, поступают к мышцам некоординированно, непрерывно вызывая токсическое напряжение, которое периодически ослабевает или усиливается. Генерализация процесса сопровождается возбудимостью коры головного мозга и ретикулярных структур, повреждением дыхательного центра и ядер вагуса. Вследствие судорожного синдрома развивается метаболический ацидоз. Может развиться паралич сердца. В кульминационной фазе развития столбняка специфические поражения охватывают всю мускулатуру.

Ботулизм относят к сапронозам, хотя роль почвы как среды активной деятельности *C. botulinum* оспаривается, полагая что она лишь промежуточная среда. Основным резервуаром являются травоядные животные и реже холоднокровные (рыбы, моллюски, ракообразные). Причем сам возбудитель не способен размножаться в организме больного. Вегетативные формы *C. botulinum* и ботулотоксин попадают в организм при употреблении инфицированных продуктов. Всосавшись через слизистую оболочку желудка и кишечника в кровь, токсин, вызывает парез гладкой мускулатуры и кровеносных сосудов, что ведет к ломкости капилляров. Особой чувствительностью к токсину обладают мотонейроны спинного и продолговатого мозга. Резко угнетается парасимпатическая нервная система. Токсин блокирует освобождение ацетилхолина, что обуславливает развитие периферических параличей.

*C.difficile* является основным возбудителем нозокомиальной диареи, связанной с назначением antimicrobных препаратов. Внутрибольничные случаи инфекции *C. difficile* могут иметь как спорадический, так и эпидемический характер. При возникновении вспышки *C. difficile*-ассоциированных заболеваний в стационарах или домах сестринского ухода ею могут быть охвачены от 16 до 29% от числа всех пациентов стационара. Общеизвестный фактор риска развития *C. difficile*-ассоциированных болезней – применение антибиотиков. Фактически антибактериальная терапия играет роль триггера (пускового звена патогенеза), нарушающего микроэкосистему и аминокислотный состав кишечной среды и создающего тем самым необходимые условия для *C. difficile*. В создавшихся благоприятных условиях на фоне сниженной колонизационной резистентности начинается прогрессирующее размножение возбудителя. После достижения микроорганизмом поздней логарифмической и ранней стабильной фаз размножения в толстой кишке начинается продукция и выделение экзотоксинов А и В. Возникает повреждение колоноцитов, секреция жидкости в просвет кишечника и осмотическая диарея.

### **Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробными бактериями.**

Представители рода *Bacteroides*, являются составляющей нормальной микрофлоры и вызывают инфекции женских половых путей, поражения дыхательных путей, костей и мягких тканей. В мазках клинического материала бактерии представлены тонкими палочками с закругленными концами. У представителей рода *Porphyromonas* патогенез поражений аналогичен бактериоидному, кроме того разрушается фибриноген, секретуруется коллагеназа, участвующая в разрушении дентина. У человека вызывают гингивиты, периодонтиты, поражения мягких тканей головы и шеи, аспирационные пневмонии. Представители рода: *Prevotella* вызывают поражения мягких тканей головы и шеи, плевропневмонии, инфекции женских половых путей, и остеомиелиты. Представители рода *Fusobacterium* обитают в полости рта, кишечнике и органах мочеполовой системы и вызывают: гингивиты, периодонтиты, поражения мягких тканей головы и шеи, аспирационные пневмонии.

### **Особенности иммунитета при анаэробных инфекциях.**

При клостридиальных инфекциях иммунитет носит антитоксический характер, и перенесенная инфекция не создает прочного иммунитета. При газовой гангрене иммунизация анатоксинами или антитоксическими сыворотками приводит к непродолжительной невосприимчивости.

При столбняке постинфекционный иммунитет мало изучен; исход этого заболевания часто смертельный.

При ботулизме иммунитет нестойкий.

### **Материалы и методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробными бактериями.**

Материалом для исследований при газовой гангрене: отделяемое раны, отечная жидкость, биоптаты омертвевших тканей, кровь, перевязочный материал.

При столбняке исследованию подлежат биоптаты тканей, перевязочный материал. При ботулизме: рвотные массы, промывные воды желудка, фекалии, кровь, остатки пищевых продуктов.

При псевдомембранозном колите – испражнения.

#### Микроскопический метод.

Учитывая быстрое развитие клинических симптомов при клостридиальных инфекциях, позволяет быстро дать ориентировочное заключение о виде возбудителя. Из исследуемого материала делают препараты и окрашиваются по Граму и Ожешко для выявления спор.

#### Бактериологический метод.

Окончательный диагноз ставится на основании характерных изменений сред: Китта-Тароцци, Вильсона-Блера, обезжиренного молока, бактериоскопии посевов на питательных средах, на основании морфо-тинкториальных, биологических, биохимических свойств выделенной культуры, биологической пробы на мышцах и реакции нейтрализации выделенной культуры с соответствующими сыворотками.

### **Ускоренная микробиологическая диагностика анаэробной газовой гангрены.**

#### Ускоренная диагностика.

Предварительный ответ при диагностике газовой гангрены получают при посеве исследуемого материала на среду Китта-Тароцци, Вильсона-Блера, обезжиренное молоко. При положительном результате через несколько часов на

среде Китта-Тароцци - пенообразование, на Вильсона-Блера - почернение, на молоке - губкообразное свертывание с образованием пузырьков газа.

Экспресс-диагностика: РИФ.

Ускоренная и экспресс-диагностика заболеваний, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробными бактериями.

Микроскопический метод.

Микроскопия исследуемого материала, с обнаружением характерных по морфо-тинкториальным свойствам, позволяет дать предварительный ответ.

Экспресс-диагностика: РИФ

**Микробиологическая диагностика псевдомембранозного колита:** определение токсинов возбудителя в образцах кала с помощью ИФА с использованием коммерческих тест-систем.

**Специфическая профилактика и терапия анаэробной газовой гангрены, столбняка, ботулизма.**

Вакцины.

1. Адсорбированный секстанатоксин содержит очищенные анатоксины возбудителей газовой гангрены (*perfringens*, *C.novvi*), столбняка (*C.tetani*) и ботулизма (*C.botulinum* типов А, В, Е).
2. АКДС (АДС, АДС-М, АС). Адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина содержит взвесь коклюшных бактерий, убитых формалином, и очищенные концентраты дифтерийного и столбнячного анатоксинов, адсорбированных на гидроокиси алюминия.

Сыворотки.

1. Антитоксические сыворотки - антиперфрингенс, антинови, антисептикум. Содержат антитела к токсинам возбудителей газовой гангрены. Получены из крови лошадей, гипериммунизированных анатоксинами возбудителей. Вводится дробно по методу А.М. Безредки.
2. Противостолбнячная сыворотка. Содержит антитела к токсину возбудителя столбняка. Получена из крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином. Вводится дробно по методу А.М. Безредки с предварительной внутрикожной пробой на чувствительность.
3. Противоботулинические сыворотки. Содержат антитела к токсинам возбудителя ботулизма типов: А, В, Е и F. Получены из крови лошадей, гипериммунизированных ботулиническими анатоксинами. Вводится дробно по методу А.М. Безредки.

Иммуноглобулины.

Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный содержит антитела к токсину возбудителя столбняка. Получен из гаммаглобулиновой фракции крови людей-доноров, ревакцинированных очищенным сорбированным столбнячным анатоксином.

**Специфическая терапия.**

Сыворотки:

1. Противогангренозные антитоксические сыворотки.
2. Противостолбнячная сыворотка.
3. Противоботулинические сыворотки.

Иммуноглобулины:

Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный.

**Профилактика и терапия инфекций, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями.**

Профилактика

Специфической профилактики инфекций, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями, не существует, профилактика таких инфекций заключается в соблюдении санитарных правил при хирургических мероприятиях.

## Терапия.

Лечение инфекций, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями, проводится антибактериальными препаратами с антианаэробной активностью: метронидазол, имипенем, клиндамицин.

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Классификация и морфо-биологические свойства спорообразующих анаэробных бактерий - возбудителей анаэробной газовой гангрены, столбняка, ботулизма, псевдомембранозного колита.
2. Классификация и морфо-биологические свойства неспорообразующих анаэробных бактерий - бактероиды, превотеллы, порфиромонады, фузобактерии.
3. Ведущий фактор вирулентности патогенных клостридий и метод его определения.
4. Факторы вирулентности неспорообразующих анаэробных бактерий и механизм их действия.
5. Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза анаэробной газовой гангрены, столбняка, ботулизма, псевдомембранозного колита.
6. Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробными бактериями.
7. Материалы и методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробными бактериями.
8. Ускоренная микробиологическая диагностика анаэробной газовой гангрены.
9. Ускоренная и экспресс-диагностика заболеваний, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробными бактериями.
10. Специфическая профилактика и терапия анаэробной газовой гангрены.
11. Профилактика и терапия инфекций, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями.

### **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ОСНОВНОЙ ВОЗБУДИТЕЛЬ ГАЗОВОЙ АНАЭРОБНОЙ ГАНГРЕНЫ:
  - 1) *C. perfringens*;
  - 2) *C. novyi*;
  - 3) *C. septicum*;
  - 4) *C. histolyticum*;
  - 5) *C. sporogenes*;
2. У CLOSTRIDIUM TETANI СПОРЫ РАСПОЛАГАЮТСЯ:
  - 1) субтерминально;
  - 2) центрально;
  - 3) биполярно;
  - 4) терминально;
  - 5) диффузно, большими скоплениями;
3. ВОЗБУДИТЕЛЬ ПСЕВДОМЕМБРАНОЗНОГО КОЛИТА:
  - 1) *Clostridium perfringens*;
  - 2) *Clostridium difficile*;
  - 3) *Clostridium histolyticum*;
  - 4) *Prevotella disiens*;
  - 5) *Bacteroides fragilis*;
4. ОСНОВОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БОТУЛИЗМА ЯВЛЯЕТСЯ:
  - 1) определение специфических антител;
  - 2) выделение чистой культуры возбудителя;
  - 3) выявление сенсibilизации организма;
  - 4) определение ботулотоксинов в исследуемом материале;
  - 5) обнаружение характерных палочек в исследуемом материале;
5. ОСНОВОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ПСЕВДОМЕМБРАНОЗНОГО КОЛИТА ЯВЛЯЕТСЯ:
  - 1) раздельное питание;
  - 2) здоровый образ жизни;
  - 3) плановая вакцинация;
  - 4) использование одноразовых шприцев;
  - 5) рациональная антибиотикотерапия;
6. НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ АНАЭРОБЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ОТНОСЯТСЯ К РОДАМ:
  - 1) *Bacteroides*;
  - 2) *Fusobacterium*;
  - 3) *Porphyromonas*;
  - 4) *Peptostreptococcus*;
  - 5) всё вышеперечисленное;
7. ВОЗБУДИТЕЛЬ БОТУЛИЗМА:
  - 1) *Clostridium perfringens*;

- 2) Clostridium novyi;
  - 3) Clostridium botulinum;
  - 4) Clostridium difficile;
  - 5) Clostridium tetani;
8. ОСНОВНОЙ ФАКТОР ПАТОГЕННОСТИ CLOSTRIDIUM TETANI:
- 1) споры;
  - 2) капсула;
  - 3) экзотоксин;
  - 4) пили;
  - 5) плазмокоагулаза;
9. ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ СТОЛБНЯКА ПРИМЕНЯЕТСЯ:
- 1) вакцина БЦЖ;
  - 2) вакцина АКДС;
  - 3) вакцина Энжерикс В;
  - 4) туберкулин;
  - 5) вакцина Превенар;
10. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ДИАГНОСТИКИ ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) микроскопический;
  - 2) молекулярно-генетический;
  - 3) серологический;
  - 4) бактериологический;
  - 5) вирусологический;

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. В хирургический стационар поступил больной с газовой гангреной, в дальнейшем диагноз подтвердился, при бактериологическом исследовании обнаружен возбудитель *C. perfringens*

**Вопрос 1:** Назовите возможные пути распространения анаэробной инфекции внутри стационара;

**Вопрос 2:** Мероприятия по предотвращению распространения инфекции;

**Вопрос 3:** Объекты и методы санитарно-бактериологического контроля;

1) Основной путь передачи инфекции - контактный. Инфицирование может произойти при попадании возбудителя газовой гангрены на поврежденные покровы или слизистые оболочки с грязным бельем, одеждой, а также при использовании инструментов, шприцев, игл, шовного и перевязочного материалов, при актоклавировании которых нарушен режим стерилизации;

2) Больного изолируют в отдельную палату, по-возможности со специальным входом, операционную-перевязочную, оснащенные приточно-вытяжной вентиляцией, не сообщающиеся с другими отделениями.

Проводят дезинфекцию помещений, в которых находился больной, а также инструментария, белья, предметов обихода;

3) После проведения дезинфекции и генеральной уборки помещений в которых находился больной проводится санитарно-бактериологический контроль объектов внешней среды, инструментария, белья. Проводится посев на среды Вильсон-Блера, железо-сульфитный агар;

2. После употребления в пищу грибов домашнего консервирования в семье отмечено два случая острого отравления с неврологическими симптомами (двоение в глазах, затруднение глотания, охриплость голоса, мышечная слабость).

**Вопрос 1:** О каком заболевании идет речь?;

**Вопрос 2:** С помощью какого лабораторного исследования может быть установлена этиология данного заболевания?;

**Вопрос 3:** Какие экспресс-методы нужно применить для диагностики?;

**Вопрос 4:** Какие биопрепараты следует экстренно назначить больному?;

1) Ботулизм.;

2) Проводят биологическую пробу *in vivo* на нескольких группах мышей, которым вводят смесь исследуемого материала (остатки пищевых продуктов, рвотные массы, промывные воды желудка) противоботулинических антитоксических сывороток типов А, В, Е и наблюдают в течении 4-х суток. При наличии ботулотоксина выживают мыши только одной группы вследствие нейтрализации токсина гомологичной сывороткой (позволяет определить тип ботулинического токсина).;

3) Серологический метод: определение наличия ботулинического токсина в сыворотке крови больного в РПГА с антителным эритроцитарным диагностикумом; в пищевых продуктах, рвотных массах, промывных водах желудка и крови больного - с помощью иммуноферментного анализа (дот-иммуноанализа).;

4) Противоботулиническую антитоксическую сыворотку: сначала поливалентную к типам А, В, Е, затем - моновалентную, если известен тип токсина.;

3. В приемный покой обратился 50-летний мужчина, травмировавшийся на приусадебном участке: поранился вилами во время земляных работ, имеется колотая рана правой голени. Беспокоят тянущие боли в ране, судорожные сокращения жевательной и мимической мускулатуры. Микроскопическое исследование отделяемого раны выявило наличие крупных грамположительных палочек.

**Вопрос 1:** Какой диагноз можно предположить? Назовите возбудителя.;

**Вопрос 2:** Какой препарат необходимо назначить больному для специфической терапии? Принцип введения данного препарата.;

**Вопрос 3:** Какие методы микробиологической диагностики необходимо использовать для подтверждения диагноза? Их суть?;

1) Столбняк. Возбудитель - Clostridium tetani.;

2) Противостолбнячную сыворотку внутримышечно дробно по Безредке А.М. или противостолбнячный человеческий иммуноглобулин внутримышечно одномоментно.;

3) Основным методом микробиологической диагностики столбняка является бактериологический метод с выделением и идентификацией чистой культуры возбудителя. С целью обнаружения токсина проводят реакцию нейтрализации (РН) на белых мышцах с центрифугатом культуральной жидкости и противостолбнячной сывороткой.;

4. У ребенка с глубокой колотой раной голени и симптомами газовой гангрены при хирургической обработке раны взят биопсийный материал. На основании микроскопического исследования дан предварительный положительный ответ.

**Вопрос 1:** Какие морфологические формы бактерий могут быть обнаружены при данном исследовании?;

**Вопрос 2:** Какими методами следует продолжить исследование?;

**Вопрос 3:** Какие препараты должен назначить врач для лечения?;

1) При микроскопическом исследовании могут быть обнаружены грамположительные палочки, размером 7-8×2 мкм, расположенные одиночно (характерно для микроорганизмов рода Clostridium). Clostridium perfringens характеризуется наличием капсулы.;

2) Провести бактериологическое исследование, обратить внимание на бурное газообразование на среде Китта-Тароцци, быстрое (3-6 часов) почернение и газообразование на железосульфитной среде Вильсона-Блера, «штормовую реакцию» в молоке. Возможно проведение экспресс-метода диагностики - газожидкостной хроматографии.;

3) Для лечения следует назначить поливалентную противогангренозную антитоксическую сыворотку, антибиотики - ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины IV поколения и карбапенемы.;

5. Пострадавший в автотранспортной аварии был доставлен в стационар с обширными ранами, загрязненными почвой.

**Вопрос 1:** Какие возбудители могли быть занесены в рану с почвой?;

**Вопрос 2:** Какие меры специфической профилактики следует принять в этом случае?;

1) В рану могли попасть споры возбудителей газовой гангрены - Clostridium perfringens, C. septicum, C. histolyticum, C. novyi, C. sordelli и столбняка - C. tetani.;

2) Для экстренной специфической профилактики столбняка вводят столбнячный анатоксин и противостолбнячный иммуноглобулин человека; при подозрении на газовую гангрену - противогангренозную поливалентную антитоксическую сыворотку.;

6. Во время прогулки на детской площадке ребенок четырех лет получил травму с повреждением кожных покровов. Через 3 дня во время перевязки хирург заподозрил газовую гангрену.

**Вопрос 1:** Какой материал следует взять для исследования?;

**Вопрос 2:** Какие методы микробиологической диагностики используются для подтверждения диагноза?;

**Вопрос 3:** Какой экспресс-метод позволяет подтвердить диагноз?;

**Вопрос 4:** Какие препараты следует назначить для лечения?;

1) Для исследования используют биопсийный материал из глубины раны.;

2) Микроскопический, бактериологический.;

3) Метод газожидкостной хроматографии.;

4) Для терапии назначают противогангренозную поливалентную антитоксическую сыворотку, антибиотики.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

Лелевич, С. В. [Клиническая микробиология](#) : учебное пособие для вузов / С. В. Лелевич, О. М. Волчкевич, Е. А. Сидорович. - 2-изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 308 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 10.** Микробиологическая диагностика инфекций передающихся половым путем (гонореи, сифилиса, хламидийных и микоплазменных инфекций).

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): С начала 90-х годов ухудшилась эпидемиологическая обстановка по сифилису в Красноярском крае, на территории Таймыра, Эвенкии, республик Бурятия, Тыва и Хакасия. Настораживает увеличение числа беременных женщин, детей до 14 лет, больных сифилисом. В структуре заболеваемости сифилисом значительный удельный вес занимают скрытые формы – 23-37%, что в свою очередь затрудняет правильность постановки диагноза, и своевременность лечения. Гонорея относится к числу наиболее распространенных венерических заболеваний. Рост заболеваемости гонореей наблюдается во всех возрастных группах, особенно среди молодёжи до 25 лет. Хламидиозы – группа зоонозных и антропонозных инфекционных болезней, вызываемых хламидиями. Имеют разные механизмы передачи возбудителей и разнообразные клинико-эпидемиологические проявления. Многие инфекционные заболевания, вызываемые хламидиями, сопровождаются развитием лишь небольшого числа симптомов, или же симптомы заболевания вообще отсутствуют или являются неспецифическими, что затрудняет диагностику заболевания. Немаловажно и то, что бактериологические исследования для диагностики хламидийной инфекции имеют ограниченную доступность и высокую стоимость. Все это затрудняет подтверждение диагноза инфекционного заболевания у отдельных больных и ограничивает эффективность мер по охране здоровья населения. Диагностировать заболевания, вызванные микоплазмами, также весьма затруднительно в связи со сложностью дифференциации клинических проявлений микоплазменной инфекции от аналогичных процессов другой этиологии и из-за несовершенства методов их лабораторной диагностики. Кроме того, микоплазмонительство не всегда является показателем патологического процесса. Поэтому для выявления хламидийных и микоплазменных инфекций требуется разработка специальных критериев. Все это затрудняет подтверждение диагноза инфекционного заболевания у отдельных больных и ограничивает эффективность мер по охране здоровья населения.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Классификация**

Семейство *Neisseriaceae*

Род *Neisseria*

Виды: *N. meningitidis* – возбудитель менингита

*N. gonorrhoeae* – возбудитель гонореи и бленнореи

#### **Морфо-биологические свойства.**

Клетки гоно- и менингококков имеют слегка овоидную форму и напоминают кофейное зерно, располагаются парами. У менингококков обращенные друг к другу поверхности уплощены, а у гонококков вогнутые. В мазках из гноя гонококки располагаются внутри лейкоцитов. По Граму окрашиваются отрицательно. Гонококки легко меняют форму под воздействием лекарственных веществ – становятся крупными шарами или мелкими зёрнами, под действием пенициллина переходят в L-форму. Вирулентные штаммы образуют пили.

Для культивирования на искусственных питательных средах нуждаются в добавлении сыворотки, асцитической жидкости или крови. Лучше растут в атмосфере с содержанием 3-10% CO<sub>2</sub> . оптимум температуры 37°C, pH 7,2-7,4. Гонококки на асцит-агаре дают прозрачные колонии с ровными краями и блестящей поверхностью. В жидких

питательных средах гонококки растут диффузно и образуют на поверхности пленку, которая через несколько дней оседает на дно.

Биохимическая активность выражена слабо. Гонококки ферментируют только глюкозу, образуют каталазу и оксидазу. Протеолитической активностью не обладают.

### **Антигены.**

Антигенная структура гонококков неоднородна и меняется в различных популяциях.

### **Факторы патогенности.**

*Гонококки.*

- Капсула - обладает иммуногенными и антифагоцитарными свойствами.
- Пили, обеспечивают адгезию гонококков к клеткам эпителия. Все штаммы выделенные от больных обладают пилиями. Пили, связываются с рецепторами многих клеток оболочки мочевого тракта, сперматозоидов. Кроме чисто механического (предупреждение вымывания бактерий мочой), пили способствуют внутриэпителиальной инвазии и повышают устойчивость к фагоцитозу. Адгезия на сперматозоидах создает дополнительные возможности для проникновения инфекции в верхние отделы женского полового тракта.
- ЛПС проявляют сильные иммуногенные свойства.
- Эндотоксин.
- Белки клеточной стенки обладают иммуногенными свойствами. По составу белков клеточной стенки выделяют 16 сероваров гонококков: -Белок I обуславливает устойчивость к бактерицидным факторам слизистых оболочек, а также Инвазивные свойства бактерий и их способность вызывать системные инфекции. - Белок II образует ора-протеины, обуславливающие прикрепление к эпителию и ингибирующие фагоцитарные реакции.
- IgA-протеазы. Инактивируют IgA.

### **Резистентность.**

Гонококки малоустойчивы в окружающей среде, чувствительны к высушиванию, охлаждению и дезинфицирующим средствам. Гонококки в толстой капле гноя на влажных предметах могут оставаться жизнеспособными в течение суток.

### **Эпидемиология гонорей.**

Гонорея - одна из самых распространенных инфекций человека, передающихся половым путем. Гонорея строгий антропоноз. Паразитирование на человеке является обязательным для выживания гонококка. Источник инфекции - больной человек. Основной путь передачи - половой, при орально - генитальных контактах возникает гонококковый стоматит. Маловероятно, но возможно бытовое заражение, через инфицированные предметы домашнего обихода.

### **Патогенез гонорей.**

Для развития заболевания необходимы следующие условия: вирулентность возбудителя, инфицирующая доза, входные ворота, состояние факторов резистентности и скорость развития иммунных реакций.

В основе острой гонореи лежит поражение эпителия, и в этом смысле ее можно рассматривать как эпителиальную инфекцию. Обычно процесс начинается с цилиндрического эпителия слизистой оболочки мочевого тракта. У мужчин первично поражается передняя уретра, у женщин - чаще цервикальный канал. Мужская гонорея - почти всегда клинически выраженный процесс с обильными гнойными выделениями. У женщин в 80% случаев болезнь развивается бессимптомно, отсюда зараженные женщины представляют основной резервуар инфекции.

Сравнительно редко гонококк проникает в кровоток (генерализованная инфекция). Для гонококковой бактериемии характерны гнойные поражения суставов и кожи, хотя выделить возбудитель из очагов удается не всегда. Как осложнение возможно развитие эндокардита и менингита.

Гонококковый стоматит возникает при орально-генитальных контактах. Он проявляется гиперемией, отеком на слизистой оболочки полости рта, небольшими эрозиями с вязким слизисто-гнойным секретом. У новорожденных, родившихся от матерей больных гонореей, наряду с бленнореей может возникнуть гонококковый стоматит, для профилактики которого рот новорожденных сразу же после рождения обрабатывают 2% раствором азотного серебра или раствором сульфацида натрия.

### **Иммунитет при гонорее.**

Иммунитет носит штаммоспецифический характер, т.е. организм получает защиту против «своего» гонококка, но сохраняет чувствительность к «чужим». Хотя устойчивость эта тоже относительно, и больной может вновь пережить острую гонорею при уретральном заражении гонококками, находившимися до этого времени в латентном состоянии в других тканях, например в предстательной железе.

#### **Диагностика.**

**Гонорея.** Материал для исследования – гной из мочеполовых органов, осадок мочи, гной из конъюнктивы глаза при бленнорее, сыворотка крови.

**Методы** – *бактериоскопический, бактериологический* (редко, чаще при хронической гонорее), *серологический* РСК.

#### **Терапия и профилактика.**

Терапия гонореи проводится сульфаниламидами и антибиотиками ( $\beta$ -лактамы и аминогликозиды). Для терапии больных гонореей с осложнениями применяют гоновакцину, ее также используют и в диагностических целях (провокационные пробы).

Специфическая профилактика гонореи не разработана.

**Систематическое положение спирохет.** Спирохеты занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими. Свойства, сближающие их с бактериями: отсутствие дифференцированного ядра, хорошо выраженные антигенные свойства. Свойства, сближающие их с простейшими: наличие спиралевидного чрезвычайно гибкого тела, отсутствие ригидной клеточной стенки, наличие своеобразного локомоторного аппарата – фимбрий, рецидивирующий характер, вызываемых ими заболеваний.

**Классификация, морфологические свойства возбудителя сифилиса.** Возбудитель сифилиса относится к порядку *Spirochaetales*, сем. *Spirochaetaceae*, роду *Treponema*, вид *Treponema pallidum*.

**Критерии дифференциации возбудителя сифилиса от непатогенных трепонем.** Возбудитель сифилиса – спиралевидно-изогнутые микроорганизмы, имеющие равномерные по глубине и амплитуде завитки в количестве 8-14, по Романовскому-Гимзе окрашиваются в бледно-розовый цвет (бледная трепонема). Возбудитель отличается активной подвижностью, совершая характерные плавные поступательные и сгибательные движения. Непатогенные трепонемы, которые могут присутствовать в исследуемом материале, взятом со слизистой половых органов, ротовой полости, отличаются, как правило, меньшим количеством завитков, их неравномерностью, резким характером движений, более интенсивной окраской по Романовскому-Гимзе.

Учитывая характерную форму и движение, более информативным является изучение нативного препарата из исследуемого материала методом темнопольной микроскопии.

**Эпидемиология возбудителя сифилиса. Источник инфекции.** Сифилис – антропонозная инфекция. Источником является больной человек.

**Механизм заражения и пути передачи.** Механизм передачи возбудителя – контактный, пути передачи – половой (основной), вертикальный, бытовой.

**Особенности патогенеза и иммунитета при сифилисе.** В течение сифилиса различают 3 стадии. В месте внедрения возбудителя формируется первичный аффект (твёрдый шанкр) – безболезненная язва с уплотненными краями.

С появлением шанкра начинается **I стадия**. Через 7-10 суток развивается полиаденит, соответствующий фазе генерализованной спирохетемии. В первые 3 недели серологические реакции отрицательные (первичный серонегативный сифилис). С 4-ой недели они становятся положительными.

Через 6-7 недель после появления твёрдого шанкра развивается вторичный сифилис (**II стадия**) – фаза генерализованной спирохетемии с поражением внутренних органов и нервной системы. Характерный симптом – розовато-розеолёзные и пустулёзные высыпания (сифилиды) на коже. Под действием иммунной системы большинство спирохет погибает, что обуславливает период исчезновения высыпаний (латентный период). Часть трепонем сохраняется в лимфоузлах и внутренних органах. При снижении реактивности организма высыпания появляются вновь, и развивается вторичный рецидивирующий сифилис. При отсутствии лечения (обычно через 3-4 год) развивается **III стадия**. В кожных покровах, костях, нервной системе формируются гранулёмы – гуммы. Гуммы склонны к распаду и рубцеванию, что может вызывать серьёзные нарушения функций внутренних органов (висцеральный сифилис). При проведении неадекватного лечения у части больных (через 8-15 лет) развивается

нейросифилис. Постинфекционный иммунитет нестерильный – существует до тех пор, пока в организме есть возбудитель.

**Микробиологическая диагностика сифилиса.** Выбор исследуемого материала и метод диагностики зависит от периода заболевания.

Материалом для исследования в I периоде является: тканевая жидкость, полученная со дна язвы, пунктат регионарных лимфоузлов.

Метод исследования – микроскопический:

1. темнопольная микроскопия нативного препарата;
2. микроскопия препарата, окрашенного по Романовскому-Гимзе или импрегнированного серебром. Более информативным является исследование пунктата регионарных лимфатических узлов.

С 4-ой недели заболевания применяют серологический метод, т. к. в сыворотке появляются антитела. Исследуемый материал: сыворотка обследуемого. Метод диагностики – серологический.

Для серодиагностики в качестве скрининговых исследований наиболее часто используют реакцию микропреципитации (МПР). Суть реакции: в лунки планшета вносят инактивированные сыворотки обследуемых и добавляют кардиолипиновый антиген, обогащенный холестерином. Ингредиенты смешивают встряхиванием планшета в течение 5-ти минут, затем добавляют физ. раствор, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 5 минут. Одновременно ставят заведомо "+" и заведомо "-" контроли. Учёт реакции производится по появлению хлопьев в лунках.

Пациентам, у которых МПР положительна, проводятся дополнительные исследования для уточнения диагноза.

*Серологические реакции, используемые при диагностике сифилиса.*

Реакция Вассермана.

В конце первого периода сифилиса и на протяжении всей болезни в организме больного вырабатываются антитела, которые можно обнаружить в сыворотке или ликворе (при поражении ЦНС). Реакция Вассермана (RW) по технике постановки и механизму является РСК. Особенностью RW является использование трёх антигенов: *специфического* – ультразвученного трепонемного и двух *неспецифических* – кардиолипидных. RW характеризуется значительной неспецифичностью, т.к. положительна при туберкулёзе, малярии, кори и др. заболеваниях; при беременности, особенно в III триместре. На сегодняшний день в нашей стране RW постепенно вытесняется РНГА – более простой в постановке и не уступающая ей по специфичности.

*Специфическими реакциями на сифилис являются РИБТ, РИФн, РНГА, ИФА.*

РИФн. Сущность РИФн – обнаружение антител с помощью тканевых трепонем, которые получают путём пассажа возбудителя сифилиса в оболочках яичка кролика. Антиген наносят на предметное стекло и фиксируют. Сыворотку обследуемого наносят на приготовленные препараты и выдерживают при 35°C в течение 30 мин. Затем препараты промывают и наносят флюоресцирующую антиглобулиновую сыворотку, содержащую антитела к глобулинам человека, меченные флюорохромом. Учёт результатов проводят при микроскопии препаратов в люминесцентном микроскопе по свечению трепонем.

РИБТ. РИБТ – специфическая серологическая реакция, особенно при врожденном висцеральном сифилисе и сифилисе ЦНС. Информативна с конца первого периода и на протяжении всего заболевания. Сущность РИБТ – обездвиживание бледных трепонем под воздействием антител сыворотки обследуемого и комплемента сыворотки крови морской свинки. В качестве антигена используют взвесь живых тканевых трепонем, к которым добавляют сыворотку обследуемого и комплемент. Пробирки помещают в анаэрозитат и выдерживают при 35°C 18 час. Опыт сопровождается контролями сыворотки, антигена и комплемента. Через 18 часов готовят препараты "раздавленная капля", которые микроскопируют методом темнопольной микроскопии. Для учёта результатов учитывают 25 трепонем и определяют, сколько из них подвижных и неподвижных, иммобилизованных. Положительным считается обездвиживание 50% и более трепонем. Критерий достоверности – подвижность трепонем во всех контролях.

ИФА. ИФА относится к числу специфических реакций. Используют тест-систему, содержащую трепонемный ультразвученный антиген, сорбированный на планшете. В лунки добавляют сыворотку обследуемого в разведении 1:800, выдерживают при 37°C 30 мин и промывают. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело" выявляют с помощью конъюгата, представляющего антитела против иммуноглобулинов человека, меченые пероксидазой. Результаты второго этапа ИФА учитывают путём добавления субстрата (перекиси водорода с индикатором 5-аминосалициловой кислотой). Пероксидаза катализирует расщепление субстрата, вызывающее изменение окраски индикатора с бесцветного или бежевого цвета до коричневого цвета. Критерием достоверности служит ИФА с

сывороткой, заведомо положительной и сывороткой, заведомо отрицательной.

**Профилактика и терапия сифилиса.** Специфическая профилактики и терапия не разработаны. К методам общественной профилактики сифилиса относят бесплатное лечение у квалифицированных специалистов кожно-венерологических диспансеров, активное выявление и привлечение к лечению источников заражения и контактных с больными сифилисом, профилактические обследования на наличие сифилиса у доноров, беременных, всех больных стационаров, работников пищевых предприятий и детских учреждений. По эпидемиологическим показаниям к обследованию могут привлекаться и, так называемые, группы риска в данном регионе (проститутки, бомжи, наркоманы и т.д.). Важным фактором профилактики трансфузионного сифилиса является исключение использования крови больных сифилисом в клинике и производстве препаратов крови. Профилактика бытового заражения детей заключается в раннем выявлении сифилиса у взрослых и проведении превентивного лечения детям. Большую роль в профилактике сифилиса играет санитарно-просветительная работа. Личная (индивидуальная) профилактика сифилиса строится на исключении случайных половых связей и особенно беспорядочной половой жизни, использовании презервативов, аутопрофилактике венерических болезней с использованием готовых «карманных» профилактических средств, продающихся в аптеках (цидипол, мирамистин, гибитан и т.д.). Эта обработка эффективна в течение первых двух часов после возможного заражения, когда возбудители венерических болезней находятся еще на поверхности кожно-слизистого покрова. В качестве противосифилитических препаратов применяют бензилпенициллин, его дюрантные препараты (ретарпен, экстенциллин) и соли висмута.

**Классификация и морфо-биологические особенности возбудителей хламидийных и микоплазменных инфекций.** Сем. *Chlamydiaceae*, Род *Chlamydia*, Виды: *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*. Хламидии занимают промежуточное положение между вирусами и бактериями. Являются облигатными внутриклеточными паразитами. Они содержат ДНК и РНК и имеют сложный цикл развития, завершающийся через 24-48 ч. Имеют кокковидную форму, диаметр 0,30-0,45 мкм, грамотрицательны, размножаются только в цитоплазме клеток позвоночных. Основными формами микроорганизма являются элементарные тельца - ЭТ (инфекционные формы) и ретикулярные тельца - РТ (вегетативные формы). В цикле внутриклеточного развития определяются и промежуточные, переходные формы - переходные тельца (ПТ). Эти формы имеют ограничивающие мембраны - аналоги клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, стабильные у ЭТ и лабильные у РТ и отличаются по размеру и внутренней структуре, ЭТ имеют форму сферы со средним диаметром 250-350 нм. Внутренняя структура ЭТ представлена эксцентрично расположенным нуклеоидом, содержащим ДНК, и рибосомами, выявляемыми в хламидиоплазме. РТ имеют овальную или неопределенную форму со средним диаметром 400-600x800-1200 нм. В хламидиоплазме РТ диффузно расположены фибриллы ДНК и рибосомы. Цикл развития хламидий протекает в клетке-хозяине в цитоплазматическом включении, представляющем микроколонию микроорганизмов. Проникающие в клетку элементарные тельца преобразуются в неинфекционные РТ. Размножившиеся путем бинарного деления РТ преобразуются через ПТ в ЭТ нового поколения возбудителя. При завершении цикла, который продолжается в среднем 40-48 часов, ЭТ после разрыва мембраны цитоплазматического включения и ограничивающих мембран клетки-хозяина, поступают во внешнюю среду и инфицируют новые клетки. Возбудитель пневмонии *C. pneumoniae* отличается от *C. psittaci*, *C. trachomatis* внутренней структурой ЭТ, имеющих грушевидную форму за счет расширенного периплазматического пространства. Хламидийные включения устойчивы к разрушению мезосомами вплоть до последней стадии цикла их развития.

Сем. *Mycoplasmataceae*, род *Mycoplasma*, включающий 100 видов и род *Ureaplasma*, насчитывающий 3 вида. Виды, патогенные для человека: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. incognitos*, *U. urealyticum*. Микоплазмы - самые мелкие самореплицирующиеся прокариоты. Они лишены клеточной стенки, свойственной эубактериям, и ограничены лишь цитоплазматической мембраной. Диаметр клеток в пределах 0,3-0,8 мкм. Одни виды имеют грушевидную форму, другие - нитевидные, ветвящиеся либо в форме гранул. Структурная организация микоплазм достаточно проста. Все молликуты представлены клетками, ограниченными только трехслойной мембраной. В цитоплазме клеток имеются нуклеоид, диффузно распределенный в виде нитей ДНК, рибосомы и иногда внутрицитоплазматические мембранные структуры. Мембраны микоплазм похожи на мембраны клеток эукариот. Толщина мембран микоплазм - 10 нм. На поверхности наружного слоя у некоторых видов микоплазм и уреаплазм имеется капсулоподобный слой, включающий полисахаридный компонент. *M. pneumoniae*, *M. genitalium* имеют микроворсинки и характерные терминальные структуры на одном полюсе клеток (tip структур1., участвующие в процессах движения и адгезии).

**Экология, особенности патогенеза и иммунитета хламидийных и микоплазменных инфекций.** Хламидиозы - этиологически родственные зоонозные и антропонозные инфекции (генитальные, конъюнктивальные, кишечные, респираторные), вызываемые хламидиями. Хламидиозы имеют разные механизмы передачи возбудителей, разнообразные клинико-эпидемиологические проявления. Зоонозные хламидиозы (кроме орнитоз1. - нозологически четко не классифицированная группа этиологически родственных хламидийных инфекций, передающихся человеку от сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Эти хламидиозы протекают в виде острых заболеваний отдельных систем макроорганизма (хламидийная пневмония, конъюнктивит, энцефалит, миокардит) или в виде генерализованного заболевания. К антропонозным хламидиозам относятся: трахома, урогенитальный хламидиоз,

венерическая гранулема, респираторный хламидиоз (хламидийная пневмония).

Орнитоз - инфекционная болезнь, передающаяся человеку от птиц, вызываемая одним из представителей хламидий вида *C. psittaci*, характеризующаяся первичным поражением респираторных органов с явлениями общей интоксикации, и протекающая в острой, хронической и латентной формах. Орнитоз имеет всеобщее распространение и встречается в виде спорадических случаев или эпидемических вспышек, локализованного типа, имеющих, в основном, профессиональный характер. Основными источниками инфекции являются дикие, домашние и декоративные птицы (больные или бессимптомные носители) более 170 видов. Дополнительными источниками могут являться инфицированные эктопаразиты птиц и грызуны. Кроме того, источником может явиться и больной орнитозом человек (случаи внутрибольничного заражения). Механизм заражения человека - ингаляционный, реализующийся воздушно-пылевым или воздушно-капельным путем. Возможен и алиментарный путь заражения. Возбудитель орнитоза передается от птиц с инфицированными экскрементами, носовой слизью, пухом, пером. Заражение возможно при заносе возбудителя на слизистую оболочку носа, глаз или рта загрязненными руками. Возбудитель наиболее интенсивно выделяется от больного человека во внешнюю среду с мокротой. Главными входными воротами возбудителя инфекции является слизистая верхних дыхательных путей; распространяется гематогенным путем. Необходимым условием развития инфекции служит проникновение и размножение возбудителя в эпителии бронхов и бронхиол, в ретикуло-эндотелиальных и лимфоидных клетках, при наиболее интенсивном размножении в альвеолярном эпителии. Инкубационный период от 7 до 14 суток и более. Орнитоз человека - первично респираторная, генерализованная инфекция. Под влиянием возбудителя происходит разрушение клеток, в результате возникает бактериемия, токсинемия, аллергия макроорганизма, поражение различных паренхиматозных органов. Иммуитет нестерильный. Известны повторные заболевания с интервалом 0,5-2 года. Для возбудителя орнитоза характерно длительное персистирование в организме реконвалесцентов, что служит причиной рецидивов.

Трахома - хроническая инфекционная болезнь глаз, характеризующаяся специфическим поражением конъюнктивы и роговицы. Возбудитель - *C. trachomatis*, серовары А, В, Ва и С. Конъюнктивит с включениями - острая глазная инфекция, вызываемая *C. trachomatis*, сероварами Д и К. Болеют взрослые, а также их дети в период новорожденности. Возбудитель трахомы эпителиотропен. Входными воротами инфекции служит слизистая конъюнктивы глаза. Хламидии адсорбируются на клетках слизистой и проникают внутрь по типу эндоцитоза. После заражения через 4-6 часов элементарные тельца вступают в цикл развития. Инкубационный период 5-14 дней. Начало болезни бывает от незаметного (для больного) до острого. Возбудитель выделяется наружу с отделяемым воспаленной конъюнктивы. Нелеченная трахома часто завершается выворотом век, помутнением, или язвой роговицы, слепотой.

Урогенитальный хламидиоз - инфекционная болезнь, передающаяся половым путем, характеризующаяся поражением мочеполовых органов различной локализации, имеющая острое, подострое или хроническое течение. Возбудитель - *C. trachomatis* имеет 8 сероваров: Д, Е, F, G, H, I, J, К. По биологическим свойствам микроб близок к возбудителю трахомы. Источник инфекции - инфицированный человек с различными формами инфекции. Особую эпидемиологическую опасность представляют женщины с малосимптомным или бессимптомным течением инфекции. Механизм передачи - контактный, реализующийся при половом сношении. Известны также случаи болезни, возникающие в результате орогенитальной и аногенитальной передачи возбудителя инфекции. Передача возбудителя инфекции не ограничивается кругом половых партнеров, а также реализуется при родах - заражение новорожденных при прохождении через инфицированный родовой канал. Известны случаи инфицирования плода и до вскрытия околоплодных оболочек. Входными воротами возбудителя инфекции служат слизистые оболочки мочеполовых органов. Вследствие тропизма возбудителя к столбчатому эпителию первичный очаг инфекции, как правило, возникает в уретре и канале шейки матки у женщин. Инкубационный период болезни - 7-14 дней. Далее развивается восходящая инфекция с последовательным поражением половых органов. Естественная резистентность отсутствует. Постинфекционный иммунитет не формируется. В группах повышенного риска часты случаи реинфекции и суперинфекции.

Среди заболеваний человека, вызываемых микоплазмами, наиболее распространенными являются респираторные (вызываемые *M. pneumoniae* и *M. hominis*) и урогенитальные (*M. hominis*, *M. genitalium*, *M. incognitis*, *U. urealyticum*). *M. hominis* вызывает сальпингиты, *U. urealyticum* - негонококковые уретриты, оба - эндометриты, хориоамниониты, послеродовый сепсис, неонатальные инфекции. Источник инфекции - больной человек или здоровый носитель. Пути передачи - воздушно-капельный, половой, вертикальный. Тяжесть течения заболевания и спектр его клинических проявлений, как респираторных, так и нереспираторных, объясняются вирулентностью возбудителя, наличием специфических протективных антител, степенью сенсibilизации после перенесенной ранее инфекции и общим статусом иммунной системы. В развитии заболевания важную роль играют инфекционность и патогенность возбудителя. Инфицирующая доза составляет 100 КОЕ. При попадании в организм возбудителю противостоит цилиарная активность цилиндрического эпителия, слизистый слой, затем фагоцитирующие клетки, плазматические клетки, местно синтезируемые IgA и система комплемента. Микоплазмы успешно преодолевают эти надежные средства защиты, благодаря своим особенностям, а именно: малый размер, активная скользящая подвижность, мощный адгезивный аппарат, наличие поверхностных антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами тканей

организма человека (легкого, мозга, печени, гладких мышц, эритроцитов и лейкоцитов). Микоплазма оказывает специфическое и неспецифическое митогенное действие на лимфоциты. Скопление возбудителя и его метаболитов, особенно гемолизина, приводит к нарушению микроциркуляции: появлению геморрагий в виде точечных кровоизлияний в ткань легкого, геморрагических плевритов. Характерное для данной инфекции образование тромбов связано с повышенной внутрисосудистой коагуляцией и с повреждением стенок сосудов иммунными комплексами, циркулирующими и осаждающимися на клетках эндотелия сосудов. Осложнения со стороны внутренних органов связаны с появлением аутоантител к тканям этих органов. В отношении протективного иммунитета при данной инфекции полной ясности нет. В 13-18% случаев после перенесенной микоплазменной пневмонии возникает реинфекция.

**Материал и методы микробиологической диагностики хламидийных и микоплазменных инфекций.** Возбудитель урогенитального хламидиоза культивируется в культуре клеток *Mc Coy* или 1-929, что может быть использовано для микробиологической диагностики.

Выявление антигенов возбудителя в исследуемом материале (соскоб) проводится иммунофлюоресцентным методом (РИФ непрямым с исследуемым материалом и диагностическими антителами для выявления антигенов *C. trachomatis*), а также методом ПЦР. При восходящих формах инфекции и ее осложнениях (сальпингит, трубное бесплодие у женщин) высокоинформативна ИФА с парными сыворотками обследуемых и хламидийным антигеном. В этом случае диагностическое значение имеют показатели нарастания специфических антител в парных сыворотках. При серологическом скрининге показатели титра антител 1:64 и более имеют диагностическое значение как в отношении текущей, так и в отношении перенесенной инфекции. Серодиагностика респираторного хламидиоза проводится с сыворотками обследуемых и диагностикумами, содержащими видоспецифические (для *C. pneumoniae*) моноклональные антитела. Традиционная серологическая диагностика с орнитозным антигеном для РСК позволяет получить информацию о хламидийной природе заболевания.

Набор *Mycoplasma DUO* позволяет культивировать, идентифицировать и дифференциально титровать урогенитальные микоплазмы, а также определять чувствительность культур к антибиотикам. Метод позволяет получить результаты в течение 24-48 ч. Материалом для исследования являются соскобы из уретры, эндоцервикального канала, влагалища (реже - из глотки, назофарингиальной зоны, конъюнктивы у детей). Данный набор позволяет определить титры порядка  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  мл, которые считаются этиологически значимыми. Микроплата для определения чувствительности к антибиотикам включает два ряда по 8 лунок, содержащих различные антибиотики. Разные концентрации антибиотиков в лунках позволяют получить профиль чувствительности тестируемых микоплазм (чувствительная, умеренно устойчивая, устойчивая). Лунки Тс служат контролем роста без антибиотиков. Определение осуществляется с использованием содержимого лунки X набора *Mycoplasma DUO*.

**Неспецифическая профилактика и этиотропная терапия хламидийных и микоплазменных инфекций.** Профилактика урогенитального хламидиоза и осложнений у новорожденных - барьерная контрацепция, скрининговое обследование и своевременное лечение беременных. Антибактериальная терапия при хламидиозе и микоплазмозе - макролиды (эритромицин, азитромицин, джозамицин и т.д.).

## 5. Вопросы по теме занятия

1. Принципы антибактериальной терапии гонококковых инфекций.
2. Классификация и морфо-биологические свойства гонококков.
3. Материал и методы микробиологической диагностики гонококковой инфекции.
4. Экология, особенности эпидемиологии, патогенеза гонококковой инфекции.
5. Систематическое положение возбудителей сифилиса, хламидийных и микоплазменных инфекций.
6. Неспецифическая профилактика и этиотропная терапия сифилиса, хламидийных и микоплазменных инфекций.
7. Материалы и методы микробиологической диагностики сифилиса и заболеваний, вызванных хламидиями и микоплазмами.
8. Экология, эпидемиология, особенности патогенеза и иммунитета при сифилисе, хламидийных и микоплазменных инфекциях.
9. Морфо-биологическая характеристика возбудителей сифилиса, хламидийных и микоплазменных инфекций

## 6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов

1. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОЙ ГОНОРЕИ.:

- 1) микроскопический, бактериологический;;
- 2) бактериологический, биологический;;
- 3) биологический, серологический;;
- 4) серологический, аллергический;;
- 5) вирусологический;;

2. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ГОНОРЕИ.:

- 1) плановая;
- 2) по эпид.показаниям;

- 3) проводится подросткам группы риска;
  - 4) проводится в роддоме путем закапывания в глаза 1% р-ра AgNO<sub>3</sub>;
  - 5) не разработана;
3. ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА:
- 1) *Treponema denticola*;
  - 2) *Treponema vincentii*;
  - 3) *Treponema pallidum*;
  - 4) *Treponema carateum*;
  - 5) *Treponema bryantii*;
4. ИСТОЧНИК ИНФЕКЦИИ ПРИ СИФИЛИСЕ:
- 1) бактерионоситель;
  - 2) больной;
  - 3) предметы обихода больного;
  - 4) свежая кровь больного;
  - 5) инфицированные продукты питания;
5. ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ПРИ СИФИЛИСЕ:
- 1) половой, трансмиссивный;
  - 2) алиментарный, контактный;
  - 3) половой, трансплацентарный;
  - 4) воздушно-капельный;
  - 5) воздушно-пылевой;
6. ХЛАМИДИИ:
- 1) мембранные паразиты;
  - 2) не чувствительны к антибиотикам;
  - 3) имеют уникальный цикл развития;
  - 4) не имеют клеточной организации;
  - 5) растут на сложных питательных средах;
7. ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) генно-инженерные вакцины;
  - 2) живые вакцины;
  - 3) анатоксины;
  - 4) иммуноглобулины;
  - 5) не разработаны;
8. ОСНОВНОЙ ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ/ УРЕАПЛАЗМ:
- 1) контактный;
  - 2) половой;
  - 3) вертикальный;
  - 4) воздушно-капельный;
  - 5) алиментарный;

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. Больной К обратился к врачу с жалобами на гнойные выделения из уретры и рези при мочеиспускании. При опросе выяснилось, что симптомы гнойного уретрита появились через 3 дня после случайного, незащищенного полового контакта. Врач заподозрил гонорейный уретрит. 1) ;2) ;3) ;4) .;

**Вопрос 1:** Укажите таксономическое положение гонококков.;

**Вопрос 2:** Перечислите факторы патогенности *N. gonorrhoeae*.;

**Вопрос 3:** Укажите источник инфекции и возможные пути передачи.;

**Вопрос 4:** В чем причина сложности выделения гонококков при хронической гонорее?;

1) Семейство – *Neisseriaceae*; род – *Neisseria*; вид – *N. gonorrhoeae*.;

2) Факторы патогенности – пили, белки клеточной стенки, эндотоксин;

3) Источник инфекции – больной острой или хронической формой гонореи. Пути передачи – половой, вертикальный.;

4) Внутриклеточная персистенция возбудителя в эпителиоцитах;

2. С материалом от обследуемого К. с клиническим диагнозом «Урогенитальный хламидиоз?» была поставлена РИФ.

**Вопрос 1:** С какой целью была поставлена РИФ?;

**Вопрос 2:** Что является критерием оценки РИФ?;

1) С целью сероидентификации предполагаемого возбудителя.;

2) При положительной РИФ происходит соединение антигена и специфических антител, меченных флюорохромом. При освещении УФ-лучами наблюдается ярко-желтое или зеленое свечение клеток микроорганизмов, сходных по морфологии с предполагаемым возбудителем.;

3. У обследуемого с предварительным диагнозом “уретрит хламидийной этиологии” данные серодиагностики отрицательные.

**Вопрос 1:** Какие дополнительные исследования можно провести в данной ситуации;

- 1) Можно поставить РИФ на выявление антигена в исследуемом материале или молекулярно-генетическую диагностику, например, ПЦР.;
4. У женщины на 8 месяце беременности при плановом обследовании на сифилис реакция микропреципитации с кардиолипиновым антигеном положительная.

**Вопрос 1:** Является ли этот результат подтверждением сифилиса у пациентки. Обоснуйте свой ответ;

**Вопрос 2:** Какие исследования необходимо провести беременной для уточнения предположительного диагноза;

- 1) Данный результат не подтверждает наличие сифилиса у пациентки, т.к. реакция микропреципитации при скрининговых обследованиях проводится не со специфическим трепонемным АГ, а с кардиолипиновым и, следовательно, является неспецифической. При беременности она часто бывает ложноположительной, особенно в III триместре.;
- 2) Необходимо провести более специфические тесты - микропреципитацию со специфическим трепонемным антигеном, РНГА, ИФА, РИБТ.;
5. Больной К., 30 лет, обратился в поликлинику с жалобами на увеличение лимфоузлов на шее справа у угла нижней челюсти. После осмотра направлен участковым врачом в КВД с предварительным диагнозом - первичная сифилома, расположенная на миндалине. При бактериоскопическом исследовании содержимого сифиломы в темном поле бледные трепонемы не обнаружены. Серологические реакции на сифилис отрицательные.

**Вопрос 1:** В праве ли врач-венеролог отвергнуть диагноз сифилис;

**Вопрос 2:** Какова его дальнейшая тактика;

- 1) Отсутствие бледной трепонемы в отделяемом эрозий, язв не исключает диагноз сифилиса. При проведении серодиагностики следует учитывать, что антитела к бледной трепонеме появляются поздно, в среднем через 2-3 недели после появления первичного аффекта. В связи с этим врач на данном этапе не может отвергнуть диагноз сифилиса.;
- 2) Необходимо повторить проведенные исследования, а также исследовать пунктат регионарных лимфатических узлов на наличие бледных трепонем.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 11.** Микробиологическая диагностика холеры. Микробиологическая диагностика хеликобактерной инфекции.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы):

Холера – особо опасное инфекционное заболевание человека с фекально-оральным механизмом заражения, вызываемого вибрионами холеры. За последние полтора столетия человечество пережило 6 пандемий холеры, которые остались в памяти народов как страшные, опустошительные бедствия. В настоящее время мир переживает седьмую пандемию холеры, начало которой относится к 1961 году, вызванную *V. cholerae* eltor. Некоторые исследователи высказывают возможность начала восьмой пандемии холеры, связывая это с регистрацией крупных эпидемий и вспышек, обусловленных *V. cholerae* O 139.

Проблема завоза холеры на территорию России остается актуальной в связи с регистрацией заболевания в странах ближнего (Украина) и дальнего зарубежья. Особенностью эпид. процесса является формирование эндемичных очагов (Дагестан). Положение усугубляется социальными потрясениями и военными действиями.

Род *Helicobacter* вычленен в качестве самостоятельного из рода *Campylobacter* в 1991 г. На сегодняшний день в нем выделяют 3 патогенных для человека вида: *H. pylori*, *H. fennelli*, *H. cinaedi*. *H. pylori* расценивается как этиотропный агент, ассоциирующийся с хроническим гастритом, язвенно-эрозивными поражениями желудка и 12-перстной кишки. Из биоптатов слизистой оболочки в 60-90% случаев у таких больных выделяется *H. pylori*, что позволяет предположить ведущее значение данного возбудителя в возникновении этих заболеваний. Эпидемиологические исследования различных авторов показали, что обсемененность *H. pylori* у пациентов, страдающих раком желудка составляет от 72 до 100%.

На основании полученной информации Международное агентство по исследованию рака при ВОЗ в 1994 году отнесло хеликобактерную инфекцию к канцерогенам первого класса и определило ее как причину развития рака желудка у человека.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать, уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Микробиологическая диагностика холеры**

По тяжести клинического течения, по летальности, по способности одновременно охватывать большие территории холера относится к группе ООИ. Диагностические исследования на холеру регламентируются и осуществляются специально подготовленными специалистами лабораторий ООИ центров госсанэпиднадзора ведомственных и противочумных учреждений.

Классификация возбудителя холеры. Сем. *Vibrionaceae*, род *Vibrio*, вид *V. cholerae* O1 (биовары *cholerae*, *eltor*; серовары Инаба, Огава и Гикошима) и O139 серогрупп.

Холерные вибрионы – слегка изогнутые палочки (1,5-3,0 x 0,2-0,6 мкм), имеющие полярно расположенный жгутик; характеризуются значительным полиморфизмом; грамотрицательные; спор и капсул не образуют.

Холерные вибрионы – факультативные анаэробы, к питательным средам не требовательны. Щелочелюбивы. Размножаются при температуре 35-37°C и рН равном 8,6-9,0. Элективной средой является 1% пептонная вода с рН 8-9. На поверхности этой среды через 6-8 часов они образуют тонкую нежную, голубоватую «пленку». На щелочном агаре через 12-14 часов колонии круглые, диаметром 1-2 мм, гладкие, плоские, прозрачные, голубоватые в

проходящем свете, гомогенные, с ровным краем.

Вибрионы – хемоорганотрофы. Биохимически активны. Сахаролитические свойства выражаются в расщеплении сахаров с образованием кислоты без газа. Ферментация сахарозы, маннозы и отсутствие ферментации арабинозы является важным диагностическим признаком (1 ряд Хейберга).

Протеолитические свойства: разжижают желатину, образуют индол, не образуют сероводород, восстанавливают нитраты в нитриты, расщепляют крахмал и т.д.

Вибрионы содержат термостабильные О-антигены (соматические) и термолабильные Н-антигены (жгутиковые). Возбудителями холеры являются *V. cholerae* серогрупп О1 и О139 (Бенгал). Антиген О1 состоит из трех компонентов – А, В, С, сочетание которых определяет серовары: Огава (АВ), Инаба (АС), Гикошима (АВС). Кроме того, вид *V. cholerae* О1 делится на два биовара *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae eltor*.

Встречаются вибрионы, которые не агглютинируются холерной О1-сывороткой. Это так называемые НАГ-вибрионы. В настоящее время установлено около 200 серологических О-групп НАГ-вибрионов.

**Факторы вирулентности и патогенности.** У холерных вибрионов 2 типа токсинов – эндотоксин и экзотоксин или энтеротоксин. Эндотоксин – ЛПС клеточной стенки, термостабилен, стимулирует выработку вибриоцидных антител и агглютининов. Основная роль в развитии симптома холеры принадлежит холерогену, который вызывает расстройство функциональных систем, ответственных за транспортировку жидкости и электролитов из внутренней среды в просвет кишечника.

Токсигенные, эпидемически значимые варианты холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, содержащие гены холерного токсина (ctx АВ) и токсин-корректируемых пилей (tcp А), вызывают заболевания холерой, склонные к широкому эпидемическому распространению. Нетоксигенные (не содержащие гена холерного токсина), эпидемически не опасные варианты холерных вибрионов О1 и других серогрупп могут вызывать спорадические или групповые заболевания, не склонные к широкому эпидемическому распространению.

**Экология, источники, пути распространения, особенности патогенеза и иммунитета при холере.** Холера – антропонозное заболевание. Источником инфекции является больной человек и бактерионоситель. При холере, вызванной *V. cholerae eltor*, отмечается более длительное бактерионосительство и наличие значительного количества атипичных форм болезни.

Заражение происходит алиментарным (через инфицированную воду или продукты) или контактно-бытовым путем.

Вибрионы преодолевают желудочный барьер, достигают тонкой кишки, начинают интенсивно размножаться и выделять экзотоксин. Без предварительной нейтрализации соляной кислоты желудочного содержимого лишь очень большие дозы холерного вибриона ( $10^{11}$ ) вызывают у отдельных лиц заболевание, а после предварительной нейтрализации соляной кислоты желудка заболевание возникает уже при введении  $10^6$  вибрионов (т.е. в 100 000 раз меньшей дозой).

Энтеротоксин активирует аденилатциклазу слизистой оболочки кишечника, что способствует увеличению количества цАМФ и выходу солей и воды в просвет кишечника. Начинается профузный понос. Потеря жидкости достигает одного литра в течение часа. Больные погибают в результате тяжелого обезвоживания, ацидоза, уремии. Заражение холерными вибрионами может вызывать различную клиническую картину – от бессимптомного носительства до состояния алгида.

При холере иммунитет носит антимикробный и антитоксический характер и связан с выработкой специфических антител, усилением фагоцитоза. Большую роль играют факторам местной защиты – секреторным иммуноглобулинам.

**Правила забора и доставки материала при диагностике холеры, как особо опасной инфекции.** Материал для исследования – испражнения и рвотные массы больных. Для установления факторов передачи и путей распространения инфекции – трупный материал, вода и пищевые продукты. Для выявления носителей – фекалии, желчь.

Учитывая слабую устойчивость холерных вибрионов к кислотам, дезинфицирующим веществам, сбор проб необходимо осуществлять в чистую стерильную стеклянную посуду, которая не должна содержать следов дезинфицирующих веществ. Материал необходимо забирать до приема антибиотиков.

Доставка материала в лабораторию должна быть осуществлена не позднее 2-х часов от момента его сбора или следует помещать пробы в консервант: 1% пептонную воду, щелочную пептонную воду с теллуридом калия.

Важно обеспечить безопасность при транспортировке материала, так как холера относится к числу особо опасных

инфекций.

## **Методы микробиологической диагностики холеры.**

*Бактериологический метод.* Интервалы между этапами в бак. методе при диагностике холеры составляют часы, а не дни, как при других инфекциях.

*1-й этап.* Первичный посев материала в щелочную пептонную воду и чашки со щелочным агаром.

*2-й этап* (через 6-8 часов).

1. Бактериоскопия мазков из пленки на пептонной воде.
2. Определение подвижности.
3. Реакция иммобилизации с холерными O1 и O139 сыворотками (1:100).
4. Пересев на вторую 1% пептонную воду.
5. Посев на чашку с агаром.

*3-й этап* (через 12-16 часов).

1. Изучение роста в пептонной воде и на плотных средах.
  2. Высев с пептонной воды на чашки с плотными средами.
  3. Отсев подозрительных колоний на скошенный агар в пробирки.
  4. Ускоренная идентификация подозрительных колоний нативного посева.
- Ориентировочный ответ по данным ускоренной диагностики второй 1% пептонной воды;
  - Предварительный положительный ответ по данным предварительной идентификации подозрительных колоний нативного посева.

*4-й этап* (через 18-24 часа).

1. Идентификация культуры:
  - Изучение морфологических и культуральных свойств.
  - Изучение подвижности.
  - Изучение серологических свойств.
  - Посев на среды с сахарозой, маннозой и арабинозой.
  - Определение фаголизабельности холерными фагами и Эль-Тор.
  - Определение гемолитических свойств.
  - Определение чувствительности к полимиксину.

*5-й этап* (через 24-36 часов). Учет результатов.

Окончательный ответ по данным полной идентификации культуры.

Важно подчеркнуть дифференцировку холерного вибриона от холероподобных и необходимости в связи с этим проводить диагностику по совокупности признаков выделенной культуры и данных эпидемиологического анализа.

*Дополнительные исследования.* Во флакон, содержащий 100-200 мл 1% пептонной воды и агглютинирующую холерную O1-сыворотку в разведении до половины ее титра, вносят испражнения не более чем от 5 лиц. Флакон помещают в термостат. Через 3-4 часа холерные вибрионы начинают агглютинироваться и постепенно выпадают в осадок в виде хлопьев на дно флакона. Через 6 часов после микроскопии мазков, изучения подвижности дают ответ. Немедленно проводится посев индивидуально от каждого из 5 лиц.

*Исследование воды.* Для исследования воды без фильтрации берут ее не менее 1 литра, доводят рН до 7,6-7,8, затем добавляют к 450-900 мл воды 50-100 мл 10% раствора пептона, получая таким образом 1% пептонную воду, разливают в колбы по 250 мл и ставят в термостат на 5-8 часов. Дальнейшие исследования ведут по обычной схеме.

*Серологический метод.* Серологическое исследование является вспомогательным и применяется для ретроспективной диагностики холеры, выявления вибрионосителей и оценки напряженности постинфекционного и поствакцинационного иммунитета. Для этого используют РА, РНГА, РНАг (реакция нейтрализации антигена), тест определения вибриоцидной активности сыворотки и токсиннейтрализующих антител в сыворотке.

Необходимо исследовать парные сыворотки с интервалом в 7-10 дней. Первая сыворотка должна быть взята на 2-3 болезни, а вторая - через 5-7 дней для оперативной диагностики и через 7-10 дней и более - для ретроспективной.

Методы экспресс-диагностики холеры.

Микроскопия материала от больного в фазово-контрастном или темнопольном микроскопе, РИФ. При достаточно большом количестве вибрионов обнаруживается интенсивное движение и обездвиживание в капле с холерными О1 и О139 сыворотками (1:50) (реакция иммобилизации). В мазках, которые фиксируют этиловым спиртом или смесью Никифорова и окрашивают по Граму или карболовым фуксином (1:10), обнаруживают типичные вибрионы, дающие положительную РИФ с люминесцирующей сывороткой. Это позволяет дать первичный сигнальный ответ через 15-20 мин от начала исследования нативного материала.

Целесообразно применять ПЦР со специфическими праймерами.

**Специфическая профилактика, основы патогенетической терапии холеры.** Вопрос о целесообразности применения для иммунизации живой вакцины окончательно не решен. Убитая вакцина обладает защитным действием, но уровень и продолжительность противомикробного иммунитета довольно низкие, особенно у детей (иммунитет ослабевает через 3-4 месяца после вакцинации, а через год полностью исчезает). Для специфической профилактики используют также холероген-анатоксин и холерный бактериофаг.

*Направления терапии:*

- патогенетическое – регидратация;
- симптоматическое – борьба с нарушением ССС, почек;
- антимикробное – тетрациклины, хлорамфеникол, фторхинолоны.

**Микробиологическая диагностика хеликобактерной инфекции.**

**Классификация и морфо-биологические особенности хеликобактера.**

Сем. *Helicobacteriaceae* (ранее *Campylobacteriaceae*). Род *Helicobacter*. Вид *H. pylori* (НР).

Гр (-) изогнутые палочки, иногда S-образные или в виде «летающей ласточки».

Микроаэрофилы и капнофилы, требовательны к питательным средам. Культивирование осуществляется на специальных средах (кровяном агаре на основе колумбийского агара, шоколадном агаре, Pylori-агаре и др.). В качестве селективных сред используют среды с добавлением, например, ванкомицина, триметоприма, полимиксина, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Для создания соответствующей атмосферы ( $O_2 = 5-6\%$ ;  $CO_2 = 8-10\%$ ;  $N_2 = 80-82\%$ ; влажность 95-98%) используют специальные газогенераторные пакеты. Время инкубации составляет при первичном обследовании 3-7 дней, для контроля изменчивости – до 14 дней. Колонии: диаметр до 0,5-2 мм в виде «капель росы» или, при сплошном росте, в виде прозрачной пленки.

НР обладает уреазной, каталазной и оксидазной активностью. Не ферментирует глюкозу, не продуцирует нитраты, не образует индол.

**Антигенная структура.** Выделяют несколько антигенов НР:

- Эндотоксин – липополисахарид, индуцирующий слабый иммунный ответ со стороны слизистого IgA (sIgA).
- O-АГ (Lewis АГ) – специфическая полисахаридная цепочка мембранного липополисахарида. Осуществляет мимикрию под Lewis<sup>x</sup> и Lewis<sup>y</sup> антигены группы крови человека. Вызывают IgG-ответ.
- Саg А-протеин – белокассоциированный цитотоксин. Иницирует сывороточные IgG-антитела и местный sIgA-ответ.
- Vac А – вакуолизирующий цитотоксин. Обладает минимальной иммуногенностью. Если штамм НР не способен синтезировать Vac А, то вероятность образования язв чрезвычайно мала, процесс останавливается на стадии хронического гастрита.
- Энзим-уреаза. Обладает достаточно высокой иммуногенностью. Располагается в большом количестве на поверхности бактерии и в ее цитоплазме.

**Экология, источники, пути распространения, особенности патогенеза и иммунитета при заболеваниях, вызываемых хеликобактером.** Источником и естественным резервуаром хеликобактериоза является зараженный человек.

Носительство возможно. Связано с заселением слизистой оболочки желудка слабовирулентными штаммами.

Пути передачи окончательно не установлены. Предполагают, что чаще задействован контактный (контактно-бытовой) путь передачи НР от человека человеку. В семьях – оральным путем (при поцелуях, при облизывании сосок грудных младенцев, через столовые приборы или предметы личной гигиены). Вероятно, возможен фекально-оральный механизм передачи. Имеет значение внутрибольничное инфицирование – при диагностических и терапевтических процедурах, в частности, при эзофагогастродуоденоскопии.

**Патогенез.** Попадая в просвет желудка НР, продуцируя уреазу, гидролизует мочевины с образованием аммиака и  $\text{CO}_2$ . Эти соединения, нейтрализуя соляную кислоту, создают локальное защелачивание вокруг каждой бактериальной клетки. Как аммиак, так и сама уреазы, способны оказывать повреждающее действие на эпителиальные клетки. Одновременно, другой фермент, выделяемый бактерией – муциназа, разрушает муцин, содержащийся в желудочной слизи, приводя к локальному снижению вязкости. Эти изменения и высокая подвижность НР позволяют возбудителю легко преодолевать слизистый барьер и адгезироваться на эпителии желудка. Активно размножаясь, НР полностью колонизирует слизистую оболочку антрального отдела желудка, вызывая ее воспаление и повреждение за счет способности продуцировать множество ферментов:

- фосфолипазы – обеспечивают образование из желчи токсигенных лецитинов, разрушают слой гидрофобной, содержащей фосфолипиды, слизи, предохраняющей эпителий от прямого воздействия соляной кислоты и пепсина;
- протеазы – разрушают разнообразные, в т. ч. защитные белковые комплексы;
- каталаза – тормозит переваривание НР, фагоцитированных полиморфноядерными лейкоцитами.

Инкубационный период 6-8 дней. Эндоскопические признаки гастрита определяются на 10-й день после заражения.

### **Материал и методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых хеликобактером.**

*Забор и транспортировка материала.* Биоптат рекомендуется брать из мест с максимально выраженной гиперемией и отеком, желательнее как из тела, так и из антрального отдела желудка до начала антибиотикотерапии.

Для успешного культивирования НР, чтобы продлить срок транспортировки биоптата из эндоскопического кабинета в микробиологическую лабораторию до суток необходимо поместить его транспортную среду (Стюарта, Кэри-Блера, Бью Мерью).

1) Бактериологический метод – культивирование НР, используя биоптаты СОЖ, с обязательной постановкой антибиотикограммы, т. к. НР резистентен ко многим антибиотикам.

2) Гистологический метод – исследование гистологических препаратов СОЖ, окрашенных по Граму, Гимзе, и др. Оценка проводится количественно:

- < 20 бактериальных клеток в поле зрения – слабая степень обсемененности;

- 20-50 – средняя;

- > 50 – высокая.

3) Цитологическая диагностика – выявление НР в мазках-отпечатках.

4) Биохимические – постановка уреазного теста с биоптатом, оксидазного и каталазного тестов. *Уреазный тест.* В диагностические среды, включающие мочевины и индикатор, помещают гастробиоптат. Если в среде начинает накапливаться аммоний (продукт гидролиза мочевины уреазой), рН среды меняется в щелочную сторону, и индикатор меняет цвет.

5) ИФА – определение антител к НР в крови больного.

6) ПЦР – полимеразная цепная реакция дает возможность идентифицировать видоспецифичный для НР фрагмент ДНК. Материалом для него являются биоптаты СОЖ, желудочный сок, смывы с поверхности ротовой полости, зубной налет, копрофильтраты.

**Особенности диагностики для определения эффективности антихеликобактерной терапии.** Контрольное исследование проводят спустя 4-6 недель после курса лечения или окончания лечения антибиотиками или антисекреторными средствами. Диагностика осуществляется не менее чем двумя методами. Для методов непосредственного обнаружения (бактериологический, морфологический, уреазный) необходимо исследование минимум 2 биоптатов из тела желудка и 1 биоптата из антрального отдела.

### **Профилактика, основы патогенетической терапии заболеваний, вызываемых хеликобактером.**

Специфическая профилактика не разработана. Важным является соблюдение санитарно-гигиенических правил в быту, организация централизованного водоснабжения в населенных пунктах, санитарно-просветительная работа среди населения, жесткое соблюдение режима стерилизации и дезинфекции в ЛПУ, особенно в кабинетах фиброгастроскопии с целью предупреждения ятрогенного заражения больного и профессионального заражения врача.

Основу патогенетической терапии хеликобактерной инфекции составляет рациональная антибиотикотерапия в

сочетании антисекреторными препаратами и другой симптоматической терапией.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Классификация и морфо-биологические особенности хеликобактера.
2. Критерии принадлежности холеры к группе особо опасных инфекций. Правила ТБ при работе с возбудителями особо опасных инфекций.
3. Классификация и морфо-биологические особенности возбудителя холеры.
4. Экология, источники, пути распространения, особенности патогенеза и иммунитета при холере.
5. Правила забора и доставки материала при диагностике холеры, как особо опасной инфекции.
6. Методы микробиологической диагностики холеры.
7. Методы экспресс-диагностики холеры.
8. Специфическая профилактика, основы патогенетической терапии холеры.
9. Экология, источники, пути распространения, особенности патогенеза и иммунитета при заболеваниях, вызываемых хеликобактером.
10. Профилактика, основы патогенетической терапии заболеваний, вызываемых хеликобактером.
11. Материал и методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых хеликобактером.

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

### **1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ HELICOBACTER PYLORI:**

- 1) гиперацидный гастрит;
- 2) гепатит;
- 3) пиелонефрит;
- 4) менингит;
- 5) гнойно-воспалительные заболевания кожи;

### **2. МОРФОЛОГИЯ HELICOBACTER PYLORI:**

- 1) Гр (-) изогнутые палочки, лофотрихи;
- 2) Гр (+) крупные прямые палочки, перетрихи;
- 3) Гр (-) диплококки, неподвижны;
- 4) Гр (+) полиморфные палочки, амфитрихи;
- 5) Гр (+) длинные ветвящиеся палочки, неподвижны;

### **3. ХОЛЕРА ОТНОСИТСЯ К:**

- 1) эндемичным инфекциям;
- 2) особо опасным инфекциям;
- 3) инфекциям, не представляющим особой опасности;
- 4) сапронозам;
- 5) трансмиссивным инфекциям;

### **4. ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА ХОЛЕРУ ОТ БОЛЬНОГО ЗАБИРАЮТ:**

- 1) кусочки органов;
- 2) кровь;
- 3) испражнения;
- 4) ликвор;
- 5) мочу;

### **5. ХОЛЕРНЫЙ ВИБРИОН:**

- 1) облигатный анаэроб;
- 2) факультативный анаэроб;
- 3) облигатный аэроб;
- 4) микроаэрофил;
- 5) капнофил;

### **6. ОСНОВНАЯ МЕРА ПРОФИЛАКТИКИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ:**

- 1) соблюдение правил личной гигиены;
- 2) соблюдение правил дезинфекции и стерилизации эндоскопического оборудования;
- 3) отказ от курения;
- 4) прием антибиотиков;
- 5) вакцинация;

### **7. ПО МОРФОЛОГИИ ВОЗБУДИТЕЛЬ ХОЛЕРЫ ОТНОСИТСЯ К:**

- 1) бациллам;
- 2) палочкам;
- 3) вибрионам;
- 4) коккам;
- 5) спирохетам;

### **8. HELICOBACTER PYLORI:**

- 1) бактерии S-формы («крылья чайки»);
- 2) спирохеты;

- 3) вибрионы;
  - 4) палочки;
  - 5) кокки;
9. ОСНОВНОЙ ФАКТОР ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ:

- 1) эндотоксин;
- 2) экзотоксин (холероген);
- 3) антитоксин;
- 4) анатоксин;
- 5) гиалуронидаза;

10. ОСНОВНОЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА:

- 1) серологический;
- 2) биологический;
- 3) бактериологический;
- 4) микроскопический;
- 5) ПЦР;

**7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. С культурой, выделенной от больного, поставлены развернутые реакции агглютинации. Реакция прошла положительно с сывороткой Огава и Инаба

**Вопрос 1:** Назовите цель постановки реакций;

**Вопрос 2:** Оцените полученный результат;

- 1) Цель постановки реакции - определение серовара *V. cholerae*;
- 2) Данная культура принадлежит к сероварианту Гикошима (ABC) т.к. она положительно прореагировала с сывороткой Огава, содержащей антитела к А и В компонентам О-АГ и Инаба, содержащей антитела к А и С компонентам;

2. Пациент обратился к врачу по поводу болей в области эпигастрии. При дуоденальном обследовании была обнаружена язва 0,5x0,9 см в антральной части желудка

**Вопрос 1:** Назовите инвазивные и неинвазивные методы обследования больного с целью диагностики хеликобактерной инфекции;

**Вопрос 2:** Укажите особенности забора биоптата желудка для микробиологической диагностики;

- 1) К инвазивным методам диагностики хеликобактерной инфекции относят все методы диагностики, которые проводят с использованием биоптата слизистой желудка (микроскопия биоптата, уреазный тест, бактериологический метод, ПЦР и др.). К неинвазивным методам относят дыхательный тест, серодиагностику, бактериологическое исследование испражнений и желудочного сока и др.;
- 2) Для получения объективного результата не рекомендуется брать биоптат из дна язвы, т.к. в самой язве *H. pylori* отсутствует, там нет эпителиальных клеток, необходимых для адгезии бактерий. *H. pylori* колонизирует только эпителий желудочного типа и, если в биоптате преобладает кишечная метаплазия, бактерии могут быть не обнаружены конкретно в этом фрагменте слизистой оболочки. *H. pylori*, как правило, не встречается в краях язвы желудка или 12-ти перстной кишки. Поэтому биоптат рекомендуется брать из мест с максимально выраженной гиперемией и отеком, желательнее как из тела, так и из антрального отдела желудка до начала антибиотикотерапии. В позднюю стадию заболевания *H. pylori* не обнаруживается, что обусловлено атрофией желез и метаплазией желудочного эпителия в кишечный, который лишен рецепторного аппарата, необходимого для адгезии НР;

3. С самолёта рейса Дели - Москва снят заболевший пассажир и немедленно доставлен в инфекционное отделение БСМП. Объективно: многократные понос и рвота, выделения напоминают рисовый отвар, T - 35°

**Вопрос 1:** Как и какие материалы заберете у больного;

**Вопрос 2:** Какие микробиологические методы диагностики проведёте;

**Вопрос 3:** Когда и в какой форме дадите ответ;

- 1) Стерильные половинки от чашки Петри кладутся в тазик, промытый кипяченой водой (сбор рвотных масс), и в подкладное судно, промытое кипяченой водой (для забора испражнений). Из чашки Петри материал переносится в специальные емкости с притертой пробкой и с нарочным (врач, сестра, но не санитарка) на больничном транспорте доставляются в баклабораторию. Здесь производится исследование круглосуточно;
- 2) Проводят бактериологический метод исследования на холеру. Материалы, отдельно каждый, засевают обильно на щелочную пептонную воду и методом «штрих с площадкой» на пластинку агаровой (щелочной среды, ТЦБС и т.п.). Через 6 часов первый учет и анализ роста на пептонной воде и повторный высев из «плёнки» на агаровую пластинку. Через 12 и 18 часов учитывают, анализируют рост колоний и отсеивают на скошенный агар. Через 13 и 24 часа исследуют комплекс признаков холерного вибриона;
- 3) Первый предварительный ответ - через 6 часов по анализу роста на пептонной воде. Второй - через 12 и 18 часов по анализу колоний вибрионов. Третий окончательный ответ - через 36 и 48 часов по исследованию культур;

**8. Рекомендованная литература по теме занятия**

**- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. -

616 с. : ил. - Текст : электронный.

**- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 12.** Микробиологическая диагностика шигеллезов. Контрольная работа: грамотрицательные бактерии - возбудители кишечных инфекций (эшерихии, шигеллы, сальмонеллы); хеликобактерии. Зачет.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы):

Шигеллезы или бактериальная дизентерия ежегодно поражает миллионы людей в разных частях земного шара, нанося серьёзный ущерб здоровью и экономике. На протяжении 20 века происходила смена микробного пейзажа возбудителей дизентерии. Более вирулентные шигеллы Шига уступили место менее вирулентным, но более резистентным *S.flexneri* и *S.sonnei*. Распространение шигеллеза Флекснера происходит, в основном, водным путем в условиях низкого уровня санитарно-коммунального благоустройства. Преобладание шигеллеза Зонне связано с пищевым путем передачи в условиях централизованного общественного питания. Интенсивное формирование лекарственной устойчивости шигелл рассматривается как одна из причин снижения эффективности антибиотикотерапии и стабилизации заболеваемости на высоком уровне.

В диагностике и организации рациональных форм борьбы с шигеллёзами, дифференциация их от других ОКИ важная роль принадлежит микробиологическим методам обследования людей и объектов внешней среды.

**3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агаре и методом серийных разведений., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

**4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Классификация и морфо-биологические свойства шигелл:**

Бактериальная дизентерия – полиэтиологичное заболевание. Возбудители дизентерии или шигеллезов относятся к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Shigella*. По ферментативным антигенным свойствам они подразделяются на 4 группы: А, В, С и D, в которые входят 4 вида: гр. А-*S.dysenteriae* /маннитнегативные/, гр. В - *S.flexneri* /маннитпозитивные/, гр. С - *S.boydii* /маннитпозитивные/, гр. D - *S.sonnei* /медленно ферментирующие лактозу и сахарозу на 2-е сутки. По отечественной классификации у *S.dysenteriae* различают 10 сероваров: I серовар - шигеллы Шига, II - шигеллы Шмитца-Штутцера, III-VII - шигеллы Ларджа -Сакса, VIII-X - провизорные, т. е. временные. У *S.flexneri* различают 6 сероваров: VI серовар это шигеллы Ньюкастл. Серовары различаются еще по групповым и типовым антигенам: 1а,1в,2а,2в,3а,3в,3с,4а,4в, 5х<sup>+</sup>,6х<sup>+</sup>у<sup>+</sup>- У *S.boydii* различают 15 сероваров однородны и *S.sonnei* в антигенном отношении.

Шигеллы сходны между собой по морфологии, тинкториальным свойствам. Это грамотрицательные бактерии, палочки с закругленными концами, типичные для энтеробактерий, неподвижны, спор и капсул не образуют. Многие из них имеют половые пили и пили общего типа

Факультативные анаэробы. Растут на простых питательных средах при оптимуме рН среды 7,2, Т роста 37°. На плотных средах образуют колонии S- формы, шигеллы Зонне – S и R формы. На дифференциально-диагностических средах Плоскирева, Эндо (Левина): колонии первые 2-е суток лактозоотрицательные, неокрашенные, голубоватые или розовые. В бульоне шигеллы растут с диффузным помутнением (S форма); колонии R - формы, образуют придонный осадок, среда остается прозрачной.

Ферментативные свойства: все представители рода шигелл декарбоксилируют глютаминовую кислоту, не декарбоксилируют лизин и фенилаланин, не ферментируют мочевины, малонат натрия, глицерин, не образуют

сероводород (исключение, слабо могут шигеллы Флекснера); углеводы ферментируют до кислоты (исключение, серовар шигелл Флекснера). Не растут на ацетатной и цитратной средах.

*S.dysenteriae*: ферментируют глюкозу до кислоты, не ферментируют лактозу, сахарозу, маннит, вариабельны в отношении дульцита и образования индола, не декарбоксилируют орнитин.

*S.flexneri*: ферментируют глюкозу и маннит, не ферментируют лактозу, сахарозу, дульцит, вариабельны в отношении индола, не декарбоксилируют орнитин.

*S.boydii*: ферментируют глюкозу и маннит, не ферментируют лактозу и сахарозу, вариабельны в отношении дульцита, ксилоза, не декарбоксилируют орнитин.

*S.sonnei*: ферментируют глюкозу и маннит, на 2-5 сутки лактозу и сахарозу, не ферментируют дульцит, не образуют индол, декарбоксилируют орнитин; вариабельны в отношении ферментации рамнозы и ксилозы (различают 4 хемовара). Окончательная идентификация шигелл осуществляется путем изучения антигенной структуры.

### **Факторы вирулентности шигелл:**

Шигеллы образуют эндотоксин, энтеротоксин и цитотоксин. Эндотоксин освобождается после разрушения шигелл, действуют нейротропно и увеличивает проницаемость сосудов. Энтеротоксин и цитотоксин - белки, энтеротоксин по механизму действия напоминает холероген и токсин холерного вибриона, но он менее токсичен. Цитотоксин препятствует синтезу белка в рибосомах клеток кишки.

### **Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза заболеваний, вызываемых шигеллами.**

Дизентерия - антропозное заболевание, но в питомниках от персонала установлено заражение обезьян.

Источником инфекции при дизентерии является больной человек и бактерионоситель

Дизентерия - инфекция с фекально-оральным механизмом заражения. Заражение происходит алиментарным, контактно-бытовым путями, через контаминированные предметы (особенно среди детей дошкольного возраста). Имеет значение величина инфицирующей дозы ( $10^1-10^2$ ).

Попав в кишечник, шигеллы прикрепляются фимбриями к клеткам эпителия толстой кишки, проникают и размножаются в них без проникновения в кровь. Интоксикация организмов обуславливается всасыванием через слизистую оболочку, главным образом толстого кишечника, токсинов шигелл. Шигеллы Зонне образуют энтеротоксин, способны размножаться в воде, молоке. Это обуславливает возможность пищевых токсикоинфекций, особенно среди детей.

Постинфекционный иммунитет видо- и типоспецифический, местный и общий, непрочный, непродолжительный. Обусловлен антителами М, А, G. При местном иммунитете имеют значение секреторные иммуноглобулины А, образуемые лимфоидными клетками слизистой оболочки кишки. Они покрывают ее и препятствуют прикреплению и проникновению шигелл в клетки эпителия.

### **Материалы и методы микробиологической диагностики дизентерии.**

Основной метод исследования - бактериологический направлен на выделение копрокультуры определенного вида, серовара шигелл.

Исследуемый материал следует забирать до лечения; испражнения 1-2 г, рвотные массы, промывные воды кишечника, от трупа кусочки печени, селезенки, мезентериальные железы, отрезок толстой кишки с содержимым, объекты внешней среды - пищевые продукты, вода.

Испражнения забирают с помощью ректальных трубок из прямой кишки. При массовом обследовании можно пользоваться стерильными маленькими тампонами, взятыми с помощью корнцанга, ректоскопом, для взятия материала из горшка, с пеленки можно использовать прокипяченные шпатели, ложки. Материал для посева доставляют в стерильных стеклянных баночках или пробирках, содержащих на 1/3 консерванты -30% раствора глицерина, 3% раствора хлорида натрия или боратную смесь, если время между сбором материала и посевом может превысить 1-2 часа.

Серологический метод является вспомогательным, ретроспективным при стертых формах заболевания имеет значение при диагностике заболевания у детей и обследовании контактных. Исследуют сыворотку крови, выявляют антитела постановкой РА дизентерийного Видаля или РПГА с помощью обычных или эритроцитарных диагностикумов Флекснера и Зонне. Диагностический титр РА у детей 1:100, у взрослых 1:200 при дизентерии Флекснера, при дизентерии Зонне у детей 1:50, у взрослых 1:100.

Аллергический метод - вспомогательный, удобен для выявления хронических форм дизентерии ставят внутрикожную пробу Цуверкалова с дизентерином (гидролизат из шигелл Флекснера и Зонне, белок). У детей до 3 месяцев эта проба отрицательна. В 20-25 % она может быть положительна у здоровых.

Экспресс диагностика. РИФ-реакцией иммунофлюоресценции выявляют шигеллы в мазках из надосадочной жидкости испражнений с помощью поливалентных флюоресцирующих дизентерийных сывороток и РИГА с исследуемым материалом и антителными эритроцитарными диагностикумами - *Sch. sonnei*, *Sch. flexneri* -позволяет обнаружить АГ шигелл в исследуемом материале.

Этапы выделения и идентификация копрокультуры шигелл. Дифференциация шигелл.

1 этап: для посева выбирают слизисто-гнойные комочки и делают: прямой посев на две чашки со средой Плоскирева, причем одна из них должна содержать левомицетин (тетрациклин) мл среды, для выделения антибиотикозависимых шигелл. Т.к. серовар 1 шигелл дизентерии плохо растут на среде Плоскирева, то дополнительно производят посев на чашку со средой Эндо или Левина.

Для обогащения делают посев в отношении 1:5 в пробирку с селенитовой средой с последующим высевом через 24-48 часов из нее на чашки с вышеназванными цветными дифференциально-диагностическими средами.

На II день: чашки вынимают из термостата и не вооруженным глазом или отбирают для выделения чистой культуры - копрокультуры лактозоотрицательные колонии: прозрачные, бесцветные, голубоватые, розоватые; шигеллы Зонне в R-форме дают мутные колонии. Отвивают на комбинированные среды Ресселя (Олькеницкого) или короткий «пестрый ряд» скошенный агар, среды Гисса с глюкозой и лактозой.

На III день: просматривают изменение цвета столбика и косяка, выделяют и отбирают подозрительные на шигеллы, т.е. ферментирующие глюкозу до кислоты или до кислоты и газа, и не ферментирующие лактозу. Для изучения морфологии и окраски по Граму из культур делают мазки. Проверяют подвижность культур в препарате «висячая» капля. Изучают антигенную структуру подвижных культур с помощью сальмонелезных, агглютинирующих сывороток, неподвижных - дизентерийных агглютинирующих сывороток, сначала с поливалентными сыворотками или смесью моносывороток, а затем с каждой из входящих в состав той, с которой получен положительный результат. В случае обнаружения *S.dysenteriae*, *S.flexneri* и *S.boydii* устанавливают серовар, а у *S.flexneri* дополнительно подсеровар по РА с типовыми и групповыми монорецепторными сыворотками. Выпускают: смесь 1 дизентерийных сывороток, включающих поливалентную сыворотку Флекснера и Зонне. Смесь 2 включает поливалентные сыворотки к *S.dysenteriae* и *S.boydii*. Выпускают поливалентные сыворотки Флекснера, Бойда, Лардж-Сакса и к провизорным шигеллам, видовую сыворотку Зонне, а также типовые и групповые.

На III этапе выдают отрицательный ответ при отсутствии подозрительных колоний на чашках.

При положительной РА копрокультуру для изучения ферментативных свойств засевают на «пестрый ряд»: МПБ, среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, дульцитом, ксилозой, орнитином. Проверяют фаголизабельность дизентерийным поливалентным фагом, ставят антибиотикограмму.

На IV этапе: учитывают результаты «пестрого ряда», определения фаголизабельности и анти-биотикограммы. Проводят идентификацию и дифференциацию и выдают окончательный ответ о виде и сероваре выделенных шигелл. Антитипичные или неагглютинабельные шигеллы проверяют посевом на 5% лактозу, малонат натрия, ацетатную среду Козера, дульцит, глицерин, салицин, лизин, глутаминовую кислоту, фенил аланин.

Проводят кератоконъюнктивальную пробу на морских свинках, вводят петлю суточной культуры.

При выделении копрокультуры сальмонелл, начиная с этапа изучения чистой культуры, исследование далее проводится по схеме аналогично изучению и идентификации гемокультуры.

### **Специфическая профилактика и терапия дизентерии**

Специфическая профилактика дизентерии гретыми, химическими вакцинами малоэффективна. Контактным проводят фагопрофилактику поливалентным дизентерийным фагом шигелл Флекснера, Зонне, Шига, Штутцера, Ньюкастл.

Специфическую терапию проводят дизентерийным поливалентным фагом в таблетках перорально или жидким ректально в клизмах. При хронических формах дизентерии Флекснера и Зонне для стимулирования иммуногенеза в комплексе с антибиотиками вводят инактивированную лечебную спиртовую вакцину Чернохвостовой из шигелл Флекснера и Зонне.

**Неспецифическая профилактика заболеваний, вызываемых шигеллами** заключается в активном выявлении больных и бактерионосителей, обследовании бактериологическим методом декретированного контингента,

соблюдении санитарно-гигиенических норм и правил, санитарном просвещении населения.

Контрольная работа: грамотрицательные бактерии - возбудители кишечных инфекций (эшерихии, шигеллы, сальмонеллы); хеликобактерии.

**При подготовке к контрольному занятию следует повторить следующие темы:**

- Шигеллы
- Сальмонеллы
- Эшерихии
- Холерный вибрион
- *Helicobacter pylori*

**При подготовке рекомендуется придерживаться следующего плана:**

1. Таксономия возбудителя: семейство, род, вид, биовары, серовары (при наличии).
2. Морфо-биологические особенности возбудителя.
3. Эпидемиологическая характеристика вызываемых заболеваний (источники инфекции, механизм, пути и факторы передачи, восприимчивый коллектив)
4. Патогенез вызываемых заболеваний, основные клинические проявления, особенности иммунитета.
5. Лабораторная диагностика: исследуемый материал, применяемые методы диагностики.
6. Специфическая профилактика и терапия (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины).

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Неспецифическая профилактика заболеваний, вызываемых шигеллам.
2. Классификация и морфо-биологические свойства шигелл.
3. Факторы вирулентности шигелл.
4. Особенности экологии, эпидемиологии и патогенеза заболеваний, вызываемых шигеллами.
5. Материалы и методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых шигеллами.
6. Специфическая терапия бактериальной дизентерии.

### **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ВОЗБУДИТЕЛИ ШИГЕЛЛЕЗА:
  - 1) требуют для роста добавления в среду витаминов;
  - 2) требуют для роста добавления в среду аминокислот;
  - 3) требуют для роста добавления в среду крови или сыворотки;
  - 4) требуют для роста добавления в среду холестерина;
  - 5) не требовательны к питательным средам;
2. ФАКТОР ПАТОГЕННОСТИ ШИГЕЛЛ:
  - 1) белок инвазии;
  - 2) холероген;
  - 3) жгутики;
  - 4) эритрогенный токсин;
  - 5) уреазы;
3. ВОЗБУДИТЕЛИ ШИГЕЛЛЕЗА ОТНОСЯТСЯ К РОДУ:
  - 1) *Escherichia*;
  - 2) *Shigella*;
  - 3) *Salmonella*;
  - 4) *Yersinia*;
  - 5) *Klebsiella*;
4. ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ШИГЕЛЛЕЗЕ:
  - 1) пожизненный;
  - 2) нестерильный, клеточный;
  - 3) мало напряженный, непродолжительный, стерильный;
  - 4) не формируется;
  - 5) гуморальный;
5. *SHIGELLA FLEXNERI* ВЫЗЫВАЕТ:
  - 1) чуму;
  - 2) дифтерию;
  - 3) дизентерию;
  - 4) возвратный тиф;
  - 5) бруцеллез;
6. ДИЗЕНТЕРИН:
  - 1) анатоксин;
  - 2) вакцина;

- 3) эндотоксин;
  - 4) аллерген;
  - 5) иммуномодулятор;
7. ШИГЕЛЛЕЗ:
- 1) зоонозная инфекция;
  - 2) трансмиссивная инфекция;
  - 3) антропонозная кишечная инфекция;
  - 4) суперинфекция;
  - 5) регистрируется только у иммунокомпromетированных лиц;
8. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ШИГЕЛЛЕЗА В ОЧАГЕ:
- 1) вакцинация;
  - 2) антибиотики;
  - 3) соблюдение личной гигиены;
  - 4) диета;
  - 5) бактериофаг;
9. ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ШИГЕЛЛЕЗА В ОЧАГЕ ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) вакцины;
  - 2) антибиотики;
  - 3) бактериофаги;
  - 4) пробиотики;
  - 5) витамины;
10. СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО ПОСЕВА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ШИГЕЛЛЕЗА:
- 1) ЖСА, КА;
  - 2) Плоскирева, Эндо;
  - 3) сывороточный агар;
  - 4) шоколадный агар;
  - 5) МПА;
11. ИСТОЧНИКИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ШИГЕЛЛЕЗЕ:
- 1) домашние животные;
  - 2) мухи;
  - 3) «грязные» руки;
  - 4) больные, бактерионосители;
  - 5) молочные продукты, вода;
12. ПРИ ПОСТАНОВКЕ КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ ДИЗЕНТЕРИН ВВОДЯТ:
- 1) наочно;
  - 2) внутрикожно;
  - 3) подкожно;
  - 4) внутримышечно;
  - 5) внутривенно;

### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. У больного, поступившего в стационар с предварительным диагнозом «Острая кишечная инфекция» результаты бактериологического исследования оказались отрицательными, при постановке РНГА с сывороткой обследуемого была установлена хроническая дизентерия, обусловленная *S.sonnei*

**Вопрос 1:** Какой специфический препарат необходимо применить для лечения;

**Вопрос 2:** На что будет направлено его действие;

- 1) Для лечения необходимо будет использовать инактивированную лечебную дизентерийную вакцину из *S.flexnera* и *S.sonnei*;
- 2) Действие ее будет направлено на стимулирование иммуногенеза, для перевода хронической формы дизентерии в острую;

2. Больной, поступивший в инфекционное отделение, жаловался на боли в животе, ложные позывы на дефекацию (тенезмы), высокую температуру до 38,8°C и общую слабость. Накануне употреблял в пищу свежую клубнику, купленную на рынке, со сливками

**Вопрос 1:** Какую острую кишечную инфекцию можно предположить у этого пациента;

**Вопрос 2:** Какие виды возбудителей чаще всего вызывают эту инфекцию;

**Вопрос 3:** Какой материал и метод диагностики подтвердит клинический диагноз;

- 1) Острый шигеллез;
- 2) *S.flexneri* и *S.sonnei*;
- 3) Испражнения и бактериологический метод;

### 8. Рекомендованная литература по теме занятия

- **обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

**- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Борисов, Л. Б. [Медицинская микробиология, вирусология, иммунология](#) : учебник / Л. Б. Борисов. - 5-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2016. - 785 с. - Текст : электронный.

Лелевич, С. В. [Клиническая микробиология](#) : учебное пособие для вузов / С. В. Лелевич, О. М. Волчкевич, Е. А. Сидорович. - 2-изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 308 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство](#) : учебное пособие / ред. А. С. Быков, В. В. Зверев. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2018. - 416 с. : ил. - Текст : электронный.

[Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии](#) / ред. А. А. Воробьев, А. С. Быков. - 3-е изд., испр. - Москва : Медицинское информационное агентство, 2022. - 272 с. : ил. - Текст : электронный.

### 1. Тема № 13. Микробиологическая диагностика дифтерии.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): В результате внедрения в практику активной иммунопрофилактики против дифтерии на территории РФ и в других странах мира заболеваемость дифтерией снизилась до единичных случаев. Тем не менее, в 90-х годах прошлого столетия на территории нашей страны вновь началась эпидемия дифтерии. Основными причинами возникновения неблагоприятной эпидемической ситуации по дифтерии к 1990 г. явились: низкий уровень охвата противодифтерийными прививками детей первого года жизни; необоснованное широкое внедрение щадящих методов иммунизации с использованием АДС-М анатоксина; удлинение интервалов между ревакцинациями начиная с 1987 г.; утрата иммунитета взрослыми; отказы родителей от прививок детям в связи с негативной информацией в печати о последствиях вакцинации. Усугубили ситуацию приток беженцев, массовая миграция населения, ухудшение социально-экономических условий жизни населения в этот период и др. факторы. Таким образом, к 1994 г. эпидемия охватила 15 республик бывшего СССР, в 1995 г. заболеваемость дифтерией в СССР составила 88% всех случаев дифтерии, зарегистрированной в мире; в период с 1990 по 1999 гг. в СССР зарегистрировано 158 000 случаев дифтерии, и 4000 летальных исходов. Особенностью последней эпидемии в России является изменение возрастной структуры заболевших и более частая регистрация атипичных форм дифтерии, в том числе локализующихся в челюстно-лицевой области. В настоящее время в России осуществляется задача трехэтапной эрадикации дифтерии, состоящей в снижении заболеваемости до спорадических случаев, уменьшении числа бактерионосителей за счет своевременного выявления бактерионосительства у населения и их санации, своевременная микробиологическая диагностика заболевания.

### 3. Цели обучения

- **обучающийся должен знать , уметь** приготовить фиксированные микроскопические препараты из чистых культур микроорганизмов., окрашивать препараты простыми методами и по методу грама., работать с иммерсионной системой., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### 4. Аннотация (краткое содержание темы)

Группа коринеформных бактерий – это собрание родов на уровне семейства, не имеющего таксономического статуса. Она включает Грам (+) микроорганизмы с палочковидными клетками неправильной формы.

Группа входит в порядок *Actinomycetales* семейства *Actinomycetaceae*. Представители его образуют гифы с тенденцией к ветвлению. Наибольшее значение в патологии человека имеют представители двух родов:

1) *Corynebacterium* (согупе – "булава") – входят неокислостойчивые бактерии.

2) *Mycobacterium* – входят устойчивые к кислотам бактерии.

Род *Corynebacterium* включает:

1. *C. diphtheriae* – возбудитель дифтерии.
2. *C. ulcerans* – возбудитель дифтерии.
3. *C. pseudodiphtheriticum* – ложнодифтерийные палочки Гофмана, комменсал зева и носа.
4. *C. xerosis* – дифтероид, комменсал конъюнктивы глаз, вызывает сухость роговицы.
5. Анаэробные комменсальные коринебактерии.

**История открытия.** В чистой культуре возбудитель выделен в 1884 году Лёффлером, в 1888 году Ру и Иерсен обнаружили у возбудителя дифтерийный экзотоксин, в 1890 году Беринг и Китагато получили против него антиоксическую сыворотку и применили её для лечения больных. В 1923 году Рамон получил из экзотоксина

анатоксин, широко применяемый в качестве вакцины для иммунизации.

### **Морфо-тинкториальные свойства коринебактерий.**

Дифтерийные бактерии Грам (+), тонкие, полиморфные слегка изогнутые или прямые палочки от 1 до 8 мкм длиной, окрашиваются неравномерно - для них характерна метакромазия, что объясняется наличием зерен волютина, расположенных по полюсам клетки. Они же обуславливают вздутия в виде булавы, что учитывают при идентификации коринебактерий. Зерна волютина - полифосфаты. Хорошо образуются на средах, содержащих сыворотку крови. Их выявляют при окраске по методу Нейссера:

1. Фиксированный мазок окрашивают уксусно-кислой синькой Нейссера 1 мин, промывают водой.
2. Обрабатывают раствором Люголя - 30 сек.
3. Не промывая водой, окрашивают везувином или хризоидином 15 сек. Тела бактерий окрашиваются в светло-коричневый цвет, зерна волютина - в тёмно-синий.

При окраске метиленовой синькой Лёффлера (3-5 мин.) - зерна волютина тёмно-синие, тела бактерий - голубые. Выявляют их также с помощью люминесцентной микроскопии при окраске корифосфином.

Возбудители дифтерии располагаются под углом в виде римской цифры V, разведенных пальцев, т.к. имеют "щелкающее" деление. Встречаются кокковидные ветвистые, нитевидные формы. Ложнодифтерийные палочки мноморфные, прямые, располагаются часто в виде частокола. Дифтероиды по морфологии почти не отличаются от возбудителя дифтерии. *C. ulcerans* чаще располагаются палисадно.

### **Культуральные свойства.**

Коринебактерии дифтерии - факультативные анаэробы. Оптимальная  $T^0$  роста = 36-37<sup>0</sup>, рН среды - 7,2,-7,6. Культивируют на средах с нативным белком - в среде Ру (свернутой лошадиной сыворотке), среде Лёффлера (перед свертыванием сыворотки добавляют 1/4 часть бульона с 1% глюкозой). Через 8-12 часов на этих средах вырастают мелкие, круглые колонии. Для выделения чистой культуры используют теллуритовые среды: Клауберга, кровяно-теллуритовый агар. Дифтерийные бактерии восстанавливают теллурит калия до металлического теллура и растут в виде сухих чёрных или тёмно-серых колоний. На среде Бучина с хинозолом, цистином, 5% крови и индикатором водным голубым колонии *C. diphtheriae* образует синие колонии. Теллурит калия и хинозол задерживают рост комменсальной кокковой флоры. Для накопления чистой культуры используют 10-20% сывороточный агар.

**Характеристика биоваров *C. diphtheriae*.** По культуральным и биохимическим свойствам *C. diphthrae* делятся на 2 биовара:

Биовар *gravis* - на кровяно-теллуритовом агаре образует серо-черные колонии R-формы с радиальной исчерченностью; на сывороточном бульоне растет в виде крошащейся пленки; разлагает крахмал, гликоген, декстран, гемолиза не дает.

Биовар *mitis* - на кровяно-теллуритовом агаре образует S-форму колоний. Колонии черные, выпуклые с ровными краями. На бульоне дает равномерное помутнение, не ферментирует крахмал, гликоген, декстран, дает гемолиз,

Биовар *intermedius* - в настоящее время не выделяют в качестве самостоятельного биовара, включен в состав биовара *gravis*, дает более мелкие колонии черного цвета, SR-формы, в бульоне помутнение, крошковатый осадок; не ферментирует крахмал и гликоген; не дает гемолиза.

**Ферментативные свойства.** Дифтерийные бактерии разлагают до кислоты без газа глюкозу, мальтозу, галактозу, не ферментируют сахарозу, мочевины (отрицательная проба Закса); разлагают цистин (положительная проба Пизу).

Проба Закса. На среде с мочевиной и фенолфталеином через 30 мин. инкубации в термостате отсутствует покраснение, за исключением *C. ulcerans*.

Проба Пизу. При посеве уколом в столбик среды с добавлением цистина наблюдается почернение среды по ходу роста, т.к. *C. diphthrae* расщепляет цистин с образованием сероводорода, т.е. дает положительную пробу Пизу.

### **Факторы вирулентности и патогенности**

*C. diphtheriae* продуцирует мощный экзотоксин - основной фактор патогенности.

Токсигенные коринебактерии всех вариантов продуцируют идентичный токсин.

Дифтерийный токсин относится к сильнодействующим бактериальным токсинам и уступает только ботулиническому и столбнячному токсинам. Минимальная летальная доза токсина на кг массы тела человека

составляет 100 нг.

Способность к токсинообразованию проявляют не все *C. diphtheriae*. Токсигенными являются лишь лизогенные штаммы *C. diphtheriae*, инфицированные бактериофагом, несущим tox-ген, кодирующий структуру токсина. Элиминация, т.е. удаление умеренного фага, ведет к утрате токсинообразования. Экспериментально доказана возможность лизогенной конверсии нетоксигенных дифтерийных бактерий. Однако в организме это считают мало вероятным, т.к. в нем должны быть токсигенные, нетоксигенные штаммы и умеренные фаги.

Нетоксигенные штаммы не вызывают развитие заболевания.

Характеристика токсина. Это термолабильный, высокотоксичный, иммуногенный белок, инактивируемый антитоксической сывороткой. Токсин имеет тропность только к определенным видам клеток. Токсин, поступивший в клетку, становится недостижимым для действия антитоксической сыворотки.

Токсин состоит из компонентов А и В. Компонент В фиксируется на клетках слизистой оболочки или кожи. Клетки поглощают молекулу токсина путем эндоцитоза. В кислой среде эндосом (фаголизосом) дисульфидные связи, объединяющие оба компонента, разрушаются, фрагмент В взаимодействует с мембраной эндосомы, облегчая проникновение фрагмента А в цитоплазму.

Механизм цитотоксического действия. Мишень дифтерийного токсина – фактор элонгации 2 – это трансфераза, ответственная за наращивание (элонгацию) полипептидной цепи на рибосоме. Дифтерийный токсин катализирует ряд биохимических реакций, результатом которых является АДФ-рибозилирование фактора элонгации 2. Фактор элонгации 2 (после связывания с АДФ-рибозой) становится полностью неактивен и теряет способность связываться с рибосомами и участвовать в синтезе белка. Т.о., токсин ингибирует белковый синтез, кроме того, блокирует процессы тканевого дыхания. Это приводит к гибели клеток.

В миокарде происходят структурные и функциональные нарушения, способные вызвать смерть больного. Результат действия токсина на нервную ткань – демиелинизация нервных волокон, часто приводящая к параличам и парезам. Еще одна точка приложения токсина – поражение адреналовой системы.

Другие факторы патогенности:

Адгезины – облегчают адгезию к эпителию слизистой оболочки. Расположены на поверхности клеточной стенки.

Нейраминидаза – расщепляет гликопротеины, проявляя тем самым диффузионную активность. Поэтому ее рассматривают как фактор распространения.

Гиалуронидаза – расщепляет гиалуроновую кислоту тканей. Следствием этого является повышение проницаемости кровеносных сосудов, выход плазмы и отек тканей.

Некротоксин (дерманекротизин) – вызывает некроз клеток в месте локализации возбудителя.

Корд-фактор – способствует разрушению цитоплазматических митохондрий и, как следствие, нарушению клеточного фосфорилирования и тканевого дыхания.

Антифагоцитарный фактор – выполняет экранирующую роль против антибактериальных механизмов опсонофагоцитарной системы макроорганизма.

*Примечание:* на наличие последних трех факторов патогенности указывают не все авторы.

### **Методы изучения токсигенности дифтерийных культур.**

Илек и Оухтерлони предложили проверять токсигенность культур реакцией преципитации в геле. Возможна проверка токсигенности на 9-дневных эмбрионах и культурах тканей по ЦПД. В некоторых случаях используют для определения токсигенности биопробу: к дифтерийному экзотоксину очень чувствительные морские свинки. Их используют для определения токсигенности дифтерийных культур подкожными и внутрикожными методами. Внутрикожный метод позволяет у одной морской свинки изучить несколько штаммов до появления некроза. При подкожном введении дифтерийных бактерий свинки погибают на 2-5 день.

### **Экология, особенности эпидемиологии, патогенеза, иммунитета при дифтерии.**

Источник инфекции – человек. Наибольшую эпидемическую опасность представляют больные лица. Реконвалесценты выделяют дифтерийную палочку в течение 15-20 сут. Кроме того, источниками инфекции могут быть носители токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Пути передачи возбудителя. Возбудители выделяются от больного или носителя со слизью носоглотки при кашле и чихании, поэтому основной путь передачи – воздушно-капельный, реже воздушно-пылевой, контактный.

Патогенез поражений. Наиболее восприимчивы к инфекции дети от 1 года до 5-6 лет.

Входные ворота для возбудителя – слизистые оболочки ротоглотки (98%), иногда глаз, половых органов (чаще у женщин), поврежденные кожные покровы. Дифтерийная палочка колонизирует ткани в месте внедрения. Продуцируемые факторы патогенности вызывают коагуляционный некроз эпителия, расширение и переполнения кровью кровеносных сосудов слизистой оболочки. Повышение проницаемости сосудистой стенки приводит к выпотеванию жидкого экссудата, содержащего фибриноген. Фибриноген, под влиянием тромбина, освобождаясь при некрозе клеток, свертывается и превращается в сетку фибрина. Так образуется фибриновая пленка, обуславливая развитие местного *фибринозного воспаления*.

Следует учитывать, что тип воспаления зависит от строения слизистых оболочек. Например, в однослойном цилиндрическом эпителии дыхательных путей некрозу подвергается лишь эпителиальный слой; образующаяся пленка непрочно связана с подлежащей тканью и относительно легко отделяется от нее. Это так называемое *крупозное воспаление*. На многослойном плоском эпителии (полость зева, глотки) образуется фибриновая пленка, плотно спаянная с прилежащими тканями. Подобный тип поражений известен как *дифтеритическое воспаление*. Разрастание плёнок, увеличение отека и переход процесса на воздухоносные пути могут вызвать асфиксию.

Гистотоксин, попадая в лимфу и кровь вызывает токсинемию. Системные проявления обусловлены действием токсина на сердце и сосуды, нервную систему (преимущественно периферические симпатические узлы), надпочечники и почки.

Иммунитет. Грудные дети дифтерией практически не болеют, т.к. у них сохраняется пассивный иммунитет, полученный от матери.

Постинфекционный иммунитет антибактериальный и антитоксический. В случае применения с лечебной целью антитоксической сыворотки иммунитет нестойкий, поэтому реконвалесценты подлежат вакцинации в общем порядке.

Поствакцинальный иммунитет – только антитоксический (т.к. вакцина содержит анатоксин).

### **Методы определения антитоксического иммунитета.**

Для выявления антитоксического иммунитета используют внутрикожную пробу Шика (нейтрализация токсина антитоксином). При введении 1/40 DLM дифтерийного токсина внутрикожно в предплечье появляется покраснение и припухлость в случае отсутствия антитоксина. При наличии антитоксина воспалительные проявления отсутствуют. Недостатком пробы является её *качественный* характер.

Для определения *количества* АТ в настоящее время предпочитают использовать РПГА с сывороткой обследуемых. Защитный титр 1:20 и выше.

### **Материал и методы микробиологической диагностики дифтерии.**

Цель микробиологической диагностики дифтерии – подтверждение диагноза и дифференцирование от клинических сходных заболеваний, а также выявление бактерионосителей.

Бактериологический метод.

Бактериологический метод является основным – "золотой стандарт". Целью его является выделение возбудителя, идентификация, определение токсигенности, серовара и биовара. Исследуют в зависимости от локализации процесса: слизь из носа, зева, отделяемого глаза, уха, половых органов, раны. При обследовании на бактерионосительство слизь из зева и носа берут двумя стерильными тампонами отдельно. Из зева слизь берут до чистки зубов, приема лекарств, натошак или через два часа после еды. При этом, не касаясь корня языка, щек, зубов, материал забирают на границе пораженной и здоровой части. В случае транспортировки более 2-3 часов забирают тампоном, увлажненным 5% раствором глицерина или 2% раствором теллурита калия, а также сывороточным или сывороточно-теллуритовым тампоном. Для обогащения возможен посев на сывороточный полужидкий агар, среду Пизу.

*Этапы исследования, идентификация видов коринебактерий и биоваров возбудителей дифтерии.* Предварительная бактериоскопия мазка с тампона не проводится, либо проводится только по требованию врача и при условии, что материал забирают двумя тампонами.

**1 этап.** Материал тампоном отдельно из носа и зева засевают на 1/2 чашки с элективными и дифференциально-

диагностическими средствами КТА, Клауберга или среду Бучина. Тампоном делают площадку, затем засевают штрихами на остальную поверхность среды. Инкубируют при T=37° 24-48 часов.

**2 этап.** 3 день. Отбирают колонии подозрительные на дифтерийные. Из сомнительных колоний делают мазки. Колонии пересевают на 10% сывороточный агар для выделения чистой культуры. Параллельно ставят пробу Пизу на цистиназу (определение вида) и РП в геле (определение токсигенности).

При отсутствии подозрительных колоний через 48 часов выдается окончательный отрицательный ответ.

**3 этап.** 4 день.

1. Учитывают результаты пробы Пизу и РП в геле из характерных колоний первичного посева. Если проба Пизу (+), РП (+), то выдается предварительный ответ *C. diphtheriae* tox+.
2. Микроскопируют 2 мазка. Один окрашивают по Граму, второй по Нейссеру или метиленовой синькой Лёффлера. Определяют принадлежность к роду коринебактерий по морфологии и окраске.
3. Для изучения биохимических свойств (определение вида и биовара) делают посев на пестрый ряд: глюкозу, мальтозу, сахарозу, крахмал, для определения уреазной активности – посев на среду с мочевиной (проба Закса), для определения цистиназной активности – на среду с цистином (проба Пизу).
4. Определяют токсигенность: РП в геле с выделенной культурой и антитоксической сывороткой.

**Определение токсигенности.** РП в геле по Оухтерлони. На середину чашки с фосфатно-пептонным агаром или сывороточным агаром помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную 0,25 мл антитоксической сыворотки, содержащей 500 МЕ в 1мл. Бляшками 0,6-0,7 см засевают исследуемые культуры (на расстоянии 0,6 – 0,7 см друг от друга и 0, 5 см от края полоски) и контрольную заведомо токсигенную культуру *C.diphtheriae v.gravis* № 665. Учет производится через 24 и окончательно через 48 часов. Культура считается токсигенной, если ее линии преципитации сливаются в виде дуги с линией преципитации контрольного штамма.

В случае получения сомнительного результата о токсигенности культуры можно использовать ПЦР для определения у выделенной культуры генома, кодирующего синтез токсина.

На этом этапе изучают антигенные свойства и определяют серовар культуры в РА на стекле с поливалентной, затем с типовыми агглютинирующими дифтерийными сыворотками.

**4 этап .** 5 день. Учет биохимических свойств – дифференцировка от дифтероидов, определение вида и биовара. Определение токсигенности культуры.

Ферментативные свойства некоторых видов коринебактерий

Виды	Расщепление до кислоты			Цистиназа	Уреаза
	Глюкоза	Сахароза	Крахмал		
<i>C. diphtheriae</i>	+	-	+	+	-
<i>v. gravis</i>	+	-	-	+	-
<i>v. mitis</i>					
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-	-	+
<i>C. xerosis</i>	+	+	-	-	+
<i>C. ulcerans.</i>	+	-	+	+	+

Серодиагностика дифтерии. При отрицательном результате бактериологического метода исследования может использоваться серологический метод диагностики. Серологический метод – ретроспективный со 2-3 недели заболевания. Исследуют парные сыворотки больных в РА и РНГА. В сыворотке крови больных и носителей токсигенных дифтерийных штаммов в РНГА выявляют антитоксины. Ответ через 1,5-2 часа.

Ускоренные методы диагностики.

Люминисцентная микроскопия. Препараты из исследуемого материала обрабатывают корифосфином. Тела бактерий желтовато-зеленые, зерна волютинина – оранжево-красные.

Метод Фольгера. Исследуемый материал забирают двумя тампонами со свернутой при

температуре 80<sup>0</sup> С сывороткой. Через 3-4 часа инкубации в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С с одного из тампонов делают мазки и микроскопируют, второй тампон отправляют для посева.

Метод Пергола. Пленки в зеве снимают тампоном, пропитанным 2% теллуридом калия. Через 3-10 минут пленки чернеют.

### **Специфическая профилактика и терапия дифтерии.**

В основе специфической профилактики и терапии дифтерии лежит создание анитоксического иммунитета. Плановую активную иммунопрофилактику дифтерии проводят вакциной АКДС с 3 месяцев. Вакцина содержит дифтерийный анатоксин. Вакцинацию проводят троекратно с интервалом в 30-40 дней, затем через 5-7 лет (по календарю прививок) проводят ревакцинацию АДС, АДС-М, либо АД-анатоксином. АДС-М-анатоксин со сниженным содержанием антигенов используют для иммунизации детей, имеющих противопоказания к введению АКДС вакцины и детей с аллергической реактивностью.

Экстренную пассивную иммунотерапию проводят введением от 10 тыс. до 350 тыс. МЕ анитоксической противодифтерийной сыворотки в зависимости от тяжести заболевания для нейтрализации экзотоксина.

### **Неспецифическая профилактика. Санация бактерионосителей.**

В случае выявления заболевания проводят текущую и заключительную дезинфекцию. Для элиминации возбудителя у носителей назначают антибиотикотерапию в сочетании с сульфаниламидами. Медперсоналу с целью неспецифической профилактики дифтерии рекомендовано использовать средства индивидуальной защиты - ношение масок, перчаток.

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Классификация и морфобиологические особенности возбудителя дифтерии.
2. Фактор патогенности возбудителя дифтерии, его значение в патогенезе заболевания.
3. Источники инфекции, пути заражения, особенности патогенеза и иммунитета при дифтерии.
4. Определение анитоксического иммунитета при дифтерии (РНГА).
5. Материал и методы микробиологической диагностики дифтерии.
6. Цель, техника постановки и оценка результатов РП в геле при диагностике дифтерии.
7. Специфическая профилактика и терапия дифтерии.

### **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. БИОВАРЫ MITIS И GRAVIS КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДИФТЕРИИ ОТЛИЧАЮТСЯ ПО:
  - 1) морфологии и окраске по Граму;
  - 2) биохимическим свойствам;
  - 3) антигенным свойствам;
  - 4) тяжести вызываемых заболеваний;
  - 5) токсигенности;
2. ОСНОВНОЙ ФАКТОР ВИРУЛЕНТНОСТИ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДИФТЕРИИ:
  - 1) эндотоксин;
  - 2) капсула;
  - 3) экзотоксин;
  - 4) анатоксин;
  - 5) гиалуронидаза;
3. МЕХАНИЗМ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТОКСИНА ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ:
  - 1) блокирует аденилатциклазу энтероцитов;
  - 2) блокирует фактор элонгации-2;
  - 3) подавляет фагоцитоз;
  - 4) блокирует нервные импульсы;
  - 5) лизирует эритроциты;
4. ТОКСИГЕННОСТЬ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДИФТЕРИИ ОБУСЛОВЛЕНА:
  - 1) цистиназой;
  - 2) умеренным бактериофагом;
  - 3) антигенной структурой;
  - 4) анитоксическим иммунитетом;
  - 5) факторами внешней среды;
5. ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ПРИ ДИФТЕРИИ:
  - 1) трансмиссивный, орально-оральный;
  - 2) трансплацентарный, половой;
  - 3) воздушно-капельный, контактный;
  - 4) контактный, алиментарный;

- 5) воздушно-пылевой, воздушно-капельный;
6. ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ПРОТИВОДИФТЕРИЙНОГО ИММУНИТЕТА IN VITRO ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) РП в геле с исследуемой культурой;
  - 2) РА с сывороткой обследуемого;
  - 3) РА с диагностическими противодифтерийными сыворотками;
  - 4) пробу Шика;
  - 5) РНГА с сывороткой обследуемого;
7. ЦЕЛЬ ПОСТАНОВКИ РП В ГЕЛЕ ПРИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ НА ДИФТЕРИЮ:
- 1) определение лечебной дозы антитоксической сыворотки;
  - 2) изучение антигенного строения возбудителя;
  - 3) экспресс-диагностика заболевания;
  - 4) определение токсигенности культуры;
  - 5) определение антитоксического иммунитета;
8. НАДЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ДИФТЕРИИ ОБЕСПЕЧИВАЕТ:
- 1) вакцинация;
  - 2) прием антибиотиков;
  - 3) соблюдение правил личной гигиены;
  - 4) ношение маски;
  - 5) занятие спортом;
9. ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ДИФТЕРИИ ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) антибиотики;
  - 2) антитоксическую сыворотку;
  - 3) токсин Шика;
  - 4) анатоксин;
  - 5) антимикробную сыворотку;
10. ПРИ НАЛИЧИИ В ИССЛЕДУЕМОМ МАТЕРИАЛЕ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДИФТЕРИИ ОКОНЧАТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ МОЖЕТ БЫТЬ ПОЛУЧЕН ЧЕРЕЗ:
- 1) 6-12 ч;
  - 2) 12-24 ч;
  - 3) 24-48 ч;
  - 4) 48-72 ч;
  - 5) 7 дней;

#### 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. У больного с подозрением на дифтерию были взяты мазки из носа и зева, произведен посев на кровяно-теллуритовый агар (КТА). На КТА в посеве из зева получены черные колонии округлой формы с ровными краями. При микроскопии обнаружены Грам+ палочки, расположенные под углом друг к другу, имеющие зерна волютина. Биохимические свойства: ферментируют глюкозу до кислоты, не расщепляют крахмал, не образуют уреазу, проба Пизу положительна.

**Вопрос 1:** Определите, к какому биовару относится выделенная культура *C. diphtheriae*.;

**Вопрос 2:** Какие еще исследования являются обязательными при бактериологической диагностике дифтерии?;

1) Выделенная культура относится к *C. diphtheriae* биовар *mitis*.;

2) При бактериологической диагностике дифтерии для подтверждения диагноза необходимо исследование токсигенности выделенной культуры. Исследование проводится в реакции преципитации с антитоксической противодифтерийной сывороткой.;

2. В одном из классов средней школы зарегистрировано три случая заболевания дифтерией.

**Вопрос 1:** Как проверить наличие антитоксического противодифтерийного иммунитета у контактных школьников?;

**Вопрос 2:** Как установить источник инфекции?;

**Вопрос 3:** Какие препараты применяют для специфической профилактики дифтерии? Кто подлежит вакцинации в данном случае?;

1) Поставить РПГА с сыворотками контактных детей и эритроцитарным антигенным диагностикумом. Титр антитоксических антител при наличии иммунитета должен быть не менее 1:40.;

2) Выявить носителей токсигенных штаммов бактериологическим методом.;

3) Для специфической профилактики дифтерии у школьников применяется вакцина АДС-М, содержащая дифтерийный анатоксин. Вакцинации подлежат все непривитые контактные, а также те, у которых титр антитоксических антител составляет менее 1:40.;

3. Ребенок поступил в стационар с предварительным диагнозом «Дифтерия зева».

**Вопрос 1:** Какой материал подлежит исследованию?;

**Вопрос 2:** Какие методы экспресс-диагностики необходимо применить для подтверждения диагноза?;

**Вопрос 3:** Какой препарат для специфической терапии применяют при подтверждении диагноза? Тактика применения данного препарата?;

- 1) Слизь из зева и носа, пленки с миндалин.;
- 2) Определение дифтерийного токсина в сыворотке крови больного с помощью РПГА с антительным эритроцитарным антитоксическим диагностикумом или ИФА.;
- 3) Для нейтрализации токсина необходимо назначить антитоксическую противодифтерийную лошадиную сыворотку. Способ введения - дробно по методу А.М. Безредки с предварительной внутрикожной пробой на чувствительность. Проба ставится с 0,1 мл разведенной 1:100 сыворотки и учитывается через 20-30 мин. Проба является отрицательной, если диаметр папулы в месте введения сыворотки не превышает 10 мм. При отрицательной кожной пробе неразведенная сыворотка вводится в объеме 0,1 мл подкожно в область средней трети плеча. При отсутствии местной и общей реакции через  $45 \pm 15$  мин всю назначенную дозу сыворотки вводят внутримышечно в передне-наружную поверхность бедра или в ягодицу. При положительной внутрикожной пробе сыворотку вводят только по жизненным показаниям под наблюдением врача.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 14.** Микробиологическая диагностика туберкулеза.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Значение темы: В последние годы в Красноярском крае заболеваемость туберкулезом перешагнула эпидемический порог (1,5%) и составляет 3,2-3,4%, т.е. в два раза выше эпидпорога. Ситуация усугубляется тем, что первичная лекарственная устойчивость возбудителя составляет около 49%, часто выявляется множественная лекарственная устойчивость. На фоне проведенного лечения лекарственная устойчивость достигает 74-78%. Смертность от туберкулеза за последние десятилетия увеличилась в 3,9 раза. По Сибирскому региону 80% смертности от всех инфекционных заболеваний составляет смертность от туберкулеза.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** работать с иммерсионной системой., учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агаре и методом серийных разведений., самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, работать с увеличительной техникой, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, навыками микроскопирования с иммерсионной системой светового микроскопа, интерпретации результатов микробиологических исследований, оценки результатов серологических реакций, полимеразной цепной реакции, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Классификация и морфо-биологические свойства возбудителей туберкулеза.**

Отдел *Firmicutes*, порядок *Actinomycetales*, семейство *Mycobacteriaceae*, род *Mycobacterium*.

Виды:

1. *M. tuberculosis* - вызывает 95% случаев туберкулеза у человека.

2. *M. bovis* - 5% случаев туберкулеза у человека - эпидемическую опасность для человека представляют крупный рогатый скот, верблюды, козы, овцы, свиньи, собаки и кошки. Больные животные выделяют микобактерии с молоком, мокротой, мочой и калом. В сливочном масле возбудитель может сохраняться до 240 суток, в сыре до 200 суток.

3. *M. africanum* - основной возбудитель туберкулеза в Африке.

#### **Морфология и тинкториальные свойства.**

Возбудитель туберкулеза был открыт Р. Кохом в 1882 году. В связи с этим *M. tuberculosis* называют иногда палочкой Коха. Это тонкая, прямая или слегка изогнутая палочка, размером 1-10x0,2-0,6 мкм. Бактерии способны образовывать L-формы, сохраняющие способность к инфицированию. Спор и капсул не образуют, неподвижны. Гр(+). Отличительная особенность - высокое содержание липидов, фосфатидов и восков в клеточной стенке.

Для выявления и идентификации используют специальный метод окраски - Циля-Нильсена. Принцип метода. Агрессивное окрашивание. Благодаря высокому содержанию в клеточной стенке восков и липидов микобактерии являются кислотоустойчивыми, поэтому при окраске фуксином не обесцвечиваются после обработки кислотой, сохраняя розовую окраску.

Большое содержание в клеточной стенке липидов и восков обуславливает:

1. Устойчивость к кислотам, щелочам и спирту.
2. Трудную окрашиваемость красителями.
3. Относительно высокую устойчивость к высушиванию и действию солнечных лучей. При высушивании сохраняется до нескольких недель. Прямой солнечный свет убивает *tuberculosis* через 45-55 минут,

рассеянный через 8-10 суток.

4. Устойчивость к действию дезинфицирующих средств: Обычные химические дезинфектанты мало эффективны; 5% р-р фенола убивает *tuberculosis* через 5-6 часов.
5. Высокую гидрофобность – которая отражается на культуральных свойствах – сухие бородавчатые колонии на твердой питательной среде и ломкая пленка на жидкой питательной среде.
6. Обуславливают патогенность туберкулезных бактерий (см. факторы патогенности).

### **Культуральные свойства.**

Растут очень медленно. Время генерации составляет 16-18 часов (в отличие, например, от кишечной палочки, стафилококков время генерации которых составляет 15-20 минут). Аэробы. Повышенное содержание CO<sub>2</sub> (5-10%) ускоряет рост. Оптимальная температура 37-38<sup>0</sup>С; рН 7,0-7,2. Нуждаются в присутствии белков, глицерина, факторов роста (биотин, никотиновая кислота, рибофлавин и др.). Элективная среда для выращивания – яичная среда с глицерином – Левенштейна-Йенсена; на ней на 14-40 сутки вырастают шероховатые бородавчатые колонии слегка кремового цвета. В жидких средах на 7-10 суток образуется морщинистая пленка, среда прозрачная.

**Источник инфекции** – больной человек, активный бацилловыделитель; иногда сельскохозяйственные животные.

**Основной путь заражения** – воздушно-капельный, реже – контактный через кожу и слизистые, алиментарный, редко – трансплацентарный.

**Резистентность** высокая благодаря большому содержанию в клеточной стенке липидов и восков (следовательно, низкая скорость проникновения веществ в клетку). При высушивании сохраняется до нескольких недель. На предметах – более 3 месяцев, в почве – до 6 месяцев, в воде – более года. Прямой солнечный свет убивает *M. tuberculosis* через 45-55 минут, рассеянный через 8-10 суток. При кипячении погибает через 5 минут. Обычные химические дезинфектанты малоэффективны; 5% р-р фенола убивает *M. tuberculosis* через 5-6 часов. Возбудитель способен быстро вырабатывать устойчивость ко многим антибактериальным препаратам.

### **Факторы патогенности.**

Основными факторами патогенности являются липиды *M. tuberculosis* (составляют до 40% сухого остатка клетки). Липиды *M. tuberculosis* состоят из нейтральных жиров, восков, стеринов, фосфатидов, сульфатидов, жирных кислот таких как фтиоидная, миколовая, туберкулостеариновая, пальмитиновая и др. Именно с ними связаны патогенные свойства туберкулезной палочки и те биологические реакции, которыми ткани отвечают на их внедрение.

Так, например, жирные кислоты (фтиоидная, миколовая, и др.) оказывают токсическое действие на ткани. Фосфатидная фракция (содержащая фтиоидную кислоту) – вызывает специфическую тканевую реакцию с образованием эпителиоидных клеток. Жировая фракция (тоже содержит фтиоидную кислоту) – вызывает образование туберкулоидной ткани. Восковая фракция (содержит миколовую кислоту) – вызывает образование многочисленных гигантских клеток.

Главным фактором патогенности является токсический гликолипид (корд-фактор). Располагается на поверхности и в толще клеточной стенки. По химической природе – полимер, состоящий из трегалозы, миколовой и миколиновой жирных кислот.

1. Корд-фактор оказывает токсическое действие на ткани.
2. Препятствует фагосома-лизосомальному слиянию в фагоците → защищает от фагоцитоза.
3. Блокирует окислительное фосфорилирование в митохондриях макрофагов, тем самым, защищая туберкулезные палочки от фагоцитоза.
4. Подавляет миграцию лейкоцитов в очаг воспаления.
5. Вызывают гибель белых мышей при внутрибрюшинном заражении;

Считается, что *M. tuberculosis*, лишенные корд-фактора, являются непатогенными или слабопатогенными для человека.

**Патогенез.** Считается, что для инфицирования человека достаточно всего 1-2-3 микробных клетки *M. tuberculosis*, достигших альвеол.

При первичном попадании *M. tuberculosis* в легкие или другой орган микроорганизм захватывается макрофагами и переносится в регионарные лимфоузлы.

Фагоцитоз в данном случае незавершенный, т.к. корд-фактор повреждает мембраны митохондрий и ингибирует фагосома-лизосомальное слияние. Кроме того, корд-фактор тормозит миграцию полиморфно-ядерных лейкоцитов в очаг воспаления, в связи с чем при первичном попадании острая неспецифическая воспалительная реакция редко

носит выраженный характер, чаще протекает бессимптомно.

В течение 2-8 недель после первичного заражения, в период внутриклеточного размножения микобактерий, за счет воздействия белковой фракции *M. tuberculosis* в макроорганизме развивается специфическая клеточно-опосредованная гиперчувствительность.

Вследствие этого в участки, где локализуется микроорганизмы, мигрируют иммунокомпетентные лимфоциты. Они вырабатывают хемотаксические факторы, интерлейкины и лимфокины. В ответ на это в эти участки устремляются моноциты, которые трансформируются сначала в макрофаги, а далее в специализированные гистиоцитарные клетки, которые организуются в гранулемы. В центре каждого бугорка имеется участок творожистого некроза (казеоза), в котором располагаются *M. tuberculosis*. Т.о., туберкулезная гранулема представляет собой скопления гигантских многоядерных клеток Пирогова-Лангханса с находящимися внутри них *M. tuberculosis*. Эти клетки окружены эпителиоидными клетками, а по периферии бугорка расположены так называемые лимфоидные клетки.

Несмотря на то, что *M. tuberculosis* продолжают персистировать внутри клеток, их дальнейшее распространение и размножение ограничено. У большинства пациентов (90-95%) первичные туберкулезные очаги подвергаются полному заживлению и кальцификации без видимого дальнейшего развития заболевания. После заживления повышенная чувствительность (ГЧЗТ) исчезает.

Эти гранулемы иногда сохраняются в виде остаточного очага, видимого на рентгенограмме. Комбинацию очага в легких, лимфоузла в корнях легких (лимфаденит) и лимфатического сосуда от очага к лимфоузлу (лимфангоит) называют очагом Гона или комплексом Гона.

У некоторых больных (5-10%) распространение возбудителя не ограничивается уровнем регионарных лимфатических узлов. Микобактерии проникают в кровоток и происходит широкая диссеминация возбудителя. Диссеминация может привести к развитию милиарного туберкулеза, туберкулезного менингита и других проявлений туберкулеза.

Большинство очагов диссеминированного туберкулеза заживает так же, как и большинство первичных очагов в легких, но они остаются потенциальными источниками более поздней реактивации на фоне стресса, иммунодефицита, голодания, тяжелых заболеваний.

**Иммунитет.** Человек обладает достаточно высоким естественным иммунитетом к туберкулезу, характеризующимся выраженными индивидуальными особенностями.

Первичная туберкулезная инфекция сопровождается развитием приобретенного *нестерильного* иммунитета. Иммунитет при туберкулезе гуморально-клеточный. Специфический иммунитет опосредуется Т-лимфоцитами - т.е. преимущественно клеточный (следовательно, его нет у новорожденных). Антигенспецифический иммунитет находится в тесной взаимосвязи с гиперчувствительностью замедленного типа. Противотуберкулезные АТ определяются, но не имеют защитного значения.

**Микробиологическая диагностика.** Для диагностики туберкулеза применяют бактериоскопический, бактериологический, серологический и аллергический методы. Материал для исследования в зависимости от формы заболевания: мокрота, промывные воды бронхов, моча, СМЖ, испражнения, отделяемое свищей и т.д.

*Микроскопический метод.* Для микроскопии используют несколько методов.

1) *Прямая микроскопия* и микроскопия с обогащением. Мазки окрашивают по Цилю-Нильсену. *M. tuberculosis* являются кислотоустойчивыми и окрашиваются фуксином в ярко розовый цвет, а остальные, нестойчивые компоненты мазка - в синий. Микроскопия мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, эффективна только при высокой концентрации микобактерий в исследуемом материале ( $>10^5$ ).

«Обогащение» исследуемого материала используют для увеличения вероятности обнаружения возбудителя. Для обогащения используют метод флотации и центрифугирования. Для этого мокроту сначала необходимо гомогенизировать - к 5 мл мокроты добавляют 5 мл NaOH, смесь встряхивают 15-20 мин до полной гомогенизации. Далее можно центрифугировать и приготовить мазок из осадка, либо произвести флотацию. Флотация: к гомогенизированной мокроте добавляют 2 мл ксилыла или бензола. Встряхивают 15-20 мин. Отстаивают в течение 1 часа. Липофильные углеводороды связываются с микобактериями и в силу своей низкой плотности всплывают на поверхность, образуя сливкообразный слой. Из этого слоя готовят мазок для исследования.

Менее вязкий исследуемый материал (мочу) обогащают центрифугированием без гомогенизации.

2) *Люминесцентная микроскопия* - фиксированный мазок окрашивают смесью аурумина (1:100) и родамина (0,1 г) в течение 15 мин. Обесцвечивают 3% солянокислым спиртом, тщательно промывают водой. Докрашивают водным раствором кислого фуксина. При микроскопии *M. tuberculosis* - золотисто-желтые палочки.

Микроскопия не дает возможности дифференцировать возбудителей туберкулеза от кислотоустойчивых сапрофитов.

Бактериологический метод – основной метод диагностики, чистую культуру получают на яичных средах (Левенштейна-Йенсена). При идентификации учитывают морфологию, тинкториальные свойства, быстроту роста, тип колоний, наиболее благоприятную температуру роста и вирулентность для лабораторных животных. Важными дифференцирующими признаками являются: отсутствие роста на среде с салициловым натрием и ниациновый тест – способность *M. tuberculosis* к синтезу никотиновой кислоты (ниацина).

Достоинства бактериологического метода – точная идентификация возбудителя и определение чувствительности к противотуберкулезным препаратам. *M. tuberculosis* растут медленно, метод требует 1,5 – 3 месяца.

Ранее использовали ускоренный метод диагностики – метод микрокультур Прайса. Из посевного материала делают мазки на узких стеклах. Подсушивают и погружают в свежесцитратную кровь. Через неделю мазок окрашивают по Цилю-Нильсену. Микобактерии образуют микроколонии, которые выглядят в виде жгутов, формирование которых обусловлено наличием у *M. tuberculosis* корд-фактора.

С целью рациональной терапии важно определение чувствительности к противотуберкулезным препаратам, которое проводится методом абсолютных концентраций. Для этого в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием добавляют противотуберкулезные препараты. Интенсивность роста оценивается плюсами:

++++ - сплошной, сливной рост;

+++ - более 100 колоний;

++ - от 50 до 100 колоний;

+ - от 20-50 колоний; ЕК - единичные колонии.

Культуру считают чувствительной к препарату, если выросло менее 20 колоний при обильном росте в контрольной пробирке и устойчивой, если выросло более 20 колоний.

Биологический метод используется в основном для определения вирулентности выделенных культур. В качестве лабораторных животных используют морских свинок. О вирулентности штамма судят по количеству специфических изменений в органах, продолжительности жизни животных, падению веса. Готовят мазки-отпечатки из органов, окрашивают по Цилю-Нильсену, делают посевы на питательные среды.

Серологическая диагностика. Для серодиагностики (выявления АТ) используют ИФА, которая особенно информативна при внелегочных формах.

Аллергологический метод. Т.к. при туберкулезе формируется ГЧЗТ, возможно применение КАП (т.н. реакция Манту). В качестве аллергена используют туберкулин – белковый экстракт культуры *M. tuberculosis*. Вводится внутрикожно, результат учитывают через 48-72 часа. Проба применяется для определения инфицированности *M. tuberculosis* пациента, отбора лиц, подлежащих вакцинации, определения эффективности вакцинации БЦЖ, оценки течения туберкулезного процесса.

*Примечание.* В настоящее время в некоторых случаях рекомендовано вместо туберкулина использовать Диаскин тест, содержащий рекомбинантный белок *M. tuberculosis*.

ПЦР – современный метод диагностики, позволяет идентифицировать геном возбудителя в исследуемом материале (мокроте, промывных водах бронхов и т.д.) и определить устойчивость к химиопрепаратам путем определения генов, отвечающих за резистентность к противотуберкулезным препаратам.

**Профилактика и терапия.** Специфическая профилактика – вакцинация аттенуированным штаммом *M. bovis*; это т.н. бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ). Вакцину вводят внутрикожно всем новорожденным на 5-7 сут (до выписки из родильного дома). Ревакцинацию проводят в возрасте 7, 12, 17, 22 и 27-30 лет лицам с отрицательной реакцией Манту.

Для лечения туберкулеза существуют специальные противотуберкулезные препараты. Их делят на две группы: препараты основного ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол) и препараты резервного ряда (канамицин, протионамид (этионамид), циклосерин, офлоксацин, капреомицин, ПАСК, пипразинамид). Возбудители туберкулеза могут приобретать устойчивость к химиопрепаратам. Лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам делят на несколько видов.

1. *Первичная лекарственная устойчивость* – это устойчивость микобактерий туберкулеза, выделенных от

больного, никогда не принимавшего противотуберкулезные препараты или получавшего такое лечение менее одного месяца.

2. *Приобретенная (вторичная) лекарственная устойчивость* – это устойчивость микобактерий туберкулеза, выделенных от больного туберкулезом, получавшего лечение противотуберкулезными препаратами в течение месяца и более.
3. *Полирезистентность* – это устойчивость микобактерий туберкулеза к любым 2-м и более противотуберкулезным препаратам без одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину.
4. *Множественная лекарственная устойчивость* микобактерий туберкулеза (МЛУ) – это устойчивость к изониазиду и рифампицину одновременно, с наличием или без наличия устойчивости к любым другим противотуберкулезным препаратам.
5. *Широкая лекарственная устойчивость* микобактерий (ШЛУ) – это сочетанная устойчивость к изониазиду, рифампицину, фторхинолону и канамицину (и\или амикацину и\или капреомицину), независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Специфическая профилактика и этиотропная терапия туберкулёза.
2. Материал и методы микробиологической диагностики туберкулёза.
3. Источники инфекции и пути передачи при туберкулезе.
4. Классификация и морфобиологические особенности возбудителей туберкулёза. Факторы патогенности возбудителей туберкулёза.
5. Современная эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу в Красноярском крае. Назовите причины сложившейся эпидемиологической обстановки.
6. Современные аспекты лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза.

## **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ОТЛИЧИТЕЛЬНАЯ ОСОБЕННОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА:
  - 1) высокое содержание липидов в клеточной стенке;
  - 2) высокое содержание нуклеопротеидов;
  - 3) наличие ядра;
  - 4) образование экзо- и эндотоксинов;
  - 5) проникают через неповрежденную кожу;
2. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТУБЕРКУЛЁЗА:
  - 1) экзотоксин;
  - 2) липиды, протеины;
  - 3) гиалуронидаза;
  - 4) эндотоксин;
  - 5) протеины, ЛПС;
3. ОСОБЕННОСТЬ ИММУНИТЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЁЗЕ:
  - 1) врожденный;
  - 2) передается трансплацентарно;
  - 3) нестерильный;
  - 4) антитоксический;
  - 5) стерильный;
4. РЕЗУЛЬТАТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА ВЫДАЮТ:
  - 1) на 4-й день;
  - 2) на 7-й день;
  - 3) через 2 недели;
  - 4) через месяц;
  - 5) через 3-4 месяца;
5. ПЕРВИЧНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА:
  - 1) природная устойчивость;
  - 2) не имеет эпидемиологического значения;
  - 3) выявляется у микобактерий, выделенных от больных, не принимавших противотуберкулезные препараты;
  - 4) выявляется у микобактерий, выделенных от больных, принимавших противотуберкулезные препараты;
  - 5) регистрируется редко;
6. ПРИОБРЕТЕННАЯ (ВТОРИЧНАЯ) ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА:
  - 1) природная устойчивость;
  - 2) не имеет клинического значения;
  - 3) выявляется у микобактерий, выделенных от больных, не принимавших противотуберкулезных препаратов;
  - 4) выявляется у микобактерий, выделенных от больных, принимавших противотуберкулезные препараты;
  - 5) регистрируется редко;
7. КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА МАНТУ ПОЛОЖИТЕЛЬНА У:
  - 1) ВИЧ-инфицированных;
  - 2) больных туберкулезом;

- 3) контактных, вакцинированных;
  - 4) новорожденных;
  - 5) беременных, рожениц;
8. ВАКЦИНА БЦЖ:
- 1) инактивированная корпускулярная;
  - 2) химическая;
  - 3) синтетическая;
  - 4) живая аттенуированная;
  - 5) генноинженерная;

9. ТУБЕРКУЛИН ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) вакциной;
- 2) анатоксином;
- 3) белковой фракцией микобактерий;
- 4) липидной фракцией микобактерий;
- 5) экзотоксином;

**7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. При предварительной микроскопии мазка из мокроты больного, окрашенного по Граму, микобактерии не обнаружены. У больного субфебрильная температура и резко положительная реакция Манту. Рентгеноскопия выявила затемненный участок правой верхней доли легкого.

**Вопрос 1:** Почему окраска по Граму малоинформативна для выявления микобактерий туберкулеза?;

**Вопрос 2:** Каким методом необходимо окрасить мазок?;

**Вопрос 3:** Как увеличить чувствительность микроскопического исследования;

**Вопрос 4:** Какие признаки позволят сделать заключение о принадлежности выявленных бактерий к микобактериям туберкулеза?;

- 1) Микобактерии туберкулеза содержат в клеточной стенке большое количество липидов и восков, поэтому плохо окрашиваются по Граму.;
- 2) Мазок необходимо окрасить методом Циля-Нильсена.;
- 3) Для увеличения чувствительности микроскопического исследования необходимо приготовить препараты из обогащенной мокроты;
- 4) Микобактерии туберкулеза в связи с особенностями строения клеточной стенки являются кислотоустойчивыми. При окраске препарата по Цилю-Нильсену будут обнаружены ярко-красные кислотоустойчивые прямые или слегка изогнутые палочки с гомогенной или зернистой структурой на синем фоне других элементов мокроты.;

2. При рентгеноскопии легких обнаружено темное пятно размером с 10-ти копеечную монету. Реакция Манту положительная. Многократная микроскопия обогащенной мокроты дала отрицательные результаты.

**Вопрос 1:** Возможно ли отсутствие микобактерий в мокроте при туберкулезе легких;

**Вопрос 2:** Какие исследования необходимо провести для уточнения диагноза?;

- 1) Да, возможно. Микобактерии выявляются в мокроте только при открытой форме туберкулеза.;
- 2) Для уточнения диагноза необходимо проведение бактериологического исследования, ПЦР-исследования мокроты; также возможна серодиагностика.;

3. У больного с подозрением на туберкулез легких было проведено микроскопическое исследование мокроты (прямая микроскопия с окраской по Цилю-Нильсену).

**Вопрос 1:** Может ли врач опровергнуть диагноз «Туберкулез легких» на основании отрицательного результата данного исследования? Обоснуйте свой ответ.;

**Вопрос 2:** Назовите более информативный метод микроскопического исследования мокроты при туберкулезе.;

- 1) Нет, т.к. вероятность обнаружения микобактерий туберкулеза в микропрепарате из мокроты при прямой микроскопии зависит от концентрации возбудителя в исследуемом материале. Если в 1 мл мокроты содержится 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> микобактерий, вероятность получения положительного результата составляет 40-50%. При концентрации микобактерий 10<sup>3</sup> и меньше - результаты, как правило, отрицательные.;
- 2) Люминесцентная микроскопия обогащенной мокроты с окраской препаратов флуоресцентными красителями - аурамин, родамином.;

**8. Рекомендованная литература по теме занятия**

**- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

**- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 15.** Морфология и физиология вирусов. Методы лабораторной диагностики вирусных инфекций. Лабораторная диагностика гриппа, клещевого энцефалита.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Бурное развитие вирусологии началось несколько десятилетий назад, хотя впервые вирусы были открыты в 1892 году выдающимся ботаником Д.И. Ивановским. Три главные проблемы выдвинули вирусологию на передний край, имеющий большое теоретическое и практическое значение. 1) Вирусные болезни в настоящее время стали наиболее распространенными среди растений, животных и человека, для борьбы с которыми еще не найдены надежные средства. Ущерб, причиняемый вирусами человеку и хозяйству, не поддается никакому учету. 2) С вирусами связывают развитие различных злокачественных опухолей и болезней крови, что имеет значение в изучении их этиологии, ранней диагностики и лечения. 3) Вирусы это наиболее примитивные организмы и изучение их природы, биологии может пролить свет на происхождение жизни, раскрыть многие ее генетические закономерности. Грипп - это заболевание, поражающее все возрастные группы и ставшее причиной смерти миллионов людей, как, например, во время великих пандемий 1918 - 1919 («испанка»), 1957 - 1958 (азиатский грипп) и 1968 - 1969 годов (гонконский грипп). С 2005 г. в мире активно циркулируют вирусы гриппа птиц H5N1, вызывающие среди людей вспышки, сопровождающиеся высокой смертностью. В 2009-2011 гг. в мире наблюдалась пандемия, вызванная вирусом гриппа свиней. По мнению экспертов, коциркуляция вирусов различных подтипов увеличивает вероятность реассортации, создавая возможность появления новых вариантов вируса, к которым большинство населения не имеет иммунитета. Следовательно, всегда существует потенциальная опасность новой пандемии. Поражая многочисленные группы населения, приводя к значительному росту смертности в группах повышенного риска, увеличивая затраты на медицинскую помощь, грипп тем самым наносит серьезный экономический ущерб и является социальной проблемой. Единственно научно обоснованным способом предупреждения заболевания и его осложнений является иммунизация современными гриппозными вакцинами. По данным ВОЗ, вакцинация предотвращает заболевание гриппом у 80-90% иммунизированных. Кроме того, грипп А возможно предупредить при помощи химиопрепаратов. Поэтому более рациональна сочетанная химио- и вакцинопрофилактика. Клещевой вирусный энцефалит - инфекционное заболевание с поражением оболочек, серого и белого вещества головного и спинного мозга, корешков спинномозговых нервов, периферических нервов. Исходом данной инфекции могут являться паралич и смерть. Высокие показатели заболеваемости клещевым энцефалитом в РФ, частые случаи тяжелого течения болезни и летальных исходов свидетельствуют о недостаточной эффективности мероприятий, направленных на решение проблемы клещевого энцефалита в стране.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

#### **Положение вирусов в общей системе микроорганизмов. Понятия вирусы и вирусоиды.**

Единого определения вирусов нет, что связано с двумя нормами их существования - внеклеточной и внутриклеточной. Вирусы - это автономная генетическая структура, в которой основные жизненные процессы протекают на молекулярном уровне. Наука, всесторонне изучающая вирусы, называется вирусология. В отличие от прокариотов и эукариотов вирусы:

- 1) Содержат только один тип нуклеиновой кислоты.
- 2) Не имеют клеточного строения.
- 3) Не способны к росту и бинарному делению.
- 4) Не имеют собственных метаболических систем.

5) Воспроизводятся за счет одной нуклеиновой кислоты.

6) Используют рибосомы клетки хозяина для синтеза собственных белков, т.к. являются абсолютными паразитами клеток. Как все живые организмы они способны передавать собственную генетическую информацию своему потомству, им присуща изменчивость. Вирусы полиомиелита и табачной мозаики вне клетки могут кристаллизоваться. Эти особенности ставят вирусы между живой и неживой материей.

### **Открытие вирусов. Приоритет отечественных ученых в развитии вирусологии. Достижения и задачи.**

Приоритет в открытии вирусов принадлежит русскому ботанику Д.И. Ивановскому, изучавшему мозаичную болезнь табака. Л.А. Зильбер - автор вирусно-генетической теории происхождения злокачественных опухолей. В 1937 г. Л.А. Зильбер, Е.Н. Левкович, П.М. Чумаков и др. открыли вирусы клещевого энцефалита на Дальнем Востоке, КГЛ, ОГЛ (Крымской и Омской геморрагических лихорадок). М.А. Морозову (1943 г.) принадлежит заслуга разработки сухой оспенной вакцины, А.А. Смородинцеву - живых вакцин против паротита, полиомиелита, гриппа, кори. К достижениям вирусологии относятся ликвидация оспы во всем мире, значительное сокращение заболеваемости полиомиелитом, корью, паротитом, желтой лихорадкой и другими вирусными инфекциями. Однако, по-прежнему ущерб всему человечеству наносят ежегодные эпидемии гриппа, гепатит, арбовирусные и другие инфекции. Разработка новых и совершенствование используемых вакцин для специфической профилактики различных заболеваний будет способствовать снижению их уровня.

### **Классификация вирусов.**

С 1966 г. вопросами классификации и таксономии вирусов ведает Международный Комитет по номенклатуре вирусов. В основу принятой временной классификации положены физические и химические свойства вирусов: тип нуклеиновой кислоты, количество нитей, их молекулярная масса, форма вириона, тип симметрии и число капсомеров, тип хозяина и переносчика или способ передачи, антигенные свойства. Вирусы включены в царство *Vira*. Оно подразделено по типу нуклеиновой кислоты на два подцарства - рибовирусы и дезоксивирусы. Подцарства делятся на семейства, роды и виды. Вирусы позвоночных объединены в 15 семейств, содержащих 32 рода.

### **Морфология и ультраструктура вирусов. Элементарные тельца и внутриклеточные включения.**

#### **Понятия внутриклеточная форма вируса и вирион. Размеры и форма вириона.**

Вирус - это форма, в которой он функционирует внутри клетки-хозяина в виде депротенинизированного генома или суммы фрагментов генома.

Вирион - внеклеточная форма существования вирусов. Размеры их варьируют от 15-18 нм до 30-400 нм. Они могут иметь форму: палочковидную (вирус табачной мозаики), нитевидную (некоторые бактериофаги), сферическую, напоминающую многогранники (аденовирусы, пикорнавирусы и др.), кубовидную (поксвирусы), сперматоидную (большинство бактериофагов).

#### **Ультраструктура. Нуклеиновая кислота, капсид, суперкапсид.**

Вирионы содержат только один тип нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота упакована в белковую оболочку - капсид. Вместе они составляют нуклеокапсид. По химическим свойствам это нуклеопротеид.

Многие сложноорганизованные вирионы имеют внешнюю оболочку - суперкапсид, содержащий липиды и углеводы клетки хозяина. Капсиды состоят из белковых структурных субъединиц - капсомеров.

#### **Типы симметрии.**

По расположению их различают типы симметрии: спиральный, кубический или комбинированный. Число капсомеров у вида постоянно (у вирусов полиомиелита - 60, аденовирусов - 252).

#### **Инфекционность вирусов, антигенные и иммуногенные свойства. Химический состав вирусов.**

С нуклеиновой кислотой связана инфекционность т.е. болезнетворность вируса, от капсида зависят антигенные и иммуногенные свойства вируса. Капсид защищает вирус от неблагоприятных воздействий и обеспечивает адсорбцию вируса на клетке.

Белки капсида устойчивы к протеолитическим ферментам. Внутри капсида содержащиеся гистоноподобные белки связывают его с нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота и белок составляют 50-90%. Белки вирусов построены из 16-20 аминокислот, связанных С и N аминоклупами, в состав внешней оболочки некоторых вирусов входят гликопротеиды. Они входят в состав вирусных гемагглютининов, обуславливающих способность многих вирусов вызывать агглютинацию эритроцитов (орто- и парамикровирусы и др.). По происхождению их подразделяют на три

группы: вирионные, вирусиндуцированные и клеточные. Вирионные ферменты входят в состав вирионов многих ДНК, РНК, содержащих вирусов, к ним относятся ДНК-зависимая РНК-полимераза, протеинкиназа, экзо- и эндонуклеаза, обнаруженные у поксвирусов, протеинкиназа, рибонуклеаза, АТФ-аза - у вирусов группы герпеса; РНК-зависимая РНК-полимераза у орто- и парамикровирусов, обратная транскриптаза у онкорнавирусов. Нейраминидаза - у миксовирусов, гемоллизин - у вирусов паротита, лизоцим - у фагов и т.д. - относятся к вирионным ферментам.

Вирусиндуцированные ферменты закодированы в геноме вируса, а синтез их происходит на рибосомах клетки хозяина. Так синтезируются ДНК-зависимая ДНК-полимераза у поксвирусов и герпесвирусов, РНК-зависимая РНК-полимераза - у пикорнавирусов, тога-, арбо-, орто-, пара-микровирусов. Эти ферменты необходимы для репликации нуклеиновой кислоты вирусов.

По функциональному значению вирусные ферменты подразделяются на две группы:

- Ферменты, участвующие в процессе репликации и транскрипции вирусной нуклеиновой кислоты (репликазы, транскриптазы);
- Ферменты, способствующие проникновению вирусной нуклеиновой кислоты в клетки хозяина и выходу образовавшихся вирионов (нейраминидаза, лизоцим и АТФаза).

### **Методы определения величины вирусов.**

Величину вирусов определяют методами:

- Ультрафильтрации через миллиметровые фарфоровые и коллоидные фильтры с известной величиной пор.
- Ультрацентрифугированием по скорости седиментации вирусов
- Фотографированием в электронном микроскопе, зная увеличение оптики.
- Методом диффузии.

### **Методы изучения морфологии и ультраструктуры вирусов.**

В настоящее время морфологию и структуру вирусов изучают при электронной микроскопии.

Крупные вирусы, видимые при специальных способах окраски в световом микроскопе, получили название элементарных телец (элементарные тельца Пашена - вирус натуральной оспы). Поражая клетки организма, вирусы могут образовывать внутриклеточные включения. Они имеют вид гранул в ядре или цитоплазме клеток. При специальных методах окраски их можно обнаружить в световой микроскоп (тельца Негри при бешенстве, тельца Гварниери при натуральной оспе). Это имеет диагностическое значение.

### **Особенности репродукции вирусов и исход их взаимодействия с клеткой.**

В отличие от прокариотов и эукариотов вирусы не размножаются бинарным делением. Размножение вирусов происходит путем репродукции дизъюнктивно, т.е. путем воспроизведения отдельно их нуклеиновых кислот и синтеза белков с последующей сборкой вирионов в клетке-хозяине.

#### ***I стадия - адсорбция на клетке.***

I стадия - происходит адсорбция вирионов на поверхностных структурах клетки в результате взаимодействия комплементарных рецепторов: на поверхности капсида или суперкапсида вириона они в виде выростов или ворсинок и липопротеидов или мукопротеидов - на клетках животных и человека.

#### ***II стадия - проникновение в клетку.***

Вирионы могут проникать в клетку прямым путем через брешу в оболочке клетки (пикорна- и герпесвирусы) или путем пиноцитоза, когда образующаяся в месте адсорбции пиноцитарная вакуоль "втягивает" вирион внутрь клетки.

#### ***III стадия - дезинтеграция вириона.***

Происходит освобождение вирусной нуклеиновой кислоты от внешней оболочки и капсида. Так, полиовирусы теряют белки капсида во время адсорбции и проникновения в клетку с помощью протеаз клетки-хозяина.

#### ***IV стадия - синтез вирусных белков и НК.***

ДНК-содержащие вирусы реализуют генетическую информацию по схеме: ДНК - транскрипция иРНК - трансляция белка вируса на рибосомах хозяйской клетки. Для образования иРНК они могут использовать клеточную РНК-полимеразу (если транскрипция происходит в ядре) или клеточную РНК-полимеразу (если транскрипция

происходит в цитоплазме).

У РНК-вирусов репликация нуклеиновой кислоты происходит тремя путями:

- 1) +РНК выполняет роль иРНК и служит матрицей для образования вирусной РНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса, а также основой для синтеза вирусных белков.
- 2) -РНК вируса играет роль матрицы, образуется иРНК вируса при участии РНК-полимеразы вируса. На рибосомах клетки происходит синтез вирусных белков.
- 3) У ретровирусов с матрицы их РНК образуется ДНК-копия в виде однонитчатой ДНК при участии РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы вириона. Затем ДНК приобретает вторую нить. На матрице этой ДНК-копии синтезируются молекулы РНК с помощью обычной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Часть РНК в рибосомах вызывает образование обратной транскриптазы и капсидных белков.

#### ***V стадия - морфогенез вириона.***

V стадия - сборка, или морфогенез вириона. Морфогенез пикорнавирусов происходит в цитоплазме. Там же образуются нуклеокапсиды поксвирусов. Нуклеокапсиды панова-, адено-, герпес-, микровирусов формируются в ядре. Происходит монтаж капсида вокруг нуклеиновой кислоты вируса. У вирусов, имеющих внешнюю оболочку, дальнейшая сборка происходит в цитоплазме во время их выхода из клетки за счет ее оболочки.

#### ***VI стадия - выход вирионов.***

VI стадия - выход вирионов из клетки-хозяина. Ряд сложных вирусов (микровирусы) выходят из клетки-хозяина, «просачиваясь» через ее оболочку и приобретая суперкапсид, в состав которого включаются липиды, полисахариды оболочки клетки-хозяина. Простые вирионы (пикорнавирусы и др.) выходят из клетки через образовавшиеся в ее оболочке отверстия. При этом клетка-хозяин погибает.

#### ***ЦПД вирусов.***

ЦПД - цитопатическое действие вирусов характеризуется деструктивными изменениями в клетках без гибели их или гибелью клеток.

#### ***Дефектные вирусы и персистенция.***

Возможно образование дефектных вирусов, у которых отсутствует оболочка, частично или полностью нуклеиновая кислота. Дефектные частицы имеют значение в развитии вирусной персистенции, сохраняясь в клетках. При делении таких клеток они передаются дочерним клеткам. Так происходит формирование персистирующей инфекции.

#### ***Типы взаимодействия вируса с клеткой-хозяином.***

Существует три типа взаимодействия вируса с клеткой:

- Продуктивная инфекция заключается в образовании новых вирионов;
- Абортивная инфекция внезапно прерывается в стадии репликации вирусной НК, или синтеза вирусных белков, или морфогенеза вирионов;
- Виrogenия характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной НК в ДНК клетки. У фагов такой тип взаимодействия называется лизогенией. При делении клетки происходит синхронная репликация вирусной и клеточной ДНК. Это позволяет объяснить медленные и латентные вирусные инфекции, онкогенез.

#### ***Модели культивирования вирусов.***

Культивирование вирусов проводится для их выделения и накопления с диагностическими целями, их изучения, для производства вакцин и диагностических препаратов.

В связи с абсолютным паразитизмом их культивируют:

- 1) в организме восприимчивого животного;
- 2) в курином эмбрионе;
- 3) в культуре клеток.

#### ***В организме восприимчивого животного.***

В вирусологической практике используют преимущественно новорожденных животных, поскольку они более чувствительны к вирусам, способ заражения зависит от тропизма, т.е. преимущественного размножения вирусов в определенных тканях организма. Например, мышей вирусом гриппа заражают интраназально, вирусом энцефалита в мозг, вирусами коксаки заражают мышей-сосунков через рот и внутрибрюшинно. Проводят «слепые пассажи», заражая новую партию животных суспензией из органов первой партии, у животных наблюдают появление симптомов заболевания. Вирус в суспензии из органов выявляют с помощью серологических реакций.

### ***В курином эмбрионе.***

Культивировать вирусы в КЭ (курином эмбрионе) предложили Вудраф и Рудпасчер в 1937 г. У куриных эмбрионов, как правило, не бывает скрытых вирусных инфекций, менее дифференцированы ткани, поэтому у вирусов выше на них способность к росту, метод экономичен.

Заражение КЭ проводят:

- прямым способом путем прокола шприцем в скорлупе;
- непрямым способом путем снятия лоскута скорлупы.

Исследуемый материал наносят на оболочки петлей или капельницей, в полости эмбриона шприцем. Отверстие в скорлупе закрывают стерильным покровным стеклом. Края заливают карболизированным или кипяченым парафином. КЭ можно заражать в вену, в мозг, тело эмбриона. Вирусы гриппа репродуцируют в амниотической полости, вирусы оспы и герпеса - в хорионлантоисной полости 9-11 дневных КЭ или оболочке и т.д. При этом на хорионлантоисной оболочке вирусы оспы, герпеса вызывают ЦПД в виде оспин, помутнение и отек оболочек, некроз, кровоизлияния, образование пустул. О репродукции вирусов судят по гибели эмбриона, по РГА (р. гемаагглютинации). Пассажами через КЭ удается снизить инфекционность вирусов, что используют для получения вакцинных штаммов.

### ***В культурах клеток тканей.***

Культуры клеток предложил Э. Эндерс. Это кусочек ткани, органа или клетки в питательной среде, размножающиеся вне организма. Для них необходима химически чистая стерильная посуда из нейтрального стекла. Стерильными должны быть ткани, питательные среды, инструменты, посуда. Работать с культурой ткани нужно в стерильных боксах при строгом соблюдении асептики.

### ***Питательные среды для культур клеток.***

Питательные среды для культур клеток по происхождению и составу бывают:

- Естественные (сыворотка крови, аспитическая жидкость, куриные или коровьи эмбриональные экстракты, амниотическая жидкость).
- Синтетические: среда 199, содержащая больше 60 ингредиентов, среда Игла.
- Полусинтетические: гидролизаты лактальбумина, казеина, гемогидролизат. Состав синтетических сред сложный: минеральные соли, глюкоза, аминокислоты, витамины, коферменты и др. Индикатор феноловый красный вносят буферные растворы для поддержания стабильного рН 7,2-7,4. Минеральные соли в питательные среды вносят с солевыми растворами Хэнкса или Эрла, в присутствии фенолрот и указанном рН цвет среды красный. Для предупреждения бактериального и грибкового загрязнения в среду добавляют антибиотики (пенициллин, стрептомицин, нистатин и др.).

По назначению питательные среды подразделяют на:

- Поддерживающие - для поддержания только метаболизма в клетках; это синтетические и полусинтетические среды.
- Ростовые - среды для обеспечения роста и размножения клеток. В них добавляют 5-10% сыворотки.

### ***Типы культур клеток. Культуры переживающих тканей. Культуры растущих тканей.***

По способу выращивания клеток различают культуры:

- Переживающих тканей. Предложены в 1927 г. Мейтландами. Это чаще органные культуры (кусочек почки КЭ и др.). В них отсутствует размножение клеток. Применяют для выделения риккетсий.
- Культуры растущих тканей могут быть:
- Фиксированные, т.е. плазменные. Фиксация добавлением плазмы крови в присутствии питательной среды.
- Бесплазменные. Их подразделяют на три типа: первичные, перевиваемые и полуперевиваемые.

### ***Первичные культуры клеток.***

Первичные однослойные и трипсинизированные культуры клеток куриного эмбриона, эмбриона человека, почек обезьян, сирийских хомячков. Они обладают большой потенциальной способностью к росту, расщепление клеток производят 0,1-0,3% р-ром трипсина на электромагнитной мешалке при T=37 °C. Клетки фильтруют, центрифугируют, подсчитывают их число в 1 мл, разводят до 200 тыс.- 400 тыс. клеток в 1 мл, разливают, заливают ростовой питательной средой в пробирках, флаконах, матрицах. Через 3-5 суток инкубации под углом 5-10° при T=37 °C на нижней стенке образуется монослой клеток, что видно в малом увеличении микроскопа. Удалив ростовую среду на 30-60 мин., вносят 0,1-0,2 мл обработанного антибиотиками исследуемого материала. После удаления его наливают поддерживающую среду, такие культуры клеток используют однократно (ФЭК - фибробласты эмбрионов кур или человека - ФЭЧ, ПЭО, ПЭС, почек эмбрионов обезьян, свиней, человека). Они способны выдерживать не более 5-10 пассажей.

### ***Перевиваемые культуры.***

Перевиваемые культуры сохраняют путем пассажей в лабораториях десятки лет, выдерживая T=70 °C. Получают перевиваемые культуры чаще из опухолевых клеток (Hela - клетки рака матки, Нер-2 - клетки рака надгортанника, Детройт-6 - клетки рака легкого и др.) и реже из нормальных клеток эмбриона человека или животных (АО - амниона человека, клетки почки эмбрионов человека, свиней, мышинные фибробласты, ВНК-21 - клетки почек сирийского хомячка и др). Разновидностью перевиваемых клеток является лимфобластные клетки из крови человека, клетки синтезируют Ig (иммуноглобулины), лимфокины, интерферон. Имеются лимфобластные линии В и Т типа.

Расщепление клеток проводят раствором Версена (заменяют протеолитический фермент). Выращивают как однослойные культуры. Перевиваемые культуры из опухолевых клеток могут быть контаминированы онкогенными вирусами, поэтому их не используют для получения вакцинных штаммов.

### ***Полуперевиваемые культуры.***

Полуперевиваемые или диплоидные культуры клеток, они свободны от онкогенных вирусов, имеют двойной набор хромосом, выдерживают от 25 до 100 пассажей.

Это клональные культуры клеток, получаемых из капилляров сосудов, легких, сердца, слюнной железы человека, используют для накопления вакцинных штаммов.

### ***Суспензионное культивирование.***

Для получения большого урожая вирусов применяют суспензионное и роллерное культивирование. В суспензионных культурах клетки находятся во взвешенном состоянии, т. к. перемешивание клеток с помощью электромагнитной мешалки проводят в сосуде со скоростью 200 оборотов в минуту. Клетки не успевают прикрепиться. **Роллерное культивирование** проводят во вращающихся барабанах со скоростью 1-2 оборота в час. При этом клетки растут по всей цилиндрической поверхности сосуда. Урожай вируса на таких культурах клеток больше в 10-50 раз. Клеточные культуры перед использованием контролируют на возможность контаминации бактериями, дрожжами, плесневыми грибами, простейшими, микоплазмами, латентными вирусами, а также проводят кариологический анализ на изменение хромосом клеток.

**Методы лабораторной диагностики. Методы индикации вирусов: цветная проба, реакция гемадсорбции, реакция гемагглютинации.**

### ***Методы лабораторной диагностики.***

Методы лабораторной диагностики основаны на обнаружении, выделении и последующей индикации и идентификации вирусов, обнаружении антител в сыворотке крови.

- 1) Вирусоскопический. В основе его обнаружение элементарных телец, цитоскопическое и гистологическое исследование для обнаружения внутриклеточных включений и ЦПД вируса.
- 2) Вирусологический. Проводят культивирование вирусов, затем индикацию вирусов, т.е. обнаружение и идентификацию.
- 3) Серологический, выявляют иммунологическую перестройку путем обнаружения антител в парных сыворотках крови обследуемых по вирусным антигенам или антигенам с помощью РСК на ходу, РТГА (р. торможения гемагглютинации), р. гемадсорбции, р. нейтрализации, ПЦР.

### ***Методы индикации вирусов***

**Выявление ЦПД** вирусов в клеточных культурах: происходит дегенерация, гибель и отторжение клеток с образованием стерильных пятен или пикноз ядер, образование многоядерных клеток - симпластов, например, вирус

кори вызывает образование симпластов, аденовирусы - деструкцию клеток в виде гроздьев винограда, вирус полиомиелита - мелкозернистую деструкцию клеток.

### **Цветная проба.**

Цветная проба: клеточные культуры при рН 7,2-7,4 до заражения имеют в присутствии индикатора фенолрот красный цвет. При размножении вируса, гибели клеток в них прекращаются процессы метаболизма. Цвет среды не изменяется. При отсутствии размножения вируса клетки растут или сохраняются процессы метаболизма в них. при накоплении кислых продуктов метаболизма происходит сдвиг рН в кислую сторону. Цвет среды становится желтый.

**Р. гемадсорбции.** Р. гемадсорбции в культуре клеток основана на способности клеток, зараженных вирусом, адсорбировать на своей поверхности эритроциты морской свинки, кур или др. Через 4-5 дней культивирования в культуру клеток вносят 0,2 мл 0,4% взвеси эритроцитов на 30-60 мин., оставив в наклонном положении при  $T = 4^{\circ}\text{C}$ , затем встряхивают и микроскопируют. Эритроциты адсорбируются в виде лент, розеток, скоплений, в контрольной, т.е. интактной культуре клеток эритроциты на них не адсорбируются.

**Р. гемагглютинации.** Реакция гемагглютинации основана на способности вирусов, содержащий гемагглютинин агглютинировать эритроциты. К разведениям вирусосодержащего материала добавляют взвесь эритроцитов, после инкубации в течение 1 часа при  $T=22^{\circ}\text{C}$  учитывают результаты. При положительном результате реакции - образуется осадок эритроцитов с фестончатыми краями, покрывающий всё дно лунки или пробирки. В случае отсутствия гемагглютинации осадок в виде точки образуется на самом дне лунки или пробирки для последующей идентификации обнаруженного гемагглютинирующего вируса в РТГА вирусосодержащий материал берут в 4-х кратном титре (4 АЕ). Контролем реакции является взвесь эритроцитов в физиологическом растворе на отсутствие спонтанной гемагглютинации.

### **Методы идентификации вирусов: РСК, РТГА, р. нейтрализации, РИФ и др.**

Для определения видовой, типовой или штаммовой принадлежности выделенного вируса изучают его антигенное строение по иммунным диагностическим сывороткам против известных вирусов путем постановки серологических реакций:

- РСК
- РТГА - р. торможения гемагглютинации основана на способности антител специфической иммунной сыворотки нейтрализовать гемагглютинирующую активность вируса, в результате агглютинации эритроцитов не происходит.
- Р. торможения гемадсорбции основана на способности антител специфической иммунной сыворотки нейтрализовать вирус в результате адсорбции эритроцитов на клетках не происходит.
- Р. нейтрализация вируса специфической иммунной сывороткой размножение его в культуре клеток отсутствует, накапливаются кислые продукты метаболизма клеток, цвет среды становится желтым.
- РИФ прямая или непрямая.
- Р. преципитации в геле и др.

### **Классификация, морфо-биологическая характеристика и антигенное строение вируса гриппа.**

Семейство *Orthomyxoviridae*, род *Influenzavirus*, вирусы гриппа трех типов - А, В и С.

Вирус гриппа А подразделяется на подтипы в зависимости от строения двух поверхностных белков: гемагглютинаина (Н) и нейраминидазы (N). Известно 18 разновидностей гемагглютинаина (Н1-Н18) и 11 разновидностей нейраминидазы (N1-N11). В настоящее время преобладающими подтипами вируса гриппа А являются А (Н1N1) и А (Н3N2). Весной 2009 года появился новый вирус типа А (Н1N1) (вирус гриппа свиней), отличный от циркулирующих ранее и вызвавший первую пандемию гриппа за последние 40 лет.

Вирус гриппа В не подразделяется на подтипы, но может подразделяться на линии и штаммы. Представители типа В, циркулирующие в настоящее время, принадлежат к двум линиям: В/Yamagata и В/Victoria.

Вирус гриппа С вызывает спорадические случаи заболевания в легкой форме, не подразделяется на подтипы.

В 1979 году ВОЗ была принята конвенция о номенклатуре вируса гриппа (Bulletin of the World Health Organization, 58(4):585-591 (1980)), согласно которой штаммы вируса обозначаются следующим образом:

- Серотип (А, В, С)
- Хозяин (свинья, лошадь, курица и т.д.; для человеческих вирусов хозяин не указывается)
- Географическое происхождение (Denver, Taiwan и т.д.)
- Номер штамма (15, 7 и т.д.)

- Год выделения (57, 2009 и т.д.)
- Для вирусов гриппа А в скобках указываются подтипы гемагглютинина и нейраминидазы (H1N1), (H5N1)

Например:

- A/duck/Alberta/35/76 (H1N1) - вирус птичьего происхождения (утка)
- A/Perth/16/2009 (H3N2) - человеческий вирус

### **Морфология и химический состав.**

Вирионы вируса гриппа наиболее часто представляет собой сферические частицы со средним диаметром 110 нм. В свежeweделенных препаратах встречаются нитевидные формы значительно большей величины.

Вирион представляет собой нуклеокапсид, окруженный внешней оболочкой. Нуклеокапсид характеризуется спиральной симметрией. Особенностью вируса гриппа является фрагментарность минус-нитевой РНК, которая обуславливает способность генома к высокой частоте рекомбинаций. Последнее играет важную роль в антигенной изменчивости вирусов гриппа.

Белки составляют до 70% массы вириона. Они представлены гемагглютинином, нейраминидазой, мембранным белком, белком нуклеокапсида, группой Р-белков. Кроме того, в составе вириона находятся углеводы, липиды.

Резистентность. Вирусы гриппа термолабильны - при 56-60°C теряют инфекционность в течение нескольких минут. При температуре -70°C суспензия аллантаоисной культуры вируса полностью сохраняет инфекционность на протяжении нескольких месяцев. Вирусы гриппа высоко чувствительны к эфиру и дезоксихолату, УФ-лучам, а также к обычным дезинфицирующим средствам.

### **Культивирование.**

Вирусы гриппа культивируются в курином эмбрионе, в клеточных культурах и при заражении лабораторных животных.

Наиболее эффективный путь заражения куриных эмбрионов - в амниотическую полость. Оптимальный срок инкубации 36-48 час при 36-37°C. Показателем размножения вируса является положительная реакция гемагглютинации.

Из лабораторных животных к вирусу гриппа наиболее чувствительны хорьки, хомяки, мыши, меньше - крысы. Вирусы вводятся через нос под легким эфирным наркозом. Основное размножение вируса и развитие патологического процесса происходит в легких (мышы) или эпителии верхних дыхательных путей (хорьки, хомяки, крысы).

Вирусы гриппа могут размножаться в клеточных культурах, но при серийных пассажах снижается их инфекционная активность, уровни гемагглютининов и не развивается цитопатический эффект. Этим, наверное, и объясняется ограниченность использования этого метода.

### **Репродукция.**

Полный цикл репродукции вируса гриппа продолжается около 10 часов, латентный период - 3 часа. Отдельные стадии репродукции происходит в ядре инфицированных клеток, некоторые - в цитоплазме.

Адсорбция вируса гриппа происходит вследствие взаимодействия мукопротеидных рецепторов клеток и гемагглютинина. Проникновение вирионов внутрь клетки осуществляется путем виропексиса.

Неизвестны механизмы, обеспечивающие освобождение РНП. Следующий этап репродукции включает фазы транскрипции, трансляции, репликации РНК и сборки вирионов.

Синтез РНК в зараженных клетках может быть разделен на два процесса: синтез РНК, комплементарной геномной, транскрипция и синтез РНК вирусного потомства - репликация.

Вскоре после инфицирования интенсивность синтеза клеточных белков резко снижается и уже через 1-1,5 час превалирует синтез вирусных белков (трансляция).

Гемагглютинин и нейраминидаза образуются только в цитоплазме и включаются в состав вирионов при их созревании на оболочках клеток. Созревание вирусов гриппа заключается в том, что аккумулирующиеся в цитоплазме нуклеокапсиды ассоциируются с модифицированным вирусом участками плазматической мембраны, постепенно выпячиваются через мембрану, и формирующаяся вирусная частица отпочковывается от клетки. При

формировании внешней оболочки на ней появляются характерные для ортомиксовирусов ворсинки и клеточные липиды.

В культуре ткани накопление вирусов и специфических белков в оболочках клеток обуславливает развитие гемадсорбции. Обычно гемадсорбция выявляется незадолго перед выходом вируса из клетки.

**Антигены.** Вирусы гриппа имеют два антигена: S и V.

S-антиген (soluble - растворимый) связан с РНП и наиболее часто выявляется в РСК.

Внешняя оболочка вируса гриппа, основу которой составляет гемагглютинин и нейраминидаза, иммунологически определяется как V-антиген (вирусный). V - антиген определяется несколькими методами, из которых наиболее широко используется РТГА. Он обуславливает штаммоспецифические особенности вируса. Вирусы гриппа агглютинируют эритроциты почти 20 видов животных. Наиболее часто пользуются 1% суспензиями эритроцитов кур, человека (группа крови 1(0)) или морских свинок. В РГА различают три фазы: адсорбцию, агглютинацию и элюцию. Гемагглютинация широко используется как индикатор репродукции вируса, а феномен торможения является наиболее распространенным методом выявления антигенов вируса.

Вирусы гриппа по специфичности S-антигена разделяются на три серотипа: А, В, С. Тип А по V-антигену подразделяется на субтипы. Вирус гриппа А наиболее подвержен изменчивости, которая связана главным образом с изменением свойств его поверхностных антигенов - гемагглютинина и нейраминидазы.

Причины и механизмы образования новых антигенных разновидностей вируса гриппа дискуссионны. В последнее время распространена гипотеза об образовании в естественных условиях новых подтипов вируса гриппа вследствие рекомбинации между циркулирующими вирусами. По мнению Д.К. Львова (1977 г.), появление новых пандемических вирусов происходит в результате рекомбинации между вирусами гриппа человека и птиц или животных.

Механизмы изменчивости получили название антигенный дрейф и антигенный шифт. Дрейф происходит постоянно и обусловлен точечными мутациями в тех сайтах генома, которые отвечают за синтез гемагглютинина и нейраминидазы. В результате в популяции вирусов постоянно появляются новые сероварианты, которые незначительно отличаются от исходного штамма, но эти изменения не выходят за рамки подтипа.

Шифт обусловлен реассортацией и полной заменой генов, кодирующих синтез гемагглютинина и/или нейраминидазы. Это приводит к появлению нового подтипа вируса, который является причиной новой пандемии. Шифт является результатом рекомбинаций.

Вирус гриппа В отличается от вируса гриппа А по антигенным свойствам, изменяется только в результате дрейфа; РНК вируса гриппа С состоит из 7 фрагментов, вирус малоизменчив и не имеет нейраминидазы.

### **Особенности эпидемиологии, патогенеза и иммунитета при гриппе.**

Источником инфекции является больной гриппом человек, независимо от тяжести клинической картины. Наибольшую опасность представляют больные в первые дни заболевания. Передача инфекции осуществляется воздушно-капельным путем.

В последние годы получены данные о том, что вирусы гриппа птиц (H5N1 и H7N7) и свиней (H1N1) в результате реассортации приобрели способность преодолевать межвидовой барьер и вызывать у человека тяжелые клинические формы заболеваний, значительная часть которых заканчивается летальными исходами.

Эпидемии гриппа распространяются быстро, поражают огромные массы людей на протяжении 1-1,5 мес. Переболевают 25-60% населения. Пандемии гриппа могут возникнуть в любой части земного шара и распространяться из одного небольшого очага.

Эпидемии, вызываемые вирусом гриппа А, регистрируются во многих странах мира с интервалом в 2-3 года. Эпидемии гриппа В возникают с интервалом 4-6 лет или больше. Вирус гриппа С вызывает одиночные случаи или изредка небольшие вспышки.

После прекращения эпидемии грипп не исчезает полностью, а регистрируется в форме единичных случаев, составляя 5-10% общего числа острых респираторных заболеваний.

Патогенез. Вирус гриппа попадает в организм человека через дыхательные пути. Патогенез гриппа характеризуется двумя особенностями: четкой эпителиотропностью вируса и высокой уровнем интоксикации.

Вирус гриппа размножается в слизистых оболочках носа, зева, гортани, трахеи, бронхов. Клетки цилиндрического

эпителии теряют ворсинки, ядро их деформируется, в цитоплазме в большинстве случаев образуются включения. Мерцательный эпителий слизистой оболочки носа слущивается, оголяя собственно слизистую оболочку. Через 24 часа от начала клинических симптомов уже может быть выявлен некроз эпителии слизистой оболочки трахеи и бронхов. Вирус гриппа, размножаясь и разрушая клетки эпителии, попадает не только в дыхательные пути, но и в кровь. Вирусы гриппа имеют токсические свойства, которые связаны с вирусной частицей и нейтрализуются иммунными сыворотками. Интоксикация является одним из характернейших показателей гриппозной инфекции и клиническим признаком для дифференциации от других респираторных вирусных заболеваний человека.

Вирус гриппа проявляет токсическое действие на сосудистую и нервную системы, а это способствует раннему присоединению осложнений. При гриппе развивается вторичный иммунодефицит, что приводит к развитию вторичной инфекции или обострению хронических инфекций.

Иммунитет. Врожденного иммунитета при гриппе не зарегистрировано. После перенесенного заболевания в организме образуется постинфекционный иммунитет, характеризующийся тремя особенностями: типом-штаммспецифический, гуморальный, пожизненный.

Иммунитет к гриппу включает действие таких факторов, как образование антител в сыворотке крови и секретах дыхательных путей, интерферона, неспецифических факторов защиты.

### **Лабораторная диагностика гриппа: материал и методы (риноцитоскопия, вирусологический и серологический методы, экспресс- диагностика).**

В лабораторной диагностике гриппа и других ОРВИ широкое применение нашли экспресс-методы: иммунофлюоресценция, ИФА и ПЦР, риноцитоскопия, позволяющие в течение 2-3 часов поставить ориентировочный диагноз. Вирусологический метод с выделением и идентификацией возбудителя используется преимущественно для эпидемиологического анализа вспышек заболеваний. Серодиагностика носит ретроспективный характер, т.к. накопление антител происходит в период реконвалесценции. Несколько более раннее накопление антител характерно для детских инфекций.

**Риноцитоскопическое исследование.** С поверхности нижней носовой раковины больных берут мазки-отпечатки с помощью узких стекол со шлифованным краем. Препараты окрашивают различными методами (по Романовскому или Павловскому). В препаратах обнаруживаются слущенные клетки цилиндрического эпителии с наличием цитоплазматических включений. По Романовскому включения красятся в фиолетовый цвет, по Пигаревскому и Павловскому - в ярко-красный. Такие же включения обнаруживают в цитоплазме дегенерированных макрофагов, лейкоцитов и клеток плоского эпителии. Включения также обнаруживают при обработке препаратов флюорохромными красителями (акридиновый оранжевый в разведении 1:20000). Включения содержат РНК и при люминесцентной микроскопии дают ярко-красное свечение. Риноцитоскопия позволяет дифференцировать грипп от аденовирусных инфекций, при которых наблюдается деструкция клеток, вакуолизация ядер и образование внутриядерных включений. Последние содержат ДНК и в окрашенных акридиновым оранжевым препаратах при люминесцентной микроскопии дают ярко-зеленое свечение.

**РИФ.** Иммунофлюоресценция является высоко специфичной и позволяет диагностировать и дифференцировать грипп, парагрипп, респираторно-синцитиальную и аденовирусную инфекции. В эпидемический период этот метод дает возможность поставить диагноз гриппа у 50-70% больных.

**Вирусологический метод.** Для выделения вируса гриппа используют носоглоточное отделяемое, взятое в первые три дня болезни. Для этого больному предлагают прополоскать горло в три приема 10-15 мл изотонического раствора хлорида натрия. Смыв из зева собирают в широкогорлую банку. Стерильными ватными тампонами на пинцете протирают заднюю стенку глотки, носовые ходы. Ватные тампоны опускают в банку со смывом, прополаскивают, отжимают о стенку сосуда и удаляют.

Носоглоточные смывы обрабатывают смесью антибиотиков (пенициллина и стрептомицина) и центрифугируют. Для выделения вируса гриппа используют надсадочную жидкость, которой производят заражение куриного эмбриона в амниотическую полость и клеточных культур. Выделение вируса гриппа возможно в культурах клеток ткани (первичная культура клеток почек обезьян, клетки почек собак, почек макак-резус и др.).

Наличие вируса гриппа в амниотической и аллантоисной жидкости, его гемагглютинирующий титр, определяют в РГА. Идентификацию вирусов проводят в РТГА, ИФА с типоспецифическими сыворотками. Типирование можно осуществлять также в РСК сывороткой, иммунной к растворимому антигену, общему для всех штаммов данного типа.

**Серодиагностика.** Серодиагностика гриппа базируется на выявлении прироста противовирусных антител в парных сыворотках. Диагностическое значение имеет 4-х кратное увеличение титра антител; в период эпидемии диагностическое значение имеет двухкратное увеличение титра антител при выраженной клинической картине.

Серодиагностика осуществляется с помощью РСК, РТГА, ИФА со стандартными диагностикумами, представляющими собой наборы эталонных штаммов различных серологических типов вируса гриппа. РСК более чувствительна, чем РТГА и позволяет диагностировать грипп в очагах инфекции у 90% больных.

**Генодиагностика.** На основании опыта борьбы с пандемией гриппа Influenza A H1/N1 в 2009 году был сделан вывод, что «золотым стандартом» идентификации этого подтипа вируса является полимеразная цепная реакция в режиме реального времени – метод молекулярной диагностики, позволяющий выявлять в биологическом материале (например, в отделяемом носоглотки) фрагменты генетического материала (РНК) возбудителя инфекции. Такое исследование позволяет получить максимально точный результат в кратчайшие сроки.

Так как серотипы и подтипы вируса гриппа отличаются друг от друга по некоторым генетическим последовательностям (например, по гену гемагглютинаина, Н1), с помощью исследования РТ-ПЦР возможно идентифицировать конкретный подтип вируса (Influenza A/H1). Специфичность этого анализа составляет 98-100 %. Среди «быстрых» тестов только РТ-ПЦР способна дифференцировать подтип вируса гриппа свиней от других подтипов Influenza A. Положительный результат исследования указывает на наличие генетического материала Influenza A/H1 в образце, однако не всегда означает продолжающуюся репликацию вируса, так как в реакции определяется не сам вирус, а фрагменты его РНК. По этой же причине положительный результат исследования биоматериала, взятого на фоне начатого противовирусного лечения, не означает его неэффективности.

Чувствительность исследования составляет 86-100 %. Результат теста зависит от времени и способа взятия биоматериала. Несмотря на то, что идентификация вируса гриппа с помощью РТ-ПЦР возможна в течение более длительного времени от начала заболевания по сравнению с большинством других тестов, биоматериал должен быть получен как можно раньше (оптимально в первые 48-72 часа). У детей, а также при вовлечении нижних отделов респираторного тракта этот период более длительный. Исследование мокроты характеризуется лучшими результатами, чем исследование мазков из зева или носа.

#### **Специфическая профилактика и терапия гриппа.**

В настоящее время основой профилактики гриппа является активная иммунизация. Действие вакцин направлено на предупреждение инфицирования штаммами, которые предположительно будут циркулировать в течение предстоящего сезона. Для опережающего эпидпрогноза создана глобальная сеть слежения за циркуляцией вирусов гриппа, работающая под эгидой ВОЗ.

Иммунизация рекомендована прежде всего лицам групп риска (больные с сердечно-сосудистыми заболеваниями и респираторными заболеваниями, лица старше 65 лет, больные, получающие иммунодепрессанты и др.), персоналу ЛПУ и т.п. В настоящее время существуют различные типы вакцин: убитые, живые, субвирионные (расщепленные, сплит-вакцины), субъединичные. Субвирионные и субъединичные вакцины содержат только протективные антигены Н и N. В состав субъединичных вакцин нового поколения входят иммуномодулирующие полимеры-адьюванты, в частности в состав вакцины «Гриппол» (Россия) – полиоксидоний.

В России лицензированы следующие противогриппозные субъединичные и сплит-вакцины:

1. **гриппол и совигрипп** (Россия) - субъединичные вакцины, содержащие гемагглютинины актуальных штаммов вируса гриппа;
2. **гриппозная трехвалентная полимер-субъединичная вакцина жидкая** - высокоочищенный белковый препарат, содержащий поверхностные антигены вирусов гриппа. Полиоксидоний в дозе 500 мкг повышает стабильность и активность антигенов, а также неспецифическую резистентность организма;
3. **агриппал S1** («Кайрон Беринг», Германия) - субъединичная вакцина, содержащая очищенные гемагглютинин и нейраминидазу. Показана людям любого возраста;
4. **бегривак** («Кайрон Беринг», Германия) - сплит-вакцина, содержит в 1 дозе по 15 мкг гемагглютинаина актуальных штаммов вируса;
5. **ваксигрип** («Авентис Пастер», Франция) - сплит-вакцина, содержит в 1 дозе по 15 мкг гемагглютининов вируса гриппа;
6. **инфлювак** («Солвей Фарма», Нидерланды) - субъединичная трехвалентная вакцина, состоящая только из поверхностных антигенов вирусов гриппа А и В;
7. **флюарикс** («Глаксо Смит Кляйн», Германия) - очищенная сплит-вакцина, содержит в 0.5 мл 15 мкг гемагглютинаина подтипа А/Н1N1/А/Н3N2/ и В.

**Гриппол** применяется у детей с 3 лет. **Бегривак** применяют детям старше 3 лет. Детям, ранее не привитым, рекомендуется двукратная вакцинация с интервалом 4 нед. **Ваксигрип** применяется с возраста 6 мес. **Флюарикс** применяют у детей старше 1 года.

Иммунитет возникает через 14 дней после вакцинации, он кратковременный (6-12 мес), типоспецифичный. Профилактическая эффективность вакцинации 70-90%. Вакцинация должна заканчиваться до начала гриппозного

эпидсезона. Во время эпидсезона можно применять препараты интерферона и его индукторы.

Специфическая терапия проводится противовирусными препаратами. ВОЗ прежде всего рекомендует ингибиторы нейраминидазы в связи с широким спектром их действия:

1. Озельтамивир (тамифлю) перорально (препарат неэффективен спустя 36 часов от начала заболевания);
2. Занамивир (реленза) в виде ингаляции интраназально (препарат неэффективен спустя 36 часов от начала заболевания).

Также для терапии и профилактики гриппа используются:

1. Ремантадин (вирус гриппа А) – блокатор белка М2;
2. Арбидол – блокатор слияния липидной оболочки вируса с мембраной эндосом;
3. Ингавирин – взаимодействует с вирусным белком NP и является блокатором ядерно-цитоплазматического экспорта, также является индуктором интерферона;
4. Интерфероны (интерферон- $\alpha$ 2, интерферон- $\gamma$  (Ингарон). Последний обладает выраженным противовирусным эффектом, стимулирует активность NK-клеток, созревание дендритных клеток и формирование специфического антитоксического иммунитета;
5. Индукторы интерферонов (амиксин, циклоферон);
6. Ингибиторы протеаз (контрикал, амбен, Е-аминокапроновая кислота) – ингибирование протеолитического нарезания вирусных полипептидов.

### **Классификация вируса клещевого энцефалита. Морфология вируса.**

Сем. *Flaviviridae*, род *Flavivirus*, вид вирус весенне-летнего клещевого энцефалита.

Вирус имеет сферическую форму диаметром до 50–60 нм, покрытую гликопротеиновой оболочкой. Внутри внешней оболочки размещается вирусный капсид – геномный нуклеопротеиновый комплекс, покрытый коровым белком С, диаметром около 30 нм. В своем составе вирусная частица содержит 68% белка, 8% РНК, 17% липидов и 9% углеводов.

Белок Е – главный, биологически наиболее значимый компонент внешней поверхности оболочки вириона. Он играет ключевую роль в процессах сборки вирусной частицы, в связывании вируса с клеточной поверхностью и последующем слиянии вирусной и клеточной мембран – определяет тропизм вируса. При сборке вириона нуклеокапсид вирусной частицы диаметром 26–30 нм, состоящий из вирусной РНК и внутривирусного нуклеокапсидного белка С, заключается в липидный бислой, происходящий из плазматической мембраны клетки-хозяина и вирусных поверхностных белков ргеМ и Е. Таким образом, гликопротеин Е и белок ргеМ (после созревания и выхода вируса из клетки – белок М) включены в состав липопротеиновой оболочки вируса, однако, пространственно выступают на поверхности собранной вирусной частицы.

Клеточными рецепторами для вируса являются фосфолипиды или гликолипиды. Вирусы проникают в клетки путем рецепторного эндоцитоза, с последующим слиянием вирусной оболочки со стенкой вакуоли. После стадий связывания с клеткой, эндоцитоза вирионов, слияния и расплавления мембран происходит разделение нуклеокапсидов и освобождение геномной РНК в цитоплазме. Далее следуют сложные совмещенные стадии трансляции и процессинга полипротеина (синтеза структурных и неструктурных вирусных белков) с ассоциированной с мембраной репликацией – размножением (+)- и (-)-цепей новой вирусной РНК. Затем вновь синтезированная (+)-цепь вирусной РНК комплексуется с ргеМ, М и С-белками в вирусный нуклеокапсид. Дальнейшая сборка вириона с участием поверхностного Е-белка и созревание полного инфекционного вируса происходят в клеточных структурах и окончательно завершаются в процессе транспортировки вирусов через клеточную мембрану. Вирионы созревают по мере передвижения из шероховатого эндоплазматического ретикулума в гладкий, затем в аппарат Гольджи и, наконец, в плазматическую мембрану клетки.

Вирусы КЭ культивируют методом заражения различных животных, чаще белых мышей, куриных эмбрионов, культур клеток тканей, злокачественных опухолей животных, нормальных или перевиваемых культур.

### **Экология, эпидемиология, патогенез КЭ.**

КЭ – природно-очаговое, зоонозное, трансмиссивное инфекционное заболевание, ареал которого занимает обширное пространство тайги и лесов от Дальнего Востока до Центральной Европы. На территории Красноярского края циркулируют Восточно-Сибирский, Западный и Дальневосточный варианты вируса клещевого энцефалита. Наиболее вирулентными являются Дальневосточный (летальность до 40%) и Восточно-Сибирский (частое развитие паралитической формы КЭ).

Экологической нишей ВКЭ являются мелкие грызуны, бурундуки, зайцы, птицы и сами клещи, которые передают

вирус потомству трансвариально. В Красноярском крае основное эпидемиологическое значение имеют *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor nuttalli*, *Haemaphysalis concinna*.

Весенне-летняя сезонность заболевания обусловлена биологической активностью клещей в этот период. В населенных местностях в эпизоотический процесс вовлекается домашний скот, и человек может заразиться алиментарным путем - через молоко больных КЭ коз, реже коров.

ВКЭ проникает в организм человека через кожу при укусе клеща или через пищеварительный и желудочно-кишечный тракты в случае алиментарного заражения при приеме зараженного вирусом молока. В первом случае местом первичного размножения вируса являются кожа и подкожная клетчатка. При алиментарном заражении происходит быстрая фиксация вируса не только в эпителиальных клетках верхнего отдела пищеварительного тракта, но и в тканях желудочно-кишечного тракта. Затем, как в первом, так и во втором случаях, проникая через капилляры в систему крово- и лимфообращения, вирус начинает размножаться в эпителии кровеносных и лимфатических сосудов, лейкоцитах крови и вместе с ними попадает и размножается в органах иммунной системы, ретикулоэндотелиальной системы, в клетках печени (клетки Купфера), почек и селезенки. Как было показано в лабораторных исследованиях *in vitro*, заражение ВКЭ лейкоцитной массы человека ведет к активной адсорбции вируса на клетках с последующим латентным периодом инфекции на протяжении первых суток и к интенсивному накоплению вируса как в лейкоцитах, так и в надосадочной жидкости со вторых по пятые сутки. Интенсивно размножаясь во внутренних органах, вирус может постепенно проникать в периферическую невральную и центральную нервную системы. Вопрос о том, преимущественно через гематогенный, лимфогенный или невральные (через проводящие нервные импульсы нейроны периферической нервной системы) пути вирус попадает в мозговые структуры ЦНС, до сих пор остается предметом дискуссии среди исследователей. Не исключено, что в зависимости от гетерогенности антигенных свойств клещевого пула вируса, может реализоваться тот или иной путь проникновения отдельных штаммов вируса в ликвор и определенные отделы ЦНС (Аммосов А.Д., 2006).

#### **Материал для исследования, лабораторная диагностика КЭ.**

Для выявления инфицирования вирусом и установления диагноза клещевого энцефалита используются следующие методы:

1) серологический метод:

- ИФА Е антигена ВКЭ (выявление ВКЭ в клещах и ликворе человека или животных);
- ИФА антител класса IgM к ВКЭ (выявление антител однократно и в парных сыворотках крови обследуемых);
- ИФА антител класса IgG к ВКЭ (выявление антител однократно и в парных сыворотках крови обследуемых).

Внутри-, межочаговая и региональная генетическая гетерогенность ВКЭ приводит к широкому структурному разнообразию эпитопов каждого из антигенов вируса. В результате среди циркулирующих в природе штаммов вируса значительную часть составляют антигенно-дефектные варианты. Сущность явления антигенной дефектности заключается в отсутствии гемагглютинирующего и преципитирующего антигенов и слабой иммуногенности на фоне высокой инфекционной активности вируса. В этих условиях основу иммунологических методов анализа специфических вирусных антител составляют реакции связывания только вируснейтрализующих антител, продуцируемых у лиц, инфицированных антигенно-дефектными вирусами в низких титрах. В природных популяциях ВКЭ доля соответствующих дефектных штаммов может достигать 30–40%. Лица, инфицированные антигенно-дефектными штаммами, в клинике образуют группу т.н. серонегативных больных и больных с низкими стабильными титрами (Аммосов А.Д., 2006).

Поэтому для подтверждения диагноза часто рекомендуется применение высокочувствительного ПЦР-анализа для определения РНК ВКЭ:

2) генодиагностика - выявление геномной РНК ВКЭ с помощью ПЦР.

Определение вирусной РНК при клещевом энцефалите в образцах сыворотки, ликвора, в зависимости от сроков выявления и корреляции с определенными соотношениями уровней специфических антител IgM и IgG, может служить для диагностики серонегативной формы клещевого энцефалита, затяжной реконвалесценции, прогноза второй волны лихорадки клещевого энцефалита и возможности хронизации процесса.

Для постановки этиологического диагноза КЭ используются два принципа: выделение вируса из организма больных или материала от умерших; выявление вирусспецифических антител и нарастания их титра в динамике заболевания.

3) вирусологический метод

Материалом для исследования служит кровь, цереброспинальная жидкость, которые берут не позже первых 5 дней заболевания. При летальном исходе используют ткань различных участков головного мозга, кровь, цереброспинальную жидкость.

Вирус выделяют путем внутримозгового заражения вирусосодержащим материалом молодых белых мышей. Мыши заболевают через 8-12 дней, у них появляются судороги, параличи и вскоре животные гибнут. Выделение вируса можно проводить в культуре клеток ткани, используя культуры фибробластов куриных эмбрионов и перевиваемые культуры СПЭВ и ВНК-21. Вирус КЭ вызывает ЦПД во всех указанных культурах.

Идентификацию выделенного вируса осуществляют в РТГА, РСК, РН, методом ИФ, используя эталонные типоспецифические сыворотки иммунизированных животных или переболевших людей.

### **Специфическая профилактика**

1. Инактивированные вакцины (по схеме, для плановой иммунизации):

- Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная сухая, Россия;
- ЭнцеВир - вакцина жидкая, Россия;
- ФСМЕ-ИММУН (для детей и взрослых), Австрия;
- Энцепур (взрослый и детский), Германия.

2. Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита - для экстренной профилактики - за 96 часов до посещения очагов непривитыми или в первые 96 часов после присасывания клеща (непривитым или привитым не менее чем за 10 дней до присасывания).

**Неспецифическая профилактика** основывается на уничтожении клещей вблизи населенных пунктов, а также на индивидуальных мерах защиты от их нападения (репелленты, акарициды, рациональная одежда).

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Особенности строения вирусов.
2. Особенности и этапы продуктивного типа взаимодействия вируса с клеткой
3. Патогенетический результат интегративного типа взаимодействия вируса с клеткой
4. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов, РНК-содержащих вирусов.
5. Методы индикации вирусов.
6. Методы лабораторной диагностики вирусных инфекций и их особенности.
7. Способы идентификации вирусов при диагностике инфекционных заболеваний.
8. Понятия «элементарные тельца», «внутриклеточные включения».
9. Патогенетическое следствие продуктивного типа взаимодействия вируса с клеткой
10. Особенности культивирования вирусов, модели для культивирования.
11. Классификация, морфобиологическая характеристика вируса гриппа.
12. Лабораторная диагностика гриппа: материал и методы (вирусологический и серологический методы, экспресс-диагностика).
13. Специфическая профилактика гриппа.
14. Механизмы изменчивости поверхностных антигенов вирусов гриппа серотипа А.
15. Специфическая профилактика и терапия клещевого энцефалита.
16. Классификация и морфо-биологическая характеристика вируса КЭ.
17. Особенности эпидемиологии, патогенеза и иммунитета при КЭ.

### **6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ВИРУСЫ ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ:

- 1) наличием ДНК и РНК;
- 2) наличием либо ДНК, либо РНК;
- 3) не используют рибосомы клетки хозяина для биосинтеза белка;
- 4) репродуцируются только вне активно функционирующих клеток;
- 5) способностью к росту и бинарному делению;

2. ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ:

- 1) дифференциально-диагностические среды;
- 2) куриные эмбрионы;
- 3) среды обогащения;
- 4) питательные среды сложного состава;
- 5) комбинированные питательные среды;

3. НАИБОЛЕЕ ПРИЗНАННАЯ ТЕОРИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ВИРУСОВ:

- 1) потомки доклеточных форм;
- 2) результат регрессивной эволюции;
- 3) клонально-селекционная;

- 4) естественного отбора;
  - 5) «взбесившихся» генов;
4. ИНФЕКЦИОННОСТЬ ВИРУСОВ СВЯЗАНА С:
- 1) суперкапсидом;
  - 2) капсидом;
  - 3) типом симметрии;
  - 4) нуклеиновой кислотой;
  - 5) количеством капсомеров;
5. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ:
- 1) запасные питательные вещества;
  - 2) форма сохранения вируса при неблагоприятных условиях;
  - 3) способ ухода вируса от иммунного надзора;
  - 4) защитная реакция клетки;
  - 5) скопления вирионов или их компонентов;
6. СХЕМА РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ:
- 1) + РНК - белок;
  - 2) - РНК - белок;
  - 3) + РНК - ДНК - белок;
  - 4) - РНК - РНК-полимераза - белок;
  - 5) ДНК - мРНК - белок;
7. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА.:
- 1) сем. Paramyxoviridae, род Paramyxovirus;
  - 2) сем. Orthomyxoviridae, род Influenzavirus;
  - 3) сем. Paramyxoviridae, род Morbillivirus;
  - 4) сем. Paramyxoviridae, род Rubulavirus;
  - 5) сем. Adenoviridae, род Mastadenovirus;
8. АНТИГЕН(Ы) ВИРУСА ГРИППА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ(ИЕ) ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА:
- 1) NP (нуклеопротеин);
  - 2) NS1, NS2 (неструктурные протеины);
  - 3) Н (гемагглютинин), N (нейраминидаза);
  - 4) М-белки;
  - 5) белки полимеразного комплекса;
9. АНТИГЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ГРИППА А ОБУСЛОВЛЕНА:
- 1) спиральным типом симметрии;
  - 2) высокой скоростью репродукции;
  - 3) «минусовым» типом РНК;
  - 4) фрагментарностью вирусной РНК;
  - 5) наличием суперкапсида;
10. ИНДИКАЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ТКАНИ:
- 1) ЦПД типа деструкции;
  - 2) ЦПД типа симпластообразования;
  - 3) РГАдс;
  - 4) цветная проба;
  - 5) бляшкообразование;
11. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА:
- 1) сем. Togaviridae, род Rubivirus;
  - 2) сем. Picornaviridae, род Enterovirus;
  - 3) сем. Paramyxoviridae, род Morbillivirus;
  - 4) сем. Flaviviridae, род Flavivirus;
  - 5) сем. Bunyaviridae, род Hantavirus;
12. ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА:
- 1) РНК-содержащий;
  - 2) ДНК-содержащий;
  - 3) имеет спиральный тип симметрии;
  - 4) простой;
  - 5) средний;
13. КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ - ИНФЕКЦИЯ:
- 1) антропонозная;
  - 2) природно-очаговая;
  - 3) особо опасная;
  - 4) эндемичная только для Сибирского региона;
  - 5) оппортунистическая;

## 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. Проведено заражение куриного эмбриона для выделения вируса гриппа. После инкубации в термостате зараженного эмбриона отмечается его гибель

**Вопрос 1:** Назовите оптимальные методы заражения куриного эмбриона исследуемым материалом для выделения вируса при диагностике гриппа и натуральной оспы;

**Вопрос 2:** Назовите методы индикации вирусов в курином эмбрионе;

**Вопрос 3:** Какие вирусы можно культивировать на данной биологической модели;

**Вопрос 4:** Оценить данный результат;

1) При диагностике гриппа для выделения вируса наиболее оптимальным является заражение исследуемым материалом КЭ в полость амниона, при диагностике натуральной оспы - хорионлантоисную полость или на ее оболочку;

2) О репродукции вируса в курином эмбрионе свидетельствуют: специфические поражения оболочек и тела эмбриона, гибель эмбриона, положительная РГА;

3) Вирусы гриппа, натуральной оспы, герпеса;

4) Гибель куриного эмбриона подтверждает наличие вируса;

2. В школе при проведении плановой вакцинации против гриппа родителям детей, не достигших 15 лет, были розданы информированные согласия на проведение профилактической прививки. Согласие на вакцинацию дали 45% родителей, остальные от вакцинации детей отказались

**Вопрос 1:** Возможно ли создание коллективного иммунитета при охвате вакцинацией 45%;

**Вопрос 2:** Через какое время у вакцинированных детей сформируется специфический иммунитет;

**Вопрос 3:** С какой периодичностью проводится вакцинация против гриппа? С чем это связано;

**Вопрос 4:** Что входит в состав противогриппозных вакцин, наиболее часто применяемых в настоящее время;

1) Нет. Формирование коллективного иммунитета происходит при достижении уровня охвата вакцинацией 95%;

2) Не ранее, чем через 14 дней;

3) Вакцинация проводится ежегодно с обновлением состава применяемых вакцин. Это связано с антигенной изменчивостью вируса гриппа (антигенный дрейф и антигенный шифт);

4) В настоящее время применяются, в основном, инактивированные гриппозные вакцины, по составу являющиеся субъединичными и, как правило, трехвалентными. В их состав входят гемагглютинины актуальных в текущем эпидсезоне штаммов вирусов гриппа типа А (подтипы H1N1и H3N2) и типа В;

3. При подозрении на инфекцию вирусной этиологии врач выписал направление в вирусологическую лабораторию. Проведено заражение культуры клеток материалом от больного.

**Вопрос 1:** Что такое индикация вирусов?;

**Вопрос 2:** Назовите методы индикации вирусов.;

**Вопрос 3:** Какие типы ЦПД могут проявлять вирусы в зараженных клетках?;

1) Что такое индикация вирусов?;

2) Назовите методы индикации вирусов.;

3) Какие типы ЦПД могут проявлять вирусы в зараженных клетках?;

4. Больной «А» поступил в стационар на 8 день болезни. Заболел остро. Жалобы: резкая головная боль, тошнота, рвота, повышение температуры до 39°C. Неделю назад пребывал в эндемичном районе (неблагополучном по клещевому энцефалиту).

**Вопрос 1:** Ваши предположения в отношении этиологии заболевания?;

**Вопрос 2:** Какой материал необходимо взять для исследования?;

**Вопрос 3:** Какие методы диагностики вы примените?;

**Вопрос 4:** Каким путем могло произойти заражение?;

**Вопрос 5:** Назовите препарат, применяемый для экстренной пассивной специфической профилактики КЭ, и принципы его введения;

**Вопрос 6:** Ваши предположения в отношении этиологии заболевания;

1) Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ);

2) Кровь, ликвор, сыворотку крови;

3) Серологический: ИФА для определения антигена ВКЭ в первой пробе крови больного, ИФА для определения IgM к ВКЭ; Молекулярно-генетический: ПЦР для выявления вирусной РНК.;

4) Трансмиссивным или алиментарным;

5) Противоклещевой иммуноглобулин (гомологичный - в/м, гетерологичный - дробно по методу А.М.Безредко.;

6) Предварительно - КЭ;

## 8. Рекомендованная литература по теме занятия

- **обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

- **дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е

изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

Лелевич, С. В. [Клиническая микробиология](#) : учебное пособие для вузов / С. В. Лелевич, О. М. Волчкевич, Е. А. Сидорович. - 2-изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2022. - 308 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 16.** Лабораторная диагностика кори, эпидемического паротита, краснухи.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Корь и эпидемический паротит относятся к управляемым инфекциям. Принципиально новым этапом в борьбе с этими инфекциями в нашей стране явились принятая ВОЗ Расширенная программа иммунизации и Программа ликвидации кори на территории России к 2010 г. Такое отношение к этим инфекциям не случайно и определяется не только тем, что корь и эпидемический паротит - высококонтагиозные (особенно корь) инфекции, но и тем, что они могут вызывать тяжёлые осложнения. Корь может вызывать энцефалит, пневмонию, подострый склерозирующий панэнцефалит. Возможен вклад коревой инфекции в развитие таких хронических заболеваний как системная красная волчанка, рассеянный склероз, гломерулонефрит. При эпидемическом паротите регистрируются орхиты, реже оофориты с последующим бесплодием. Как у взрослых, так и у детей паротитная инфекция нередко проявляется серозным менингитом с возможным развитием тугоухости. Краснуха занимает в нашей стране особое место среди инфекций, управляемых средствами специфической профилактики. В последние десятилетия ситуация с заболеваемостью краснухой значительно улучшилась благодаря массовой иммунизации населения. Тем не менее, отмечающийся сдвиг заболеваемости краснухой на более старшие возрастные группы увеличивает опасность появления синдрома врожденной краснухи.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**Классификация, морфо-биологическая характеристика вирусов кори, эпидемического паротита, краснухи.**

Семейство *Paramyxoviridae*, род: *Morbillivirus* (morbilli-корь), вид *вирус кори*.

Семейство *Paramyxoviridae*, род *Paramyxovirus*, вид *вирус эпидемического паротита*.

Семейство *Togaviridae*, род *Rubivirus*, вид *вирус краснухи*

Парамиксовирусы - это РНК-содержащие вирусы со спиральным типом симметрии, округлой формы, диаметром 100-300 нм. Вирусная РНК представлена несегментированной односпиральной минус-нитью. Тяж нуклеопротеида свернут в клубок и одет внутренней белковой оболочкой. Снаружи вирион покрыт липидной оболочкой, которая по своему составу близка плазматической мембране клетки хозяина. В поверхностных структурах вириона содержатся гемагглютинин, нейраминидаза, а также F-фактор, вызывающий слияние клеток и формирование многоядерного синцития. У вируса кори нейраминидаза отсутствует. Размножаясь в культуре, все семейство парамиксовирусов образует цитоплазматические включения.

*Антигенная структура вирусов кори и паротита.*

У членов семейства парамиксовирусов имеются растворимые и вирионные специфические антигены. Групповых антигенов не обнаружено. Антигенная структура стабильна.

Вирусы кори и паротита представлены одним серотипом, соответствующим, обладающим гемагглютинирующей, гемолитической и слабовыраженной нейроминидазной активностью.

*Культивирование и репродукция вируса в культуре клеток тканей.*

Парамиксовирусы размножаются в культурах клеток почек обезьян или эмбриона человека, в частности на перевиваемых клетках Hela, Нер-1, Нер-2, где образуются гигантские клетки (синцитий), культуры наблюдают не

менее 3-4 недель. На курином эмбрионе выращиваются только вирусы рода парамиксовирусов. Материал вводят в аллантаоисную полость. Через 3-5 дней эмбрионы погибают.

### **Особенности эпидемиологии, патогенеза и иммунитета при кори, эпидемическом паротите.**

Вирусы кори и паротита не устойчивы во внешней среде и плохо переносят высушивание. Под воздействием света возбудитель кори погибает через 8-10 мин.; при T-37°C он сохраняется до 2-х часов, при T-56°C погибает через 30 мин. Вместе с тем вирусы кори и краснухи хорошо переносят низкие температуры. Вирусы быстро инактивируются в патологическом материале при воздействии хлорсодержащих дезинфектантов и формалина. Возбудитель паротита при контакте с жирорастворителями разрушается в течение 2-5 мин., инактивируется 1% раствором лизола, 2% раствором формалина. Вместе с тем вирусы кори и паротита хорошо переносят низкие температуры.

Единственным источником инфекции при кори и паротите является только больной человек с клинически выраженными и стертыми формами. Вирус кори крайне контагиозен и высоковирулентен: бессимптомного заражения практически не бывает.

Корь и паротит – типичные инфекции дыхательных путей. Путь передачи – воздушно-капельный: при чиханье, кашле, что способствует быстрому распространению инфекции, иногда возможна передача возбудителей через загрязненные слюной предметы. Высококонтагиозные инфекции. Наиболее восприимчивы дети от 4 до 15 лет, но возможно заражение и взрослых. Заболевания встречаются повсеместно. При кори наибольшая заражаемость происходит в продромальный период и в 1-й день появления сыпи. При паротите эпидемически значимое выделение вируса из организма начинается за 5-6 дней до клинических симптомов и заканчивается на 5-6-й день после развития заболевания. Паротит менее заразен, чем корь и краснуха.

#### *Особенности патогенеза кори и паротита.*

**КОРЬ.** Входными воротами для вируса кори являются дыхательные пути и, возможно, конъюнктивы глаз. Инкубационный период при кори – 8-14 сут. (иногда затягивается до трех недель). Кроме эпителиальных клеток вирус размножается в мононуклеарных фагоцитах, лимфоцитах и эндотелиальных клетках. Вирус обладает тропизмом к эпителию дыхательных путей, поэтому с первых дней заболевания появляется катаральное воспаление слизистых оболочек носа, гортани, трахеи. После размножения вируса в эпителиальных клетках дыхательного тракта, регионарных лимфоузлах, происходит диссеминирование вируса кори с током крови по организму (первичная вирусемия) во все отделы лимфоидной и ретикуло-эндотелиальной ткани, где продолжается его размножение, после чего следует вторая, более мощная волна вирусемии. Свойственное кори поражение слизистых оболочек с участками полнокровия, очагового отека с вакуолизацией, поверхностным некрозом эпителия проявляются на слизистой щек и губ патогномичным для кори симптомом, именуемые клетками Бельского-Филатова-Коплика – очаги некроза с зоной воспалительной гиперемии диаметром 1-3 мм (катаральная стадия). Катаральную стадию болезни сменяет коревая сыпь, представляет собой гнездный инфекционный дерматит. Пусковым моментом для возникновения сыпи является реакция между клетками кожного покрова, носителем антигена и иммунокомпетентными лимфоцитами. В период высыпания все изменения, присущие кори, достигают максимума. «Настоящую» корь знаменует папулезная, часто сливающаяся сыпь (экзантема) с характерной динамикой (начиная с шеи и лица, она распространяется на тело и конечности) и тяжелая интоксикация, прежде всего высокая температура. Коревой вирус способствует возникновению аллергии, снижению общей и местной реактивности, что создает благоприятные условия для воздействия вторичной инфекции и развитию различных осложнений. Вирус кори подавляет функциональную активность Т-лимфоцитов, что приводит к развитию вторичного иммунодефицита.

В типичных случаях корь продолжается в течение 7-11 дней, из которых 2-3 дня приходится на продромальный период и 5-7 дней на экзантемную фазу.

Осложнения возникают редко. Чаще всего (5-15%) это вторичные бактериальные инфекции – средний отит, синуситы, бронхопневмонии. В редких случаях вирус проникает в ЦНС (1 из 1000-2000 заболевших), вызывая энцефаломиелит. Он смертелен для 5-30% детей; у 20-40% выживших остаются тяжелые последствия (глухота, умственная отсталость, приступы судорог). Следствием прямой вирусной агрессии может быть интерстициальная пневмония (множественные очаги симпластобразования в легких), которую особенно тяжело переносят дети до 1 года. Такого рода гигантоклеточная пневмония развивается на фоне иммунодефицитных состояний у детей в результате неконтролируемого размножения вируса и обычно фатальна. В некоторых странах мира корь до сих пор является одной из основных причин детской заболеваемости (38 млн детей в мире) и смертности (800 тыс. детей в мире ежегодно). Большинство случаев приходится на экономически отсталые страны, где до сих пор не налажена масштабная вакцинация.

В редких случаях (6-22 случаев на 1 млн. заболевших) вирус может персистировать в лимфоидных тканях и нейронах ЦНС и через несколько лет после перенесения заболевания (5-15 лет) может развиваться подострый склерозирующий панэнцефалит – медленно прогрессирующее (прогрессирует в течение 6-9 мес., иногда 3-х лет)

дегенеративное заболевание со смертельным исходом на фоне двигательных психических расстройств (происходит гибель нейронов).

Вирус кори способен проникать через плацентарный барьер, но данные о последствиях внутриутробного инфицирования противоречивы. Пороки развития и гибель плода, если и возникают, то лишь в первом триместре беременности. Тем не менее серонегативные беременные женщины, оказавшиеся в очаге коревой инфекции, должны быть под специальным наблюдением.

**ПАРОТИТ.** Инкубационный период при паротите - 7-25 дней (чаще 14-21 день). Входными воротами для возбудителя эпидемического паротита являются слизистые оболочки рта и носоглотки, где происходит размножение вируса (а также в регионарных (шейных) лимфоузлах) и последующее его проникновение в кровь с развитием первичной вирусемии. В период вирусемии вирус проникает в околоушные железы, яички, яичники, поджелудочную, щитовидную железы, в ЦНС и другие органы. Паротит и сопутствующие симптомы общей интоксикации сохраняются в течение 7-10 дней. После первичной вирусемии, фиксации и накопления вируса паротита наступает вторичная вирусемия, и, как следствие этого, органные поражения (паренхиматозная диффузия). Появляются клинические признаки поражения этих органов (панкреатит, менингит). После 15-го дня от начала болезни развитие новых органных поражений наблюдается редко, так как к этому периоду начинает активно действовать различные компоненты иммунной защиты. Организм очищается от возбудителя, наступает реконвалесценция. Примерно у трети больных паротит протекает субклинически или в атипичной форме.

Типичная форма заболевания проявляется как одно- и двухсторонний паротит, сопровождающийся лихорадкой. У мальчиков могут возникнуть орхиты, эпидиморхиты (регистрируют у 20-35% мальчиков в постпубертатном периоде), у девочек реже - оофориты, с последующим бесплодием. Как у взрослых, так и у детей паротитная инфекция нередко проявляется серозным менингитом. Правда, надо отметить, что, хотя менингиты при паротите проходят самостоятельно, однако поражение черепных нервов все равно чревато остаточными дефектами, в частности тугоухостью. Паротитные энцефалиты более редки, но всегда протекают с высокой лихорадкой, выраженными нарушениями сознания и очень часто также приводят к остаточным дефектам. При паротите возможна мозжечковая атаксия, поражение лицевого нерва, поперечный миелит, синдром Гийена-Барре, гидроцефалия. К редким проявлениям эпидемического паротита относится и ряд других осложнений - миокардит, мастит, тиреоидит, неврит, артрит, тромбоцитопеническая пурпура.

*Постинфекционный иммунитет при кори и паротите.*

После перенесенных кори и паротита развивается стойкий пожизненный иммунитет. Обеспечивается гуморальными и клеточными факторами. После перенесенного заболевания корью и в период реконвалесценции обнаруживаются комплементсвязывающие антитела и антигемагглютинины. После перенесенного заболевания паротитом и в период реконвалесценции обнаруживаются комплементсвязывающие и вируснейтрализующие антитела. Дети первых месяцев жизни не восприимчивы к кори и паротиту, поскольку у них имеются материнские антитела, которые сохраняются в течение полугода.

### **Лабораторная диагностика кори, эпидемического паротита: материал и методы.**

**КОРЬ.** При классическом течении кори диагноз не требует лабораторного подтверждения. Однако в случае беременности у женщин необходима дифференциальная диагностика кори от краснухи. Материалом для выделения вируса кори от больного служат кровь и носоглоточный смыв, который берут в период продромы и в первые 24-30 часов после появления сыпи. Также возможно исследование соскобов с элементов сыпи, мочу. Рекомендуется исследовать материал сразу после взятия от больного или до исследования хранить в замороженном состоянии при T-70°C.

Для экспресс-диагностики проводят выявление вирусных антигенов в эпителии носоглотки с помощью РИФ, либо РНК вируса в ПЦР.

Лабораторная диагностика кори в острой стадии заболевания основана на выделении вируса из крови и носоглоточного смыва больного в культурах клеток. Для выделения вируса используют 2-3 суточные культуры трипсинизированных почечных клеток эмбриона человека и перевиваемые культуры клеток амниона человека (штамм FL). Вирус кори из материала от больного вызывает в культуре клеток через 72-96 час после заражения, развития единичных вакуолизированных многоядерных гигантских клеток с наличием цитоплазматических включений. Через 7-9 дней после заражения обнаруживаются внутриядерные включения. Также может наблюдаться круглоклеточная дегенерация и образование веретенообразных клеток с цитоплазматическими и внутриядерными включениями. Для выявления внутриклеточных включений культуру клеток окрашивают по Романовскому-Гимзе. При этом вирусные включения окрашиваются в темно-розовый цвет, цитоплазма - в сиреневый цвет, ядра клеток - в синий, ядрышки - в фиолетовый. Для индикации используют феномен адсорбции эритроцитов обезьян на пораженных клетках. Гемадсорбция положительная в случае развития выраженной деструкции клеток. Для серологической идентификации выделенного вируса используются: метод

иммунофлюоресценции, реакция задержки гемадсорбции и реакция нейтрализации в культуре клеток с учетом результатов по гемадсорбции.

Для серодиагностики кровь забирают в первые дни болезни и спустя 10-14 дней и используются реакции: ИФА, РН, РСК, РТГА. Высокочувствительным методом, который позволяет обнаруживать низкие титры антител является ИФА. РН ставят в культурах перевиваемых клеток Нер-1, Нер-2, НВ, амниона человека. Реакцию ставят с 10 ЦПД<sub>50</sub> вируса кори.

В РСК в качестве антигена применяют экстракт культур клеток, зараженных возбудителем кори и подвергнутых после развития полной специфической дегенерации, трехкратному замораживанию и оттаиванию. Диагностическое значение имеет обнаружение четырехкратного и большего нарастания титра антител во второй сыворотке. В случае исследования одной сыворотки важно выявление антител класса IgM, которые выявляются у 70% больных к началу высыпаний и почти у 100% на 3-4-й дни сыпи.

ПАРОТИТ. Материалами для исследования на паротит являются слюна, СМЖ, моча, пунктаты околоушных желез, сыворотка крови. Применяют вирусологический метод диагностики. Вирус эпидемического паротита выделяют путем заражения куриного эмбриона или культуры клеток почек обезьян, эмбриона человека, морской свинки или HeLa. Наличие вируса в околоплодной жидкости определяют с помощью РГА с эритроцитами кур. При заражении вирусосодержащим материалом культуры клеток через 48-72 часа отмечается наличие шилоядерных гигантских клеток с наличием цитоплазматических включений. В дальнейшем происходит полная деструкция клеточного пласта с отслоением дегенерировавших клеток от стекла.

Для идентификации выделенного в культуре клеток вируса паротита используются: РИФ, РН, РТГА, РСК. При отсутствии цитопатических изменений в культуре клеток проводят последующие пассажи. Отрицательный ответ выдается после 3 пассажей.

Чаще всего проводят ретроспективную диагностику - выявление нарастания титра антител в парных сыворотках. Для серодиагностики паротита в стадии реконвалесценции чаще всего используют ИФА, РТГА и РСК при исследовании парных сывороток. Антигеном в обеих реакциях могут служить нативные околоплодные жидкости куриного эмбриона, зараженные вирусом паротита. В обеих реакциях применяется антиген с гемагглютинирующей активностью 1:16 и выше. Также можно использовать РН в первичных или перевиваемых культурах клеток с 10 ЦПД<sub>50</sub> вируса паротита. Высокочувствительным методом, который позволяет обнаруживать низкие титры антител является ИФА. Во всех реакциях диагностическое значение имеет обнаружение четырехкратного и более прироста антител во второй сыворотке.

### **Специфическая профилактика кори, эпидемического паротита.**

Корь и паротит относятся к управляемым инфекциям, и основным методом борьбы с ними служит, прежде всего, вакцинация, особенно в детском возрасте. Весь мировой опыт показывает, что специфическая профилактика - наиболее мощный, безопасный, эффективный и экономически выгодный метод борьбы с инфекционными заболеваниями вирусной этиологии. Специфическая профилактика кори в РФ проводится уже более 35 лет. Активная профилактика осуществляется в плановом порядке живой противокоревой сухой вакциной из штамма Л 16.

Первичная вакцинация начинается в возрасте 1 года 0,5 мл п/к. Ревакцинация детей осуществляется перед поступлением детей в школу. С 1990 года ревакцинируют только серонегативных детей на основе описанного обследования. С целью экстренной профилактики кори и купирования вспышки в организованных коллективах проводится срочная вакцинация всех контактных, у которых нет сведений о переболевании корью или вакцинации. Также предусматривается вакцинация детей, рожденных от серонегативных к кори матерей, не в 12 месяцев, а по истечении 2-х месяцев после третьей прививки АКДС - вакциной на 1 году жизни (в 8 месяцев и повторно через 6-10 месяцев).

Специфическая профилактика паротита в РФ проводится с 1981 г. Все эти годы население России прививают живой вакциной из отечественного штамма Л-3, разработанного А.А. Смородинцевым и соавт. Первичная вакцинация начинается в возрасте 1 года 0,5 мл п/к. Ревакцинация в 6 лет.

Эффективность вакцинопрофилактики коревой и паротитной инфекции зависит, прежде всего, от правильно выбранной стратегии и тактики, уровня охвата прививками и качества вакцинного препарата.

Для профилактики кори и паротита также существуют Тривакцины - «Приорикс» фирмы «Глаксо Смит Кляйн» (Великобритания); «MMR II» фирмы «Мерк Шарп и Доум» (США) - вакцины, приготовленные из аттенуированных вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи, лиофильно высушенных.

*Экстренная профилактика кори и паротита.* Вводить гамма-глобулин для экстренной профилактики кори и

паротита разрешается только тем контактными, у которых имеются противопоказания к прививке или детям, не достигшим прививочного возраста (не позднее 7-го дня инкубационного периода). Данные препараты не обеспечивают 100%-й защиты от инфекций, однако на его фоне заболевания протекают значительно легче.

### **Программа ВОЗ по глобальной ликвидации кори; участие в ее реализации РФ и Красноярского края.**

Заболеемость корью в Красноярском крае и в РФ низкая, достигает периодически нулевой отметки. Снижение заболеваемости достигнуто благодаря проведению активной специфической профилактики и внедрению программы ВОЗ о глобальной ликвидации данной инфекции, в т.ч. в РФ. Цель данной программы – элиминация кори и сертификация территорий, свободных от этой инфекции. Главные вопросы для реализации программы в России:

- Вакцинация и ревакцинация (соблюдение требований холодной цепи!)
- Обследование больных с подозрением на корь с любым экзантемным заболеванием
- Выявление эпидемиологических цепочек с определением генотипа

### **Краснуха морфобиологические особенности.**

Вирион имеет сферическую форму диаметром 40-70 нм.

Геном представлен однонитчатой, линейной, несегментированной инфекционной (плюс-нить) РНК с молекулярной массой  $4 \cdot 10^6$ .

Нуклеокапсид икосаэдрической формы (кубический тип симметрии), содержит РНК и капсидный белок. На поверхности вириона имеются выступы-пепломеры длиной 6-8 нм. Липидная оболочка вируса краснухи состоит из фосфолипидов и холестерина и формируется из плазматической мембраны зараженной клетки.

В состав вириона входит три вирусоспецифических полипептида: два оболочечных гликопротеина E1 и E2, составляющие пепломеры, и негликозилированный капсидный С-белок.

В состав нуклеокапсида входят многократно повторяющиеся молекулы структурного С-белка и ультраструктура, связанные с геномной РНК. Структурный белок E1 является гемагглютинином и содержит 481 аминокислотный остаток.

E2 – выполняет функцию рецептора при взаимодействии с клеткой (адгезия).

Геном вириона, т.е. РНК в репликативном цикле является матричной, т.е. служит для создания дочерних копий. Коэффициент седиментации составляет 38-40S. РНК вируса краснухи обладает инфекционными свойствами и в бесклеточной системе ведет себя как мРНК, т.е. для инициации инфекционного цикла в данном случае не требуются вирионные ферменты. На 3'-конце молекулы РНК вируса краснухи находится poly(A)-последовательность; 5'-конец «кэпирован» 7-метилгуазонином. Аналогичная структура концевых участков молекулы характерна для большинства эукариотических мРНК.

Антигенная структура вируса краснухи:

Вирус краснухи имеет два антигена. Один из них, внутренний антиген – нуклеопротеин, связанный с капсидом (выявляется в РСК), второй антиген, связанный с суперкапсидом, выявляется в реакции нейтрализации и РТГА.

Вирус представлен одним серотипом, обладающим гемагглютинирующей, гемолитической и слабовыраженной нейроминидазной активностью.

### **Культивирование и репродукция вируса в культуре клеток тканей.**

Вирус краснухи *in vitro* репродуцируется в первичных, диплоидных и перевиваемых клеточных культурах разного происхождения. Однако цитопатический эффект можно получить при использовании первичных культур клеток почек кролика, почек обезьян и амниона человека.

В пораженных клетках наступает дегенерация, появляются гигантские многоядерные клетки. Однако особенностью репродукции вируса краснухи является способность вызывать растительную продуктивную инфекцию клеток, которая может приобретать персистирующий характер. Этот тип инфекции в культуре клеток может сопровождаться формированием дефектных интерферирующих вирусных частиц. В ряде клеточных культур вирус краснухи способен образовывать бляшки. В процессе репродукции вируса инфицированные клетки приобретают устойчивость к суперинфекции другими вирусами.

Цикл репродукции в культурах клеток завершается за 12-15 ч. Репродукция вируса происходит в цитоплазме клеток, дальнейшее созревание вирионов происходит при почковании через мембрану пузырьков аппарата Гольджи, а

затем при выходе через наружную мембрану.

Особенности экологии, эпидемиологии краснухи.

Вирус краснухи термолабилен. Период термоинактивации при 56<sup>0</sup>С - 30 мин., при 100<sup>0</sup>С - 2 мин. Наличие в среде белка (сыворотка, альбумин), а также сульфата магния повышает устойчивость вируса к воздействию повышенных температур. При низких температурах (-60<sup>0</sup>-70<sup>0</sup>С) вирус хорошо сохраняется в течение нескольких лет. Оптимальное значение рН для проявления инфекционной активности: 6,8-8,1. Вирус чувствителен к действию многих детергентов, а также к УФ-излучению. При обработке ацетоном, эфиром или хлороформом инактивация вируса происходит в течение 10 мин. Он быстро инактивируется в патологическом материале при воздействии хлорсодержащих дезинфектантов и формалина.

Краснуха - антропонозное заболевание. Источником является больные, как с выраженной, так и со стертой формой краснухи, а также больные в латентном периоде и периоде реконвалесценции.

Основным источником являются дети, в том числе и новорожденные с врожденной краснухой, у которых возбудитель начинает выделяться из организма с 1-го месяца жизни и примерно до 2-х лет (в среднем до 6-ти месяцев).

Путь передачи - воздушно-капельный, реже контактный через инфицированные предметы, а также трансплацентарный. Вирус начинает выделяться через 7-8 дней после инфицирования (до появления сыпи) с секретом слизистых оболочек верхних дыхательных путей, а также с мочой и с фекалиями.

Краснуха распространена повсеместно: в Европе, Азии, Африке, Северной и Южной Америке, Австралии и в других странах мира. Уровень заболеваемости краснухой зависит от плотности и подвижности населения, поэтому в городах с большим количеством детских коллективов, а также со значительной миграцией населения и более высоким уровнем медицинского обслуживания городского населения заболеваемость краснухой выше, чем в сельской местности.

Для краснухи характерны периодические подъемы заболеваемости в крупных городах: умеренные - каждые 3-5 лет, более интенсивные - 7-9 лет. Также особенностью краснухи является выраженная осенне-весенняя сезонность, как в эпидемические, так и в межэпидемические годы.

Краснуха имеет склонность распространяться преимущественно среди тесно контактирующих групп населения: как среди детей, так и среди взрослых. Более восприимчивы к краснухе дети до 14 лет, пик заболеваемости приходится на детей 3-4 лет. Существенных различий в заболеваемости мальчиков и девочек в эпидемические и межэпидемические годы не отмечается. В эпидемические годы стали вовлекаться взрослые, особенно женщины детородного возраста. Особой группой риска являются беременные женщины.

Восприимчивость к инфекции среди азиатских женщин в 3 раза выше, чем среди женщин неазиатского происхождения.

### **Особенности патогенеза краснухи.**

Входными воротами при приобретенной краснухе являются верхние дыхательные пути, через которые вирус проникает в региональные лимфатические клетки шейных, затылочных и заушных желез, в которых начинается его первичная репродукция. Вначале происходит адсорбция на клетках, при этом способность вируса к адсорбции сильно зависит от рН среды и от отношения ионных зарядов на поверхности вируса и клетки. Далее происходит проникновение вируса в клетку путем эндоцитоза, репликация вирусной РНК, синтез структурных белков вируса, липидов, сборка и выход вируса.

Затем вирус проникает в лимфу и в кровь, где он обнаруживается за 3-4 дня до появления клинических симптомов заболевания. Благодаря вирусемии вирус краснухи распространяется по всему организму. Обладая лимфотропными и дермотропными свойствами, вирус вызывает изменения лимфатических узлов, которые увеличиваются в размерах уже в инкубационном периоде, а также поражения кожи. Вирусемия быстро прекращается после появления сыпи.

Клиническая картина краснухи

Типичная краснуха. Инкубационный период продолжается 14-21 день. Продолжительность продромального периода варьирует от нескольких часов до 1-2 сут. Выделяют типичные и атипичные формы краснухи.

При типичном течении краснухи характерны острое появление розовой пятнисто-папулезной сыпи без тенденции к слиянию (иногда сливные элементы появляются на лице), без зуда, не возвышающейся над поверхностью кожи, размером до 3-5 мм. Сыпь сначала появляется на лице, быстро распространяется по всему телу, особенно много элементов на спине, ягодицах, разгибательных поверхностях рук и ног. На ладонях сыпи не бывает. Почти

одновременно с распространением сыпь начинает угасать, полностью исчезает за 1-3 дня и не оставляет после себя ни пигментации, ни шелушения. Появлению сыпи предшествует увеличение заднешейных и затылочных лимфатических узлов. Поражение слизистых при краснухе незначительное, отмечается гиперемия конъюнктивы обычно без светобоязни; катаральные явления (насморк, кашель) выражены слабо, температура редко выше 38,5<sup>0</sup>С.

*Краснуха у подростков, взрослых и беременных женщин.* У подростков и взрослых, а также у беременных женщин заболевание протекает тяжелее. Продромальный период выражен отчетливей – характерны более высокая и продолжительная лихорадка (до 4 дней), выраженная интоксикация (часто сопровождается недомоганием, ознобом, разбитостью, болями в мышцах, бессонницей) и выраженный конъюнктивит со слезотечением и светобоязнью, насморком и болезненностью увеличенных лимфатических узлов, а также наблюдается более обильная папулезно-петехиальная сливная сыпь, носящая геморрагический характер. У взрослых краснуха нередко сопровождается артралгиями или более выраженными поражениями суставов (боли, припухание, иногда скопление выпота). В большинстве своем изменения суставов нестойкие, они появляются в конце экзантемного периода и исчезают в течение 1-2 недель без остаточных изменений, но иногда обратное развитие затягивается на месяцы.

*Беременность после краснухи.* Краснушная инфекция беременной женщины, которая привела к выкидышу или мертворождению, а также краснуха, перенесенная женщиной в детородном возрасте, может быть опасна и для последующей беременности, если между заболеваемостью и новым зачатием не прошло как минимум полгода. Было установлено, что вирус краснухи может сохраняться в организме человека после перенесенного заболевания до года.

Атипичные формы краснухи. Стертая форма. Протекает без лихорадки, без лимфаденопатии, без сыпи. Она проявляется субфебрилитетом, либо небольшими катаральными явлениями со стороны верхних дыхательных путей, либо сыпью, напоминающую аллергическую сыпь, но без интоксикации.

*Инаппарантная (бессимптомная) форма.* Клинически себя не проявляет, регистрируется по достоверно нарастающей динамике (четырёхкратное и более) уровня специфических антител при серологическом исследовании сыворотки крови.

Соотношение типичных и атипичных форм краснухи колеблется от 1:1-1:3 у детей, до 1:8 у взрослых.

*Осложнения после краснухи.* У детей редко. Однако известно, что перенесенная в детстве краснуха в 4% случаев может привести к развитию панкреатита, а впоследствии – к возникновению инсулинозависимого сахарного диабета. Наиболее серьезные осложнения у детей и в основном взрослых – поражение центральной и периферической нервной системы – энцефалит, периферические невралгии.

### **Врожденная краснуха. Тератогенность вируса краснухи.**

Синдром врожденной краснухи является следствием первичной инфекции женщины в период беременности. В первые недели беременности поражение эмбриона происходит через кровь матери и хорион во время общей вирусемии беременной. В дальнейшем, после формирования плаценты (14 недель беременности и позже), преобладает трансплацентарный характер заражения. При этом поражаются и некротизируются эпителиальные клетки, крови, хориона и эндотелий капилляров плаценты, откуда они в виде мельчайших эмболов вместе с вирусом заносятся в кровотоки плода. Не исключают возможность цитопатического действия вируса на ядра клеток миокарда, ушной улитки и некоторые отделы головного мозга, а также повреждения генетического аппарата клетки и появления аберраций хромосом.

#### *Результат поражения вирусом краснухи плода.*

Частота и степень поражения плода в значительной степени определяется сроком беременности в момент заражения. Чем меньше срок беременности, при котором женщина заболела краснухой, тем чаще и значительнее проявляются тератогенные действия вируса. Наиболее опасен первый триместр беременности, в период органогенеза, когда опасность заражения приближается к 100% (при этом наблюдают формирование множественных пороков). На более поздних сроках риск развития патологий составляет 30-50% (дефекты чаще бывают единичными).

По некоторым данным, у женщин, заболевших за 6-12 месяцев до зачатия, также может отмечаться внутриутробное инфицирование плода; это, очевидно, объясняется длительным сохранением вирусов и их антигенов в организме.

Поражения плода вирусом краснухи разнообразны, причем степень поражения не зависит от степени тяжести заболевания беременной.

Краснуха у беременных может иметь следующие последствия для плода: гибель плода, самопроизвольный аборт (10-40%); мертворождение (20%); ранняя неонатальная смертность (25 %); отсутствие воздействия на плод;

инфицирование плаценты и плода, причем действие вируса на плод может проявляться разнообразно – от поражения многих систем до бессимптомного течения.

Выделяют классический синдром врожденной краснухи – триада Грегга, это катаракта, глухота, врожденный порок сердца (на данный момент явление крайне редкое). Врожденная краснуха характеризуется генерализованным поражением многих органов и систем, и в большинстве случаев с формированием множественных неклассифицированных изолированных или системных пороков и аномалий развития. Наиболее частым является поражение центральной нервной системы: менингит, энцефалит, микро- и макроцефалия, микрополигирия, нарушение цитоархитектоники коры больших полушарий, дефект массы мозга, атрофия вещества головного мозга и др.

Из поражений сердечно-сосудистой системы отмечались различные пороки развития сердца и сосудов. Поражение ЖКТ, легочной системы, мочеполовой системы, костно-суставной системы, глаукома и др. В зависимости от сроков гестации, на которых произошло инфицирование вирусом краснухи, различают инфекционные бластопатии, эмбриопатии, фетопатии.

### **Постинфекционный иммунитет при краснухе.**

После перенесенной инфекции формируется зачастую напряженный, преимущественно гуморальный, иммунитет. В сыворотке крови обнаруживаются вируснейтрализующие (ВН), комплементсвязывающие антитела (КС), а также антигемагглютинины (АГА). Первыми появляются АГА – за 2-3 дня до начала высыпаний. Эти антитела достигают максимального уровня через 2-3 недели и могут определяться в сыворотке крови на протяжении всей жизни, хотя уровень их со временем понижается. ВН антитела появляются в период высыпаний, достигают максимума через 2-3 недели и сохраняются пожизненно. КС антитела появляются в сыворотке крови через 1-2 месяца, после чего постепенно исчезают.

*Популяционный иммунитет.* Формирование популяционного иммунитета завершается к 13-16 годам, а после 25 лет намечается тенденция к снижению уровня антител. Т.к. в детском возрасте болеют не все дети, то при формировании естественного иммунитета в каждой возрастной группе имеется определенное количество серонегативных лиц, и число серопозитивных лиц в популяции никогда не достигает 100%. При этом особенно важным является определение доли серонегативных лиц среди женщин детородного возраста. Она колеблется от 8 до 30% и более, что создает эпидемиологическую опасность возникновения вспышек.

*Образование различных классов иммуноглобулинов. При первичной краснухе.* При первичной инфекции специфические антитела представлены классами IgG и IgM. В начале заболевания, в течение первых 5-6 дней IgM – антитела преобладают над IgG-антителами и затем определяются в сыворотке крови в течение 20-30 дней. Уровень специфических IgG-антител достигает пика через 3-4 недели и остается высоким на протяжении нескольких месяцев, и даже лет. В среднем специфические IgM – антитела циркулируют в крови на протяжении 60 дней, но могут определяться в сыворотке крови и через 100 дней. В отдельных случаях IgM – антитела выявляли в течение 2-3-х лет после заболевания.

*При реинфицировании* специфические антитела представлены исключительно IgG-антителами. При этом нарастание титров краснушных антител начинается раньше (через 8-10 дней после контакта с больным) и происходит быстрее, чем при первичной инфекции. В дальнейшем, как правило, наблюдается тенденция к быстрому падению уровней специфических антител.

### **Реинфицирование вирусом краснухи.**

Многие исследователи отмечали факт реинфицирования лиц, долгие годы не имевших контакта с больными краснухой и следовательно уровень иммунитета у них может снижаться и при повторной встрече с вирусом краснухи может произойти реинфицирование. Реинфицирование в подавляющем большинстве случаев не сопровождалось какими-либо клиническими проявлениями, и единственным признаком являлся рост титра антител.

### **Материалы и методы лабораторной диагностики.**

Материалами для исследования могут быть носоглоточные смывы (при наличии катаральных явлений), кровь до появления сыпи, моча, кал после появления сыпи, сыворотка крови.

Методы лабораторной диагностики могут быть разделены на две группы: прямые, позволяющие выявить вирус краснухи или его антигены, и непрямые, позволяющие зарегистрировать специфический иммунный ответ у пациента на вирус.

Вирусологический метод диагностики с выделением вируса на модели чувствительных культур не нашел широкого распространения. Это связано с длительностью и трудностью адаптации вируса к клеточным культурам,

необходимостью проведения слепых пассажей для накопления вируса, вариабельностью проявления его цитопатического действия на клетки. Время исследования можно существенно сократить, если выявлять не вирус, а его антигены.

С этой целью может быть произведено радио- и энзиматические исследования; обнаружение вирусной РНК методом молекулярной гибридизации, использованием амплификации гена и с помощью ПЦР. Однако для лабораторной диагностики постнатальной краснухи используются в основном серологические методы, т.к. они более доступны и не ограничены периодом вирусыведения.

*Диагностика острой инфекции. Серологические методы диагностики.* Наиболее широко применяемой в целях диагностики острой инфекции является РТГА. В РТГА можно определить как IgG, так и IgM – антитела. Диагноз подтверждают исследованием парных сывороток крови больного, полученных с интервалом в две недели при наличии 4-х кратного увеличения титра АГА во второй пробе крови по отношению к первой. Поскольку в реакции выявляются АГА, которые начинают циркулировать в крови больного за 2-3 дня до начала высыпаний и сохраняются на протяжении всей жизни, РТГА можно использовать как для диагностики, так и для изучения популяционного иммунитета. Важным условием использования РТГА в диагностических целях является своевременное получение для исследования первой пробы крови – не позднее 10-го дня после установления контакта с больным острой краснухой. РТГА высокочувствительна и специфична, что позволяет использовать ее в качестве референс-теста при разработке новых диагностических препаратов. Долгое время РТГА оставалась основной реакцией для серологической диагностики краснухи, но она имеет ряд недостатков: - чувствительность к наличию неспецифических ингибиторов гемагглютинации ( $\beta$ -липопротеинов), которые необходимо удалять из каждой пробы перед постановкой реакции. Для этого используют каолин или смесь гепарина и хлорида марганца (обрабатывают сыворотку); - необходимость использования нативных эритроцитов. Эритроциты птичьего происхождения варьируют по своим характеристикам в зависимости от источника получения и условий содержания. Стабильность результатов м.б. повышена использованием трипсинизированных человеческих эритроцитов группы крови 0(I), т.к. они могут быть получены из надежного источника.

Существуют другие методы диагностики краснухи: РИФн, ИФА в разных модификациях, РНГА, метод радиального гемолиза и агглютинации латекса.

При использовании РИФн целесообразно исследовать парные сыворотки крови больных в острой и реконвалесцентных стадиях заболевания. Наличие низкого уровня специфических IgM-антител, при повышенном уровне титра специфических IgG-антител в сыворотке крови реконвалесцентов свидетельствует о недавно перенесенной краснухе. Метод РИФн имеет ряд недостатков: весьма трудоемким является процесс подготовки препаратов для мечения, лаборатории должны быть оснащены специальным микроскопом, и, наконец, результаты реакции могут быть оценены субъективно. Специфичность можно повысить, в частности, мечением антител хелатами редкоземельных металлов. РИФн имеет ряд неоспоримых преимуществ: реакция АГ-АТ не ограничена гемагглютинином; иммунофлюоресценция является тестом первичного связывания, независимым от вторичных феноменов, таких как нейтрализация, комплементфиксация и гемолиз.

Высокочувствительным методом, который позволяет обнаруживать низкие титры антител является ИФА. Их можно титровать традиционно, используя двойные разведения используемой сыворотки крови. Или, напротив, в одном разведении, оценкой степени поглощения иммунной метки, или путем сравнения тестируемой сыворотки с рядом стандартов. Сероконверсия или значительная величина титра антител, является несомненным подтверждением диагноза острой краснухи. Но если исследуемая сыворотка получена в поздние от начала болезни сроки, диагноз устанавливают по выявлению IgM-антител как показателе первичной инфекции. Выявление краснушных классами IgG-антител должно носить количественный характер, т.к. эти антитела определяются у подавляющего большинства взрослого населения.

Следует помнить, что благодаря высокой чувствительности ИФА может давать ложноположительные результаты. При определении специфических классами IgM-антител ложноположительные результаты м.б. обусловлены ревматоидным фактором.

Специфичность реакции может варьировать при использовании коммерческих наборов разных производителей. В некоторых случаях ИФА может давать перекрестно реагирующие реакции с IgM-антителами к цитомегаловирусу и парвовирусу В19.

Многие авторы рекомендуют использовать в сомнительных случаях несколько тестов.

*Дифференциальная диагностика первичной инфекции и реинфицирования.* Наиболее важным аспектом является проведение дифференциальной диагностики между бессимптомной формой первичной инфекции и реинфицированием. Особую значимость это представляет для беременных женщин. Бессимптомная форма краснухи протекает с вирусемией и представляет такую же опасность для плода, как и клинически выраженная краснуха. Реинфицирование вирусом сопровождается бустер-эффектом и, как правило, купируется во входных воротах

инфекции. Однако в отдельных случаях реинфицирование может принимать генерализованную форму. В литературе имеются сообщения о реинфицировании вакцинированных в прошлом против краснухи беременных женщин, у которых повторная встреча с вирусом привела к развитию инфекции по первичному типу.

Если первая сыворотка крови контактной по краснухе беременной женщины не содержит антител к вирусу, а во второй пробе крови обнаружена сероконверсия, подтверждение диагноза не представляет трудностей. Однако сыворотка крови может отражать не исходный уровень специфических антител.

Первичная инфекция сопровождается выраженным ответом специфических IgM-антител и м.б. использовано для подтверждения диагноза, установленного в РТГА. Однако в отдельных случаях IgM-антитела могут сохраняться в сыворотке крови на протяжении нескольких лет. Иммуный ответ на реинфекцию также может характеризоваться формированием IgM-антител, хотя и в меньшем количестве, чем при первичной инфекции. Эти различия легко устанавливаются, если сыворотка крови поступила на исследование во время, в обратном случае могут возникать трудности в интерпретации результатов. Кроме того, ИФА могут давать иногда ложноположительные реакции (влияние ревматоидного фактора), перекрестно реагирующие реакции с цитомегаловирусом и парвовирусом.

В связи с этим определяют специфические IgG1- и IgG3- подклассы антител. Но соотношение подклассов специфических IgG-антител не может служить четким диагностическим признаком в каждом конкретном случае.

Более существенные различия иммунного ответа на первичную инфекцию и реинфицирование удалось выявить при изучении степени avidности иммуноглобулинов. Был разработан метод ИФА, основанный на способности комплекса АГ-АТ, где специфические антитела представлены IgG с низкой avidностью, разрушаться под действием диэтиламина или мочевины. Комплексы антигена с высокоavidными антителами обладают устойчивостью к действию данных веществ.

В начале инфекции формируются низкоavidные краснушные IgG. В поздние сроки, начиная с 28-го дня заболевания, появляются высокоavidные антитела. Сыворотки реинфицированных лиц содержат высокоavidные антитела. Количественные критерии оценки avidности, которые определяются в процентных отношениях активности антител, оставшихся после обработки антител денатурирующим агентом, по отношению к исходной. Низкоavidные антитела характеризуются индексами avidности, не превышающими 30-40%, высокоavidные - 60-100%.

Однако в каждом конкретном случае верификация диагноза должна осуществляться по совокупности клинико-эпидемиологических данных и результатов нескольких лабораторных тестов.

*Дифференциальная диагностика краснухи от других заболеваний.* Диагноз краснухи часто устанавливается ошибочно, что нежелательно, в первую очередь, для беременных женщин. Краснуху приходится дифференцировать с заболеваниями, сопровождающимися высыпаниями, такими как корь, скарлатина, инфекционный мононуклеоз, экзантема Тшаммера, энтеровирусная и аденовирусная инфекции, сывороточная болезнь и аллергические реакции.

*Диагностика врожденной краснухи.* При инфицировании плода вирусом краснухи решающее значение имеет подтверждение диагноза в максимально короткие сроки, когда рождения ребенка с внутриутробной патологией можно избежать. Для ранней серологической диагностики внутриутробного заражения м.б. использована сыворотка крови из пуповины для обнаружения специфических IgM-антител. Однако выявление краснушных IgM-антител не всегда является своевременным.

Для диагностики врожденной краснухи используют также вирусологический метод - выделение вируса из околоплодных вод, ворсинок хориона, полученных от беременных женщин с помощью трансабдоминального амниоцентеза. Геном вируса краснухи выявляют методом иммунного блотинга и РНК-ДНК-гибридизацией, применяя ПЦР. Однако подобные исследования являются дорогостоящими и трудновыполнимыми. Поэтому наиболее часто диагностика врожденной краснухи основана на постнатальном подтверждении диагноза вирусологическими и серологическими методами.

Вирусология внутриутробной краснухи характеризуется высокой частотой выделения вируса из плаценты и различных органов плода. Вирус выделяется у детей с врожденной краснухой при жизни из отделяемого носоглотки, СМЖ, конъюнктивы, мочи, плаценты, пуповинной крови, испражнений и из различных органов при аутопсии.

В лабораторной диагностике врожденной краснухи наиболее широко применяют серологические методы. Исследуют пуповинную кровь новорожденного на наличие специфических IgM-антител, т.к. они не проходят через плаценту, а вырабатываются плодом в ответ на внутриутробное инфицирование начиная с 20-24 недель беременности. Также тестом, подтверждающим диагноз является обнаружение низкоavidных антител класса IgG. Лабораторным подтверждением диагноза является также стабильно высокий титр краснушных IgG-антител в сыворотке крови ребенка старше 6 месяцев, т.к. материнские антитела уже утрачиваются, а встреча с «диким»

вирусом краснухи еще маловероятна.

Однако важно, что у новорожденных с генерализованной хронической инфекцией в случаях массивной антигенной стимуляции часто отмечается иммунологическая толерантность (не способность продуцировать антитела), что затрудняет диагностику. Поэтому важно параллельно обследовать матерей.

Одним из предложенных методов диагностики врожденной краснухи является экспресс-диагностика - РИФн на выявление специфических антигенов используют в качестве исследуемого материала осадок мочи, испражнения, пуповинную и периферическую кровь.

Таким образом, подтверждение врожденной краснухи должно быть основано на результатах комплексного применения как минимум двух методов: вирусологического (выявление антигена вируса краснухи) и серологического (выявление специфических антител) у ребенка с внутриутробной патологией.

### **Специфическая профилактика краснухи.**

Существуют краснушные моновакцины - производства «Серум Инститьют» (Индия); «Рудивакс» фирмы «Авентис Пастер» (Франция); «Эрвевакс» фирмы «Глаксо Смит Кляйн» (Великобритания) - вакцины, приготовленные из аттенуированного вируса краснухи, полученного на диплоидных клетках человека, лиофильно высушенных.

Тривакцины - «Приорикс» фирмы «Глаксо Смит Кляйн» (Великобритания); «MMR II» фирмы «Мерк Шарп и Доум» (США) - вакцины, приготовленные из аттенуированных вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи, лиофильно высушенных.

Введение вакцины приводит к развитию вирусемии к 14-му дню, выделение вируса краснухи, в т.ч. из респираторного тракта, возможно в течение 3-4 недель, однако оно столь незначительно, что случаев инфицирования человека вакцинным штаммом не описано. Специфический иммунитет после введения вакцины у 95-98% привитых развивается через 15-20 дней и сохраняется длительно - 20 лет и более, однако достигаемый уровень специфических антител ниже, чем после перенесенного заболевания.

При вакцинации серопозитивных лиц с низким исходным уровнем специфических антител далеко не всегда отмечается выраженный их прирост в ответ на иммунизацию.

В России прививка против краснухи проводится в возрасте 1 года и 6 лет, помимо этого прививаются девочки в возрасте 13 лет.

0,5 мл вакцины вводят однократно подкожно или внутримышечно. За привитыми должно быть медицинское наблюдение через 30 мин., 24 часа и на 10-14-й день после введения.

Реакции встречаются редко, возможно увеличение затылочных, шейных и заушных лимфатических узлов, кратковременные сыпи, артралгии.

К доказанным осложнениям краснушной вакцинации относятся острые артриты, заканчивающиеся выздоровлением.

Инфицирование плода у привитых беременных женщин происходит нередко (около 10% случаев), однако никаких нарушений развития ни разу выявлено не было (данные о более чем 1000 беременных женщин). Поэтому не рекомендуется прерывать беременность женщинам, вакцинированным краснушной вакциной.

*Противопоказания к вакцинации.* Беременность - поскольку в случае рождения неполноценного ребенка трудно будет доказать отсутствие причинной связи этого события с вакцинацией; иммунодефициты; аллергия к аминокликозидам. При применении тривакцин противопоказанием является наличие анафилактической аллергии к белку куриного яйца.

Вакцинируемых женщин следует предупредить о необходимости избегать беременности в течении 3 месяцев; кормление грудью не является противопоказанием к прививке.

*Экстренная профилактика.* Использование иммуноглобулина человека для экстренной профилактики краснухи у беременных женщин в целях предупреждения тератогенного действия вируса не рекомендуется. Так как купировать вирусемии удавалось лишь в отдельных случаях и при использовании больших доз препарата. Неэффективность этого связана с ранним проникновением вируса в кровь, примерно на 7 дней опережающим клинические проявления болезни. То есть, введение иммуноглобулина является, как правило, запоздалой мерой.

## **5. Вопросы по теме занятия**

1. Классификация, морфо-биологическая характеристика вирусов кори и эпидемического паротита.

2. Особенности эпидемиологии, патогенеза и иммунитета при кори.
3. Лабораторная диагностика кори и эпидемического паротита: материал и методы.
4. Особенности лабораторной диагностики краснухи у контактных беременных женщин, новорожденных детей.
5. Специфическая профилактика кори, эпидемического паротита, краснухи.
6. Программа ВОЗ по глобальной ликвидации кори; результаты её реализации в РФ и Красноярском крае.

**6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

1. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ ПРИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ КОРИ:

- 1) ликвор;
- 2) смывы из носоглотки;
- 3) отделяемое конъюнктивы;
- 4) сыворотка крови пациента;
- 5) биоптат лимфоузлов;

2. ИСТОЧНИК ИНФЕКЦИИ ПРИ КОРИ:

- 1) больной;
- 2) вирусоноситель;
- 3) предметы обихода;
- 4) домашние животные;
- 5) пищевые продукты;

3. ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ КОРИ:

- 1) воздушно-пылевой;
- 2) алиментарный;
- 3) трансплацентарный;
- 4) воздушно-капельный;
- 5) трансмиссивный;

4. ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСА ПРИ ПРИОБРЕТЕННОЙ КРАСНУХЕ:

- 1) контактный;
- 2) трансплацентарный;
- 3) воздушно-капельный;
- 4) воздушно-пылевой;
- 5) алиментарный;

5. ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСА ПРИ ВРОЖДЕННОЙ КРАСНУХЕ:.

- 1) контактный;
- 2) трансплацентарный;
- 3) воздушно-капельный;
- 4) воздушно-пылевой;
- 5) алиментарный;

6. СВОЙСТВО ВИРУСА КРАСНУХИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЕ ЕГО ОПАСНОСТЬ ДЛЯ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН:

- 1) иммуногенность;
- 2) антигенность;
- 3) тератогенность;
- 4) онкогенность;
- 5) контагиозность;

7. МАРКЕРОМ ПЕРВИЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ КРАСНУХОЙ У КОНТАКТНЫХ ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) наличие IgM и нарастание титра IgG;
- 2) наличие ГЧЗТ;
- 3) отсутствие IgM и нарастание IgG;
- 4) высокая avidность антител;
- 5) выделение культуры вируса;

8. ВИРУС КОРИ ПРОЯВЛЯЕТ ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПО ТИПУ:

- 1) пролиферации;
- 2) деструкции;
- 3) симпластообразования;
- 4) вирогении;
- 5) рецепторного эндоцитоза;

9. СПОСОБ ИНДИКАЦИИ ВИРУСА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА:

- 1) реакция преципитации в геле;
- 2) реакция агглютинации на стекле;
- 3) реакция гемадсорбции;
- 4) реакция фаголизиса;
- 5) опсонофагоцитарная реакция;

**7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. Обследуемой «А» выставлен диагноз «Краснуха». Из анамнеза: беременность 7 нед., была в контакте с больным

краснухой. Результаты ИФА: сыворотка I – IgG 3,5 МЕ/мл; IgM отр; сыворотка II – IgG 201,0 МЕ/мл; IgM положит. Норма: IgG 10 МЕ/мл; IgM отр

**Вопрос 1:** Учтите и оцените полученные результаты;

**Вопрос 2:** С какой целью ставилась реакция?;

**Вопрос 3:** Рекомендуемая тактика в отношении данной пациентки?;

**Вопрос 4:** Какое свойство вируса краснухи представляет угрозу для плода?;

- 1) Так как во второй сыворотке (по сравнению с первой) происходит нарастание титра антител в 4 и более раз, а также появляются IgM, следовательно, у обследуемой серологически подтверждается диагноз «Краснуха»;
  - 2) С целью серодиагностики краснухи.;
  - 3) Учитывая высокий риск развития тяжелых пороков развития плода при заражении краснухой на раннем сроке, целесообразно рекомендовать прерывание беременности по медицинским показаниям;
  - 4) Вирус краснухи обладает тератогенным эффектом;
2. Беременной женщине со сроком 30 нед., не состоявшей на учете, было проведено обследование на краснуху. Результаты ИФА: сыворотка I – IgG 25,4 МЕ/мл; IgM положит.; сыворотка II – IgG 350,0 МЕ/мл; IgM положит. Норма: IgG 10 МЕ/мл; IgM отр.

**Вопрос 1:** Оцените полученные результаты.;

**Вопрос 2:** Ваши рекомендации по ведению данной пациентки?;

**Вопрос 3:** Специфическая профилактика краснухи;

**Вопрос 4:** Противопоказания к вакцинации;

- 1) Серологически диагноз «краснуха» подтвержден, т.к. при исследовании парных сывороток происходит нарастание титра IgG в 4 и более раз, а также имеются IgM;
  - 2) Учитывая срок беременности, рекомендовать наблюдение за состоянием плода и новорожденного. Риск развития врожденной краснухи невысок;
  - 3) Согласно национальному календарю прививок специфическая профилактика краснухи проводится живой вакциной. В случае планируемой беременности вакцина ставится за 3 месяца;
  - 4) Противопоказаниями к вакцинации являются - беременность, т.к. в случае рождения неполноценного ребенка трудно будет доказать отсутствие причинной связи этого события с вакцинацией; - иммунодефициты различного генеза; - аллергия к аминогликозидам; - при применении тривакцин наличие анафилактической аллергии к белку куриного яйца;
3. В населенном пункте в течение 2009-2010 г.г. не было зарегистрировано ни одного случая заболевания корью. Однако, в январе 2011 г. было зарегистрировано 9 случаев заболевания как среди детей, так и среди взрослых. При этом, большая часть заболевших – иммигранты из Узбекистана, а также в числе заболевших оказался врач «скорой помощи», который выезжал к больному ребенку

**Вопрос 1:** Чем можно объяснить столь низкие показатели заболеваемости кори до января 2011 г.;

**Вопрос 2:** По какой причине возникла данная вспышка;

**Вопрос 3:** Почему в эпидемический процесс был вовлечен врач «скорой помощи»;

**Вопрос 4:** Какие противоэпидемические мероприятия необходимо провести;

- 1) В последние 5 лет в Российской Федерации благодаря вакцинопрофилактике регистрируются чрезвычайно низкие цифры заболеваемости; в среднем этот показатель не стал превышать 2,3 случаев кори на 100 тысяч населения, в большинстве регионов достигая нулевой отметки. Такая поло-жительная динамика связана с проведением активной специфической профилактики кори и внедрением программы ВОЗ о глобальной ликвидации данной инфекции в мире, в т.ч. в РФ. Цель данной программы – элиминация кори в Российской Федерации к 2007 году и сертификация территорий, свободных от этой инфекции к 2010 году. Первый этап (2002-2004 гг.) – достижение повсеместной стабилизации показателей заболеваемости корью на спорадическом уровне на всех территориях России. Второй этап (2005-2007 гг.) – создание условий для предупреждения возникновения случаев кори и полного искоренения коревой инфекции в России. Третий этап (2008-2010 гг.) – сертификация территорий, свободных от кори. Массовая вакцинация детей живой коревой вакциной (ЖКВ), их ревакцинация перед поступлением в школу, а также проведение дополнительных прививочных кампаний на территориях риска и в группах риска способствовали неуклонному снижению уровня заболеваемости корью в России;
- 2) Заболевание имело завозной характер, однако возможной причиной заболевания среди других лиц является не достаточный охват прививками населения – менее 95% (вследствие отказа родителей от вакцинации своих детей, увеличением доли серонегативных лиц как до 35 лет, так и более) и обусловлено крайне высокой контагиозностью вируса кори – 100%. Также возможной причиной является не соблюдение требований «холодовой цепи» при хранении, транспортировке вакцин против кори, т.к. данные иммунобиологические препараты относятся к живым аттенуированным вакцинам;
- 3) Причиной, по которой врач скорой помощи был вовлечен в эпидемический процесс, является отсутствие ревакцинации от кори, что является не допустимым и не совместимым с выполнением его профессиональных обязанностей;
- 4) Необходимо обследовать всех возможных, находившихся в контакте с указанными больными. В местах скопления иммигрантов провести проверку неиммунизированных приезжих и выявить лиц, подлежащих иммунизации;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 17.** Лабораторная диагностика вирусных гепатитов В, С, Д, G, TTV. Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Парентеральные вирусные гепатиты глобально распространены, в ряде стран и регионов наблюдается рост заболеваемости. Экономический ущерб, наносимый вирусными гепатитами, очень высок, что и определяет их как серьёзную проблему не только здравоохранения, но и всего общества в целом. ВИЧ-инфекция привлекает к себе внимание как тяжелое заболевание человека, имеющее пандемическое распространение. Динамика распространения ВИЧ показывает, что медицинские и социально-нравственные проблемы связаны в единый узел. В настоящее время в нашей стране наблюдается выход ВИЧ-инфекции за пределы групп риска, что свидетельствует о неблагоприятной эпидемиологической ситуации. Своевременная постановка диагноза и начало терапии позволяют сохранить жизнь больному и уменьшить эпидемиологическую опасность для окружающих.

### **3. Цели обучения**

**- обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками охраны труда и техники безопасности, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

## **Классификация и морфобиологические свойства вирусов гепатита с парентеральным механизмом передачи.**

*Вирус гепатита В* входит в состав семейства *Hepadnaviridae*. Род *Orthohepadnavirus*.

1. Вирусные частицы ВГВ по морфологии подразделяются на 3 типа:

- сферические диаметром 42-45 нм (частицы Дейна), имеющие оболочку и электронноплотную сердцевину;
- тубулярные формы разной длины, но практически того же диаметра;
- полиморфные сферические со средним диаметром 22 нм.

Серцевина построена по типу кубической симметрии; вирус сложный - имеет внешнюю оболочку (суперкапсид) из белков и липидов. В состав вириона входят:

1. Циркулярная двунитевая ДНК: минус-нить ДНК полная, плюс-нить - неполная.
2. Наличие ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, которая в процессе репродукции вируса ликвидирует этот дефект, делая ДНК инфекционной.
3. Антигены: HBsAg поверхностный, высокоиммуногенен; HBeAg и HBeAg - сердцевинные антигены, маркеры активной репликации вируса и высокой ДНК-полимеразной активности; HBx-Ag - активатор экспрессии всех вирусных генов, усиливает синтез вирусных протеинов, играет особую роль в развитии первичной гепатокарциномы.

*Вирус гепатита С* включен в состав рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирус характеризуется высокой генетической изменчивостью, клинически значимыми являются 11 генотипов. В России наиболее распространены генотипы 1b, 3a, 2a, 2b, 1a; они характеризуются разной степенью чувствительности к противовирусным препаратам.

1. Мелкий (30-50 нм), сложный с кубическим типом симметрии
2. Однонитевая линейная +РНК.
3. Антигены: белки сердцевины (С - core protein), гликопротеины оболочки (E-envelope protein 1 и 2), неструктурные белки (NS1-NS5).

*Вирус гепатита D* принадлежит к семейству *Togaviridae* рода *Deltavirus*:

1. Мелкий (36 нм) сложный, дефектный, репродуцируется в присутствии помощника - вируса гепатита В.
2. Кольцевая однонитчатая РНК.
3. Антигены: Hdcore-Ag, HBs-Ag.

*Вирус гепатита G*: семейство *Flaviviridae*, род *Hepacivirus*.

1. Мелкий, сложный, с кубическим типом симметрии.
2. Однонитчатая линейная РНК.

*Вирус TTV (Transfusion Transmitted Virus)*: семейство *Circinoviridae*, род *Anellovirus*

1. Мелкий, сложный, с кубическим типом симметрии.
2. ДНК-содержащий.

**Резистентность вируса гепатита В:** Высокоустойчив в окружающей среде. Устойчив к высоким температурам (1 атм. (120°C) – 30-45 мин, сухой жар 180°C – 60 мин) и низким температурам, УФ лучам, дезинфектантам. При комнатной температуре инфекционность вируса сохраняется 3 мес., в холодильнике — 6 мес., в замороженном виде — 15-20 лет и в высушенной плазме крови — до 25 лет. При кипячении инактивация вируса достигается за время более 30 мин, в среде 1-2 % раствора хлорамина — через 2 ч, в 1,5 % растворе формалина — при 7-дневной экспозиции.

**Резистентность вирусов гепатита С, D, G, TTV:** чувствительны к дезинфектантам, УФ лучам; чувствительны к нагреванию свыше 50°C.

**Этапы изучения вирусных гепатитов. Историческая справка.** Как самостоятельные нозологические формы вирусные гепатиты были не сразу выделены среди других инфекционных заболеваний, сопровождающихся поражением печени. Ранее всего это произошло с инфекционным гепатитом, который получил самостоятельность со второй половины 19 века, благодаря работам выдающегося русского клинициста С.П. Боткина. К сожалению, в последующие годы инфекционный гепатит стали смешивать с другими заболеваниями (бактериальной природы) и лишь в конце 40-х годов был восстановлен приоритет Боткина, и болезнь стали обозначать, как инфекционный или эпидемический гепатит. Впоследствии, он получил название гепатита А.

Уже в середине прошлого столетия были накоплены многочисленные данные об эпидемическом распространении «катаральной» желтухе как в мирное время, так и, особенно, в связи с войнами (войны Наполеона), гражданская война в Северной Америке в 1861-1865 гг., франко-прусская война в 1870 г., англо-бурская война 1899-1902 гг.). Во время первой мировой войны эпидемии гепатита имели место во всех завоеванных странах, таким образом можно говорить о пандемии 1915-1922 гг. Вторая мировая война снова сопровождалась пандемией инфекционного гепатита, после которой эпидемическое распространение завершилось.

Сывороточный гепатит (В) был выделен в самостоятельную нозологическую единицу сравнительно недавно. А. Siirman (1885) описал массовое появление желтухи у фабричных рабочих после прививки против оспы человеческой лимфой в глицерине. Случаи появления желтухи против прививок против желтой лихорадки наблюдались в 1934 г. в Африке. В середине 60-х гг. В. Blumberg с соавторами (1965, 1969) опубликовали данные о новом антигене, который был обнаружен в с, а затем часто выявлялся у австралийских аборигенов, в связи с чем его назвали «австралийским антигеном». Позже было выяснено, что этот антиген является маркером сывороточного гепатита, а еще через 2 года были открыты вирусоподобные частицы (Дейна).

Длительное время были известны вирусные гепатиты: А, В, D и большая группа гепатитов ни А ни В. Долгое время диагностика парентерального гепатита ни А ни В была основана на диагностике на исключении маркёров известных гепатитов, особенностях клиники и эпидемиологии. Перед вирусологами и клиницистами возникла проблема в выявлении этиологического фактора сывороточного гепатита. В 1989 году Houghton и соавторы идентифицированы вирус гепатита С, который в группе гепатитов ни А ни В с парентеральным механизмом передачи имеет наибольший удельный вес. Благодаря многолетним исследованиям группы М. Houghton удалось сконструировать искусственный рекомбинантный антиген вируса и на этой основе разработать первую тест-систему для прямой индикации специфических антител методом ИФА.

Вирус гепатита D впервые был обнаружен в 1977 году М. Ризетто в ядрах гепатоцитов во время необычно тяжелой вспышки сывороточного гепатита в Южной Европе. Позднее его стали обнаруживать повсеместно. В результате проведенных исследований было установлено, что обнаруженный дельта-антиген связан с поверхностным антигеном вируса гепатита В (HbsAg); в печени, где обнаруживается этот антиген, всегда имеются воспалительные изменения, главным образом в виде хронического гепатита.

Этиология гепатита G была установлена в 1995 г.

Наличие вирусного гепатита TTV установлено в 1997 г.

### **Особенности экологии, эпидемиологии патогенеза и иммунитета при парентеральных гепатитах.**

При гепатитах В - G, TTV источники инфекции - больные люди (с любой формой инфекции); при гепатите D - больные хроническими формами гепатита В в сочетании с гепатитом D.

Основной путь передачи при гепатитах В,С,D,G, TTV - парентеральный (кровяно-контактный). Факторы и пути передачи:

1. Внутривенное введение наркотиков;
2. Инвазивные лечебно-диагностические манипуляции;
3. Половой;
4. Во время беременности (трансплацентарный), родов (вертикальный); возможна передача при грудном вскармливании.

Для заражения ВГВ достаточно  $10^{-6}$  мл инфицированной крови.

Группы риска:

- медицинские работники;
- наркоманы, вводящие наркотики внутривенно;
- лица, получающие гемотрансфузии, в т.ч. больные гемофилией;
- дети, рожденные от больных гепатитом женщин;
- половые партнеры больных парентеральными гепатитами.

*Инкубационный период при гепатите В:* 2-6 месяцев, в среднем 2-3 месяца.

*Инкубационный период при гепатитах С, G:* 2,5-13 месяцев (в среднем 5-5,5 месяцев)

*Инкубационный период при гепатите D:* 4-5 дней при коинфекции, 3-7 недель при суперинфекции.

**Патогенез гепатита В.** Современные взгляды на патогенез ВГВ - вирусогенетические. Основа взаимодействия - вирогенеза. Гибель гепатоцитов происходит под влиянием разных факторов. Внедрение вируса вызывает реакцию со стороны Т-лимфоцитов, направленную на распознавание и подавление возбудителя. При этом происходит дифференцировка субпопуляций Т-лимфоцитов. Последним этапом иммунной реакции является «киллерный» эффект с цитолизом инфицированных гепатоцитов. Таким образом, происходит избавление организма от возбудителя ценой гибели гепатоцитов.

Аутоиммунные механизмы цитолиза гепатоцитов обусловлены интерференцией вирусных белков и структурных субъединиц печеночных клеток. Появляются вирусиндуцированные компоненты клеток, которые распознаются Т-лимфоцитами, как «чужие», в результате гепатоцит становится «клеткой-мишенью». Внедрение и репликация вируса вызывают нарушения метаболизма в мембране гепатоцитов. Это приводит к дезорганизации структуры мембран, повышается проницаемость. В результате происходит задержка воды и набухание гепатоцитов. Процесс дезинтеграции мембран распространяется и на мембраны лизосом в результате чего выходят ферменты, приводящие к дальнейшему цитолизу и некробиозу клеток печени. Кроме этих звеньев патогенеза предпосылками для формирования хронических форм являются:

- внепеченочная репликация вируса, в частности, в клетках костного мозга и крови, лимфатических узлов и селезенки. Это способствовало пониманию многосистемности поражения;
- подавление обоих звеньев иммунитета (HbeAg);
- антигенная изменчивость (но не такая выраженная как у ВГС).

**Патогенез ВГD:** Основная особенность - развитие микстгепатита с поражением печени под влиянием 2-х гепатотропных вирусов. ВГD оказывает прямое цитопатическое действие на гепатоциты, также возможна экспрессия HDAg на мембране гепатоцитов, аутоиммунный ответ, цитолиз. Переход в хроническую форму при коинфекции (одновременном заражении HBV) возникает в 1-3% случаев; при суперинфекции (заражение HDV человека, инфицированного HBV) в 70-80% случаев.

**Патогенез ВГС:** Прямое ЦПД на гепатоциты, цитолиз. Внепеченочная репликация (в В-лимфоцитах и моноцитах), подавляет оба звена иммунитета, в результате чего возникает вторичный иммунодефицит. Однако, основное значение в персистенции вируса HCV, как его отличительной особенности, придается его изменчивости с образованием множества одновременно существующих антигенных вариантов - квазиразновидностей, которые обладают значительными возможностями к адаптации и избегают иммунологического надзора. Причем скорость мутаций существенно превышает скорость репликации. Это обуславливают переход инфекции в хроническую форму

в 50-80% случаев.

**Патогенез вирусного гепатита G** сходен с патогенезом ВГС. Сочетанный HGV и HCV приводит к прогрессированию процесса с последующим развитием хронического гепатита, цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы.

В патогенезе инфекции, вызванной вирусом **TTV**, имеет значение не только поражением печени, но и внепеченочная репликация вируса в клетках костного мозга, лимфоидной ткани, легких.

*Иммунитет* при ВГВ: при остром течении длительный напряженный, клеточно-гуморальный; в других случаях - малонапряженный. Иммунитет при ВГД: малонапряженный; при коинфекции возможно выздоровление и формирование напряженного иммунитета.

Иммунитет при ВГС: малонапряженный, не обеспечивает защиты.

Иммунитет при ВГГ и TTV: не изучен.

### **Материалы и методы лабораторной диагностики парентеральных гепатитов.**

Исследуемым материалом служат кровь, сыворотка крови обследуемых, при необходимости - биоптат печени.

Лабораторная диагностика основывается на выявлении:

- самого возбудителя (метод иммунной электронной микроскопии - ИЭМ);
- его антигенов (радиоиммунный, иммуноферментный, иммунофлюоресцентный методы - РИА, ИФА, ИФ);
- антител (РИА, ИФА) и классов иммуноглобулинов;
- ДНК или РНК вируса (ПЦР), в том числе определение количества копий нуклеиновой кислоты на единицу объема крови (вирусной нагрузки).

**РИА, ИФА.** Эти реакции обладают высокой чувствительностью и могут быть использованы как для определения антигенов, так и антител.

Принцип постановки один и тот же, с той разницей, что в РИА применяют специфические иммуноглобулины, меченные радиоактивными изотопами, а в ИФА - Ig G, маркированные ферментом (чаще пероксидазой хрена). В связи с этим учет РИА проводится в гамма-счетчике, а ИФА - на спектрометре после «проявления» пероксидазы специальными реактивами. При этом для определения антигена применяется прямая реакция, а для антител конкурентный вариант с учетом 50% точки нейтрализации показателей положительных контролей. Наибольшие удобства ИФА создаются за счет длительной сохранности меченого конъюгата (до 1 года) по сравнению с J (1,5 мес.) безопасности работы, возможности визуального учета результатов реакции.

**РИА** - основан на способности антител и антигенов сорбироваться на поверхности твердой фазы и регистрации результатов реакции в гамма-счетчике после внесения соответствующих меченых реагентов.

**ПЦР** - катализируемое ДНК-полимеразой многократное копирование определенного участка ДНК (РНК), основанное на возможности синтеза в искусственных условиях молекул нуклеиновых кислот с помощью праймера и необходимых нуклеотидных последовательностей.

**Диагностика ВГВ:** при остром ГВ, в преджелтушной и начальной фазе желтушного периодов в сыворотке крови обнаруживают HBsAg, HBeAg, HBV-DNA и IgM анти-HBc. В период разгара желтухи (через 1-1,5 мес. от начала заболевания) HBsAg, HBeAg и HBV-DNA выявляются непостоянно. С большим постоянством определяются IgM анти-HBc. В периоды угасания клинических проявлений и реконвалесценции обнаруживают IgM анти-HBc, анти-HBe, позднее - анти-HBc (total) и IgG анти-HBc. Персистенция HBeAg при отсутствии анти-HBe - прогностический признак хронизации инфекции.

**Диагностика ВГД:** острая коинфекция ВГВ/ВГД диагностируется при наличии у больного маркеров активной репликации ВГВ: HBsAg, HBeAg, HBV-DNA, IgM анти-HBc, и ВГД: HDVAg, IgM анти-HDV, HDV-RNA. Причем в первые 2 нед. заболевания в крови больных определяются HDVAg и HDV-RNA. С 10-15 дня болезни - IgM анти-HDV, а с 5-9 нед. - IgG анти-HDV. Острая суперинфекция ВГД (острый дельта-гепатит) может быть подтверждена наличием маркеров репродукции ВГД: HDV-RNA и IgM анти-HDV при отсутствии (или низком титре) IgM анти-HDc.

**Диагностика ВГС** основана на обнаружении суммарных антител, IgM и IgG к ВГС (анти-HCV) с использованием ИФА и иммуноблота, а также РНК ВГС (HCV-RNA) методом ПЦР. В обязательном порядке проводится молекулярное типирование с целью определения генотипа вируса. Особенностью является отсроченная сероконверсия и риск ложноположительных результатов ПЦР.

**Диагностика ВГВ и ТТV:** обнаружение вирусной нуклеиновой кислоты с помощью ПЦР, а также IgG к ТТV.

### **Специфическая профилактика и терапия парентеральных гепатитов.**

Для **специфической профилактики ВГВ** (и, одновременно, ВГD) используют рекомбинантные вакцины, содержащие HbsAg (Engerix B, регевак и др.). Массовая иммунизация – важнейший компонент борьбы с инфекцией, и в настоящее время вакцинация против ВГВ включена в календарь профилактических прививок. **Проблемы специфической профилактики ВГС:** В настоящее время специфическая профилактика ВГС не разработана, так как создание вакцин осложняется генетической разнородностью вирусной популяции и высокой частотой мутаций.

Традиционная схема **терапии** хронических парентеральных гепатитов включает использование препаратов интерферона:

- «короткие» интерфероны - интерфероны альфа-2а;
- «длинные» интерфероны (пегилированные) – пэгинтерферон альфа-2а и альфа-2b.

В настоящее время для лечения ВГВ также используются аналоги нуклеозидов, ингибирующие вирусную ДНК-полимеразу (ламивудин и т.д.).

Схема лечения ВГС зависит от генотипа вируса. Современные препараты для лечения ВГС отличаются более высокой эффективностью (достигающей 100% - полной излеченности) и лучшей переносимостью; к ним относятся:

- ингибиторы NS3/4A протеазы (боцепревивир и др.);
- ингибиторы NS5A-белка (даклатасвир);
- ингибиторы NS5B-полимеразы.

### **Неспецифическая профилактика парентеральных гепатитов:**

- выявление вирусоносителей среди доноров;
- уменьшение числа случаев прямого переливания крови;
- качественная стерилизация и дезинфекция;
- использование одноразовых шприцов и т.д.;
- индивидуальные средства личной гигиены;
- защищенный секс;
- санитарно-просветительная работа;
- борьба с наркоманией.

### **Классификация вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).**

Впервые СПИД был зарегистрирован как особое инфекционное заболевание человека в 1981г. Центром по контролю за болезнями в Атланте (CDC) были получены сообщения о высокой частоте выявления у гомосексуалистов необычной формы пневмонии, вызванной условно-патогенными грибами *Pneumocystis carim*. Ранее это заболевание встречалось редко-при врожденном иммунодефиците или при иммуносупрессии, вызванной ионизирующим излучением, приемом цитостатиков. Выявленные больные не подвергались воздействию иммуносупрессивных факторов. Одновременно были зафиксированы множественные случаи необычной и редкой формы злокачественной опухоли - саркомы Калоши. Было установлено, что помимо пневмонии и саркомы Капоши у таких больных развиваются инфекции, вызываемые условно – патогенными бактериями, вирусами, грибами, простейшими и гельминтами. Все это свидетельствовало о том, что появилось новое заболевание, характеризующееся подавлением клеточного и др. звеньев иммунитета. В 1982г. это заболевание получило название “AIDS”, что в переводе на русский СПИД. Поиски причины заболевания велись в различных направлениях. Большинство исследователей предполагали инфекционную природу СПИДа. В 1983г. вирус был открыт почти одновременно группами ученых под руководством Люка Монтанье (Франция, институт Пастера) и Роберто Галло (Национальный раковый институт, США). В связи с тем, что первый вирус был выделен от больного страдавшего генерализованной лимфаденопатией (LAV) американцы назвали его Т-лимфотропным человеческим вирусом III типа (“HTLV-III”), т.к. I и II типы этих вирусов вызывают лейкозы и др. злокачественные заболевания крови. В 1986г. эксперты ВОЗ дали вирусу название – «вирус иммунодефицита человека» (ВИЧ-НIV).

ВИЧ относится к сем. *Retroviridae*, род *Lentivirus*.

Различают два основных подтипа вируса: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. В РФ в основном распространен ВИЧ-1.

### **Морфология, антигенное строение, культивирование, резистентность ВИЧ.**

Вирионы ВИЧ имеют сферическую форму со средним диаметром 100-140 нм. ВИЧ обладает типичной для всех

ретровирусов поверхностной мембраной (сложный вирус) и содержит характерную сердцевинную часть палочковидной или конической формы.

Сердцевина вириона содержит нуклеопротеид со спиральным типом симметрии. Нуклеопротеид окружен белковой мембраной (p24). В состав сердцевины входит обратная транскриптаза. Сердцевина окружена двойной мембраной, которую вирус приобретает при прохождении через клеточную оболочку. Оболочка вируса содержит gp120 и gp41, образующие шипы в виде барабанных палочек и играющие роль рецепторов при взаимодействии с клетками-мишенями.. Белок p17 прилежит к внутренней стороне к оболочке вируса.

Основными антигенами ВИЧ являются:

- gp120 и gp41 - гликопротеины суперкапсида (взаимодействие с CD-4 рецепторами), кодируются генами *env*;
- p24 - протеин капсида, p17 - матриксный белок (кодируются генами *gag*);
- p7 и ферменты вируса - обратная транскриптаза, интегразы и протеазы (нуклеокапсид) - кодируются генами *pol*.

Вирус отличается высокой антигенной изменчивостью в связи с высокой частотой ошибок обратной транскрипции, поэтому в организме одного пациента может одновременно присутствовать множество антигенных вариантов ВИЧ.

### **Источники инфекции, пути передачи, особенности патогенеза и иммунитета при ВИЧ-инфекции.**

*Источники инфекции.*

ВИЧ-инфекция - антропоноз с парентеральным механизмом передачи. Вирус находится в крови, сперме, влагалищном секрете, слюне, слезах, поте, грудном молоке инфицированных людей. При этом слюна, пот и слезная жидкость содержат вирус в небольшой концентрации, недостаточной для заражения.

*Пути передачи:*

- половой (наиболее высок риск инфицирования при аногенитальных половых контактах);
- от матери к ребенку (трансплацентарный, во время родов, при грудном вскармливании);
- лечебно-диагностические манипуляции (ИСМП - HAI);
- в/в наркотиков.

В соответствии с описанными путями передачи возбудителя эпидемиологический анализ позволяет выявить несколько групп повышенного риска заболевания ВИЧ-инфекции:

- лица, употребляющие инъекционные наркотики, а также их половые партнеры
- лица, практикующие незащищенный секс (при любых формах половых контактов)
- медицинские работники
- реципиенты донорской крови

В настоящее время, учитывая неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию по ВИЧ-инфекции в нашей стране, понятие "группы риска" утрачивает свою актуальность. Россия находится на стадии «генерализованной эпидемии» ВИЧ. Есть два признака, по которым ВОЗ признаёт переход из концентрированной в генерализованную стадию. Первый признак - это переход из концентрированной группы в общую популяцию. Второе - это устойчивое наличие одного процента беременных женщин. Генерализованная стадия - это последняя крайняя стадия эпидемии.

*Патогенез заболевания.*

При попадании в организм человека вирус поражает клетки-мишени, несущие CD4-рецепторы, а также хемокиновые рецепторы CCR5, CXCR4. В первую очередь вышеперечисленными рецепторами обладают CD лимфоциты (хелперы). Также данные рецепторы могут присутствовать на мембране других клеток: моноцитов, макрофагов, дендритных клеток. Хемокиновыми рецепторами обладают астроциты и питательные клетки. После попадания вируса в клетки-мишени начинается его активная репродукция, либо длительная персистенция. Пораженный организм в результате нарушения клеточного звена иммунитета не способен защищаться от оппортунистических инфекций и элиминировать собственные измененные клетки, что приводит к развитию оппортунистических заболеваний и опухолевому росту. При клинически выраженной ВИЧ-инфекции снижается активность всех звеньев иммунитета.

*Репродукция вируса.* Вирус адсорбируется на поверхности клеток. Процесс адсорбции определяется поверхностными gp120 и gp41 специфически взаимодействующими с CD4 и хемокиновыми рецепторами.

В месте контакта вируса с клеточными рецепторами в мембране клетки появляются углубления, затем замкнутые везикулы, содержащие вирус. В составе везикул ВИЧ транспортируется в цитоплазму. Процесс называется

опосредованный рецепторный эндоцитоз.

В цитоплазме высвобождается вирусная РНК. РНК служит матрицей для образования комплементарной односпиральной ДНК под влиянием обратной транскриптазы. Затем РНК вируса расщепляется, а к молекуле ДНК достраивается вторая нить.

Двухспиральная ДНК (провирус) перемещается в ядро клетки, где переходит в кольцевую форму, способную интегрироваться с хромосомной ДНК. Копии провирусной ДНК не интегрируются в геном, а принимают участие в развитии цитопатогенного действия.

Интегрированная в геном ДНК способна к транскрипции в информационные вирионные РНК. РНК-копии перемещаются в цитоплазму, где по ним, как по матрицам, на рибосомах синтезируются вирусные белки.

Из белков и РНК формируются вирионы, которые покидают клетку «почкованием», захватывая липидный материал из клеточной мембраны. В момент интенсивного отпочковывания вирионов в мембране образуются «дырки», клетка не успевает восстановить целостность мембраны, что является причиной ее гибели.

*Иммунитет.* Антитела к вирусу начинают выявляться через несколько недель после заражения (сразу после развития мононуклеазоподобной лихорадки) и сохраняются пожизненно. Вируснейтрализующей активностью обладают антитела к гликопротеинам gp41 и gp120. Высокая степень мутации вируса (антигенный дрейф – особенно высокая генетическая изменчивость в районе гена, кодирующего оболочечные антигены) делают существующие антитела неэффективными, заставляя иммунную систему всякий раз перестраиваться, чтобы дать специфический ответ.

### **Материалы и методы лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции**

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции включает:

- Основной метод - серологический: выявление противовирусных антител/антигена p24 в крови обследуемого; выявление антигена позволяет сократить "период окна" примерно на пять дней, по сравнению с тест-системами третьего поколения.
- Серологическая диагностика проводится в 3 этапа:

1 этап - скрининг - выявление суммарного спектра антител к ВИЧ/p24-антигена ВИЧ с помощью ИФА.

2 этап - референтное исследование - первичные положительные образцы повторно тестируют в ИФА с другой тест-системой.

3 этап - арбитражное (экспертное) исследование методом иммунного блоттинга (выявление антител к отдельным антигенам ВИЧ); в случае отрицательного результата определение p24 с помощью ИФА.

- Генодиагностику: выявление нуклеиновой кислоты вируса в крови обследуемого (ПЦР) с последующим генотипированием, определение вирусной нагрузки.

### **Профилактика и терапия ВИЧ-инфекции на современном этапе.**

#### **Терапия.**

Главным условием успеха в борьбе с вирусом является широкий охват инфицированных антиретровирусной терапией, отмечается в докладе Объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС).

Новый набор целевых показателей, которые необходимо достичь чтобы остановить эпидемию, включает достижение цели 90-90-90: 90% людей, живущих с ВИЧ, знают о своем ВИЧ-статусе; 90% людей, знающих о своем ВИЧ-положительном статусе, находятся на лечении; и 90% людей, находящихся на лечении, добились подавления вирусной нагрузки.

Всем ВИЧ-инфицированным (при снижении количества CD4 менее 500 кл/мл), беременным женщинам и детям проводится ВААРТ - высокоактивная антиретровирусная терапия (комбинация 3-х и более противовирусных препаратов).

Пациенты, находящиеся на противовирусной терапии, при условии ее эффективности, не представляют эпидемиологической опасности для окружающих, т.к. вирусная нагрузка у них минимальна.

Группы препаратов:

- Ингибиторы обратной транскриптазы
- Ингибиторы протеазы
- Ингибиторы интегразы
- Антагонисты рецепторов
- Ингибиторы слияния

Также проводится симптоматическая терапия, направленная на лечение оппортунистических и вторичных инфекций, опухолей и патогенетическая терапия, связанная с поражением иммунной системы, ЦНС.

**Специфическая профилактика.** Эффективных вакцин, обладающих высокой иммуногенностью в сочетании с безопасностью, не существует.

Возможна постконтактная профилактика ВИЧ, начатая в течение 72 часов после предполагаемого заражения, с использованием противовирусных препаратов в ситуации предполагаемого инфицирования (незащищенный половой контакт - Трувада, аварийные ситуации во время хирургических вмешательств у медицинских работников - полноценная схема ВААРТ). В обязательном порядке проводится перинатальная профилактика ВИЧ всем ВИЧ-инфицированным беременным.

**Неспецифическая профилактика.** Основное внимание уделяется неспецифической профилактике распространения ВИЧ. Социальные профилактические меры должны включать всеобщее обследование населения на ВИЧ, обеспечение противовирусными препаратами всех нуждающихся, контроль приема пациентами противовирусных препаратов, борьбу с наркоманией.

Персональная профилактика заражения: барьерная контрацепция (использование презервативов); знание своего ВИЧ-статуса и статуса полового партнера/супруга (систематическое обследование на ВИЧ). ВИЧ-инфицированным женщинам запрещено кормить грудью детей.

**Профилактика профессионального заражения медицинских работников:** работа в перчатках, использование масок, очков (щитков) при хирургических вмешательствах, в случае возникновения аварийной ситуации (порез, прокол, попадание крови и др. биологич. жидкости на слизистую глаз, носа, ротоглотки, поврежденные кожные покровы) - принятие всех необходимых профилактических мер.

## 5. Вопросы по теме занятия

1. Проблема профилактики и терапии ВИЧ-инфекции на современном этапе.
2. Особенности репродукции возбудителя ВИЧ-инфекции
3. Специфическая профилактика и терапия парентеральных гепатитов.
4. Материал и особенности лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции.
5. Материалы и методы лабораторной диагностики парентеральных гепатитов В, С, D, G, TTV.
6. Особенности эпидемиологии, патогенеза и иммунитета при ВИЧ-инфекции.
7. Эпидемиология, особенности патогенеза и иммунитета парентеральных гепатитов В, С, D, G, TTV.
8. Классификация, морфология, антигенное строение ВИЧ.
9. Классификация, морфология и антигенное строение вируса гепатита В.
10. Неспецифическая профилактика парентеральных гепатитов и ВИЧ.

## 6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов

1. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР АКТИВНОЙ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В:
  - 1) HBsAg;
  - 2) HBcAg;
  - 3) анти-HBe;
  - 4) HBeAg;
  - 5) анти-HBs;
2. АКТИВНАЯ СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ГЕПАТИТА В:
  - 1) антибиотики;
  - 2) интерферон;
  - 3) рекомбинантные вакцины (Engerix B и др.);
  - 4) витамины;
  - 5) иммуноглобулин;
3. ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В ИСПОЛЬЗУЮТ:
  - 1) антибиотики;
  - 2) интерферон;
  - 3) рекомбинантные вакцины;
  - 4) аутовакцины;
  - 5) иммуноглобулин;

4. ОСНОВНОЙ ПУТЬ УСКОЛЬЗАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С ОТ ИММУННОГО НАДЗОРА:
- 1) вирогения;
  - 2) персистенция в ЦНС;
  - 3) высокая антигенная изменчивость;
  - 4) репликация вируса в моноцитах;
  - 5) низкая иммуногенность;
5. ПЕРВООТКРЫВАТЕЛИ ВИЧ:
- 1) Мюллис Кэри Б. (1983);
  - 2) Р. Галло, Л. Монтанье (1983);
  - 3) М. Ризетто (1977);
  - 4) М. С. Балаян (1983);
  - 5) Л. А. Зильбер (1935);
6. РЕЦЕПТОР КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ДЛЯ ВИЧ:
- 1) CD 22;
  - 2) CD 19;
  - 3) CD 8;
  - 4) CD 4;
  - 5) CD 3;
7. ПЕРВИЧНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ:
- 1) пневмоцистная пневмония;
  - 2) генерализованная цитомегаловирусная инфекция;
  - 3) атипичный микобактериоз;
  - 4) лимфаденопатия;
  - 5) брюшной тиф;
8. ПРИ СКРИНИНГОВОМ ОБСЛЕДОВАНИИ НА ВИЧ ПРОВОДИТСЯ:
- 1) выделение вируса in vitro;
  - 2) выявление специфических антител;
  - 3) определение РНК вируса;
  - 4) определение ГЧЗТ;
  - 5) биологическая проба;
9. ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕСТ, ДОСТОВЕРНО ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ ДИАГНОЗ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ:
- 1) клинический анализ крови;
  - 2) ИФА;
  - 3) иммунограмма;
  - 4) иммуноблоттинг;
  - 5) исследование на дисбактериоз кишечника;
10. СРЕДНЯЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА «СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОКНА» ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ:
- 1) 8 мес.;
  - 2) 1,5-3 мес.;
  - 3) 6-12 мес.;
  - 4) 1-2 года;
  - 5) 7-10 дней;
- 7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов**

1. От ВИЧ-инфицированной женщины родился доношенный ребенок массой 3450 г. Во время беременности антиретровирусную терапию женщина не получала (отказывалась). Является ВИЧ-диссиденткой, отрицает существование ВИЧ/СПИДа. Планирует кормить ребенка грудью.

**Вопрос 1:** Какие исследования необходимо провести для подтверждения/опровержения наличия ВИЧ-инфекции у ребенка?;

**Вопрос 2:** В каком возрасте, в случае получения отрицательных результатов, допустимо снятие ребенка с диспансерного учета по ВИЧ-инфекции?;

**Вопрос 3:** Возможна ли передача ВИЧ при грудном вскармливании?;

**Вопрос 4:** Профилактика и терапия ВИЧ-инфекции.;

1) Для ранней диагностики ВИЧ у детей применяется молекулярногенетический метод (ПЦР): выявление ДНК провируса ВИЧ в крови в первые 48 часов жизни, в 1-2 и 4-6 месяцев. Плановые серологические исследования (ИФА) проводятся при рождении, в 9, 12 и 15-18 месяцев; это связано с тем, что материнские противовирусные антитела могут присутствовать в крови ребенка до 1 года и более.;

2) В случае отсутствия грудного вскармливания снятие с учета проводится в возрасте старше 12 месяцев, при условии как минимум двух отрицательных результатов ПЦР и двух отрицательных результатах серологического исследования, полученных с интервалом не менее 1 месяца. При грудном вскармливании снятие ребенка с учета проводится по тем же критериям в срок более 12 месяцев с момента окончания вскармливания;

3) Возможна, вероятность велика. Детям, рожденным ВИЧ инфицированными матерями, рекомендуется

искусственное вскармливание.;

4) Экстренная терапия направлена на подавление репродукции, блокирование обратной транскрипции.

Патогенетическая: иммуномодулирующая, иммунозаместительная, симптоматическая.;

2. В стационар поступила девушка-подросток 16 лет с предварительным диагнозом «Гепатит». Отмечается желтушность кожных покровов и склер, увеличение печени, моча окрашена в темный цвет (цвет пива). На руках и ногах по ходу вен – множественные багрово-синюшные следы от инъекций. Иммуноферментный анализ на HBsAg дал отрицательный результат.

**Вопрос 1:** Ваши предположения по поводу этиологии заболевания.;

**Вопрос 2:** Какова должна быть тактика врача-инфекциониста?;

**Вопрос 3:** Укажите материал для исследования и методы микробиологической диагностики.;

**Вопрос 4:** Специфическая профилактика парентеральных гепатитов.;

1) Ваши предположения по поводу этиологии заболевания.;

2) Какова должна быть тактика врача-инфекциониста?;

3) Укажите материал для исследования и методы микробиологической диагностики.;

4) Специфическая профилактика парентеральных гепатитов.;

3. В инфекционное отделение ГKB поступила больная 25 лет с предварительным диагнозом «Гепатит». Объективно: у больной увеличение печени и селезенки, моча окрашена в темный цвет. Из анамнеза: четыре месяца назад лечилась у стоматолога в частной стоматологической клинике.

**Вопрос 1:** Назовите предполагаемого возбудителя заболевания, его систематическое положение.;

**Вопрос 2:** Морфологическая и антигенная характеристика возбудителя.;

**Вопрос 3:** Какие методы лабораторной диагностики необходимо использовать для подтверждения диагноза?;

**Вопрос 4:** Возможно ли заражение гепатитом В человека, вакцинированного вакциной Engerix B? Обоснуйте.;

1) Назовите предполагаемого возбудителя заболевания, его систематическое положение.;

2) Морфологическая и антигенная характеристика возбудителя.;

3) Какие методы лабораторной диагностики необходимо использовать для подтверждения диагноза?;

4) Возможно ли заражение гепатитом В человека, вакцинированного вакциной Engerix B? Обоснуйте.;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.

**1. Тема № 18.** Контрольное занятие: Вирусы. Зачет с оценкой.

**2. Значение темы** (актуальность изучаемой проблемы): Бурное развитие вирусологии началось несколько десятилетий назад, хотя впервые вирусы были открыты в 1892 году выдающимся отечественным учёным Д.И. Ивановским. Три главные проблемы выдвинули вирусологию в число наук, имеющих большое теоретическое и практическое значение: 1) Вирусные болезни в настоящее время стали наиболее распространенными среди растений, животных и человека, для борьбы с которыми еще не найдены надежные средства и наносящих огромный экономический ущерб. 2) С вирусами связывают развитие различных злокачественных опухолей и болезней крови, что имеет значение в изучении их этиологии, ранней диагностики и лечения. 3) Вирусы – уникальные биологические агенты, изучение которых может пролить свет на происхождение жизни, раскрыть многие ее генетические закономерности.

### **3. Цели обучения**

- **обучающийся должен знать , уметь** самостоятельно планировать и организовывать свою производственную деятельность и эффективно распределять свое время., пользоваться лабораторным и технологическим оборудованием., соблюдать технику безопасности и правила работы с материалом, представляющим биологическую опасность, пользоваться микробиологическим оборудованием, заполнять бланк-направление в лабораторию и интерпретировать результаты бланка-ответа из лаборатории (формы, утвержденные мз рф), интерпретировать результаты микробиологических методов диагностики инфекционных заболеваний, охарактеризовать основных возбудителей инфекционных заболеваний по их морфо-биологическим особенностям., охарактеризовать антибактериальный, противовирусный или иммунобиологический препарат по механизму его действия, обосновать выбор материала, методов микробиологической диагностики, средств профилактики, включая карантинные мероприятия, с учетом биологических особенностей возбудителя, **владеть** навыками анализа и оценки результатов собственной деятельности, деятельности коллег и других работников для предупреждения профессиональных ошибок и минимизации рисков для пациентов., навыками применения индивидуальных средств защиты., навыками антисептической обработки рук., навыками охраны труда и техники безопасности, микробиологической терминологией, использовать ее для решения учебных задач, обосновывая взаимосвязь морфо-биологических свойств возбудителя, патогенетических механизмов развития инфекционного процесса и принципов специфической профилактики и терапии., навыками подбора антибактериальных, противовирусных и иммунобиологических препаратов в зависимости от этиологии заболевания, руководствуясь нормативными документами и справочной литературой.

### **4. Аннотация** (краткое содержание темы)

**При подготовке к контрольному занятию рекомендуется придерживаться следующего плана:**

1. Таксономия возбудителя: ДНК или РНК-геномные вирусы, семейство, род, вид, серогруппа.
2. Характеристика вирусного возбудителя (вирусы натуральной оспы, гриппа, клещевого энцефалита, полиомиелита, Коксаки, ЕСНО, гепатитов А и Е, кори, эпидемического паротита, герпеса 1, 2 типов, ветряной оспы-опоясывающего лишая, гепатитов В, С, D, G; ВИЧ): тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), тип симметрии (спиральный, кубический, смешанный), размеры (мелкие, средние, крупные), степень организации (простые, сложные).
3. Вызываемые заболевания: экология, краткая эпидемиологическая характеристика (источники инфекции, механизм, пути и факторы передачи, восприимчивый коллектив), патогенез, основные клинические проявления, особенности иммунитета. Значение в патологии челюстно-лицевой области.
4. Лабораторная диагностика: исследуемый материал, применяемые методы диагностики. Обосновать.
5. Специфическая профилактика и терапия (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины).
6. Прионы – возбудители медленных инфекций. Биологические особенности. Заболевания человека и их патогенетические особенности. Лабораторная диагностика. Профилактика.
7. Культивирование вирусов: куриные эмбрионы, лабораторные животные, культуры клеток тканей.
8. Методы индикации вирусов: ЦПД, ЦП, РГА, РГАдс, внутриклеточные включения. Сущность, учет и оценка результатов.
9. Методы идентификации вирусов: РН, РТГА, РТГАдс, ИФА, РИФ. Сущность, учет и оценка результатов.
10. Биопрепараты: вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, диагностикумы, диагностические сыворотки. Что содержат, для чего и как применяются.

### **5. Вопросы по теме занятия**

1. Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции: материал, методы.
2. Вакцина Энджерикс В. Что содержит, для чего и как применяется?
3. Морфология, структура и химический состав вирусов.
4. Лабораторная диагностика гриппа: материал, методы.
5. Живая коревая вакцина. Что содержит, для чего и как применяется?
6. Вирус гриппа. Классификация, характеристика. Методы профилактики профессионального заражения в ЛПУ.
7. Вирусы полиомиелита. Классификация, характеристика. Программа ВОЗ по глобальной ликвидации полиомиелита; результаты ее реализации в России и Красноярском крае.
8. Лабораторная диагностика полиомиелита: материал, методы.

9. Вакцина Ваксигрип. Что содержит, для чего и как применяется?
10. Культивирование вирусов в культуре клеток ткани: типы культур, способы индикации и идентификации.
11. Основной метод лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции; серологические реакции, используемые для скринингового, референтного и арбитражного исследования; их суть.
12. Живая паротитная вакцина. Что содержит, для чего и как применяется?
13. Типы взаимодействия вируса с клеткой хозяина и их патогенетическое значение.
14. Д. И. Ивановский – основоположник вирусологии. Вирусы: понятие, отличительные особенности

**6. Тестовые задания по теме с эталонами ответов**

**1. ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В:**

- 1) живая;
- 2) инактивированная;
- 3) анатоксин;
- 4) рекомбинантная;
- 5) трансгенная;

**2. ВИРУС КОРИ ПРОЯВЛЯЕТ ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПО ТИПУ:**

- 1) пролиферации;
- 2) деструкции;
- 3) симпластообразования;
- 4) вирогении;
- 5) рецепторного эндоцитоза;

**3. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ ПОЛИОМИЕЛИТА, КОКСАКИ, ЕСНО:**

- 1) сем. Picornaviridae, род Rhinovirus;;
- 2) сем. Picornaviridae, род Hepatovirus;;
- 3) сем. Picornaviridae, род Enterovirus;;
- 4) сем. Flaviviridae, род Flavivirus;;
- 5) сем. Picornaviridae, род Aphotovirus;;

**4. ОСНОВОПОЛОЖНИК ВИРУСОЛОГИИ:**

- 1) Л. Пастер;
- 2) Р. Кох;;
- 3) Д.И. Ивановский;;
- 4) Л.А. Зильбер;;
- 5) А. ван Левенгук;;

**5. АНТИГЕН (Ы) ВИРУСА ГРИППА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ (ИЕ) ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА:**

- 1) NP (нуклеопротеин);
- 2) NS1, NS2 (неструктурные протеины);
- 3) Н (гемагглютинин), N (нейраминидаза);
- 4) М-белки;
- 5) белки полимеразного комплекса;

**6. ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ:**

- 1) дифференциально-диагностические среды;
- 2) куриные эмбрионы;
- 3) среды обогащения;
- 4) питательные среды сложного состава;
- 5) комбинированные питательные среды;

**7. ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА:**

- 1) простой;
- 2) средний;
- 3) сложный;
- 4) ДНК-содержащий;
- 5) крупный;

**8. СВОЙСТВО ВИРУСА КРАСНУХИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЕ ЕГО ОПАСНОСТЬ ДЛЯ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН:**

- 1) иммуногенность;
- 2) антигенность;
- 3) тератогенность;
- 4) онкогенность;
- 5) контагиозность;

**9. МАРКЕРОМ ПЕРВИЧНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ КРАСНУХОЙ У КОНТАКТНЫХ ЯВЛЯЕТСЯ:**

- 1) наличие IgM и нарастание титра IgG;
- 2) наличие ГЧЗТ;
- 3) отсутствие IgM и нарастание IgG;
- 4) высокая avidность антител;
- 5) выделение культуры вируса;

10. ПОЛИОВИРУС ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ ДРУГИХ ВИРУСОВ РОДА ENTEROVIRUS ПО:

- 1) типу нуклеиновой кислоты;
- 2) антигенным свойствам;
- 3) размерам;
- 4) типу симметрии;
- 5) числу капсомеров;

7. Ситуационные задачи по теме с эталонами ответов

1. При плановом обследовании 100 доноров станции переливания крови получены три положительных результата ИФА на анти-ВИЧ, р24.

**Вопрос 1:** Интерпретируйте полученные результаты;

**Вопрос 2:** Обоснуйте план дальнейшего обследования доноров;

**Вопрос 3:** Назовите арбитражный метод исследования ВИЧ-инфекции. В чем его суть;

- 1) У данных доноров получены положительные результаты, диагноз "ВИЧ-инфекция" под вопросом;
- 2) Необходимо проведение иммунного блоттинга с определением антител к отдельным вирусным белкам.;
- 3) Иммунный блоттинг - серологическое исследование с определением антител к отдельным антигенам ВИЧ. Метод сочетает в себе иммуноферментный анализ (ИФА) с предварительным электрофоретическим переносом на нитроцеллюлозную полоску (стрип) антигенов вируса. Антигены ВИЧ распределяются методом иммунофореза по фракциям, располагающимся согласно молекулярному весу по поверхности нитроцеллюлозной мембраны. В результате основные белки ВИЧ, носители антигенных детерминант, распределяются по поверхности в виде отдельных полос, которые и проявляются при проведении иммуноферментной реакции. Иммуноблот включает в себя несколько стадий: 1. Подготовка стрипа. Предварительно очищенный и разрушенный до составных компонентов вирус иммунодефицита (ВИЧ) подвергается электрофорезу, при этом входящие в состав ВИЧ антигены разделяются по молекулярному весу. Затем методом блоттинга антигены переносят на полоску нитроцеллюлозы. 2. Исследование пробы. На нитроцеллюлозную полоску наносится исследуемый материал (сыворотка, плазма крови пациента), и если в пробе есть специфические антитела, то они связываются со строго соответствующими им (комплементарными) антигенными полосами. В результате последующих манипуляций результат этого взаимодействия визуализируется - делается видимым. 3. Учет результата. Наличие полос на определенных участках нитроцеллюлозной мембраны подтверждает присутствие в сыворотке антител к строго определенным антигенам ВИЧ. Сыворотки лиц, инфицированных ВИЧ-1, содержат антитела к следующим основным белкам и гликопротеидам - структурным белкам оболочки (env) - gp160, gp120, gp41; ядра (gag) - p17, p24, p55, а также ферментам вируса (pol) - p31, p51, p66. Для ВИЧ-2 типичны антитела к env - gp140, gp105, gp36; gag - p16, p25, p56; pol - p68. Среди лабораторных методов, необходимых для установления специфичности реакции, наибольшее признание имеет обнаружение антител к белкам оболочки ВИЧ-1- gp41, gp120, gp160, и ВИЧ-2 - gp36, gp105, gp140. ВОЗ считает положительными сыворотки, в которых методом иммунного блоттинга обнаруживаются антитела к каким-либо двум гликопротеидам ВИЧ. Согласно этим рекомендациям, при наличии реакции только с одним из белков оболочки (gp 160, gp 120, gp 41) в сочетании или без реакции с другими белками, результат считается сомнительным и рекомендуется повторное исследование, с использованием набора другой серии или другой фирмы. Если и после этого результат остается сомнительным, рекомендуется наблюдение в течение 6 месяцев (исследования через 3 месяца);

2. В инфекционное отделение БСМП госпитализирована беременная женщина (5 недель) с клиническим диагнозом «Корь?». При поступлении результат ИФА для определения IgM, IgG к вирусу кори отрицательный. Из анамнеза: пациентка три дня назад вернулась из туристической поездки в Китай. Объективно: при поступлении лихорадка, температура 39°C, катаральные явления верхних дыхательных путей и конъюнктивы, на слизистой щёк папулы серовато-белесоватого цвета. Через сутки на лице, а затем на туловище и конечностях появилась пятнисто-папулезная сыпь

**Вопрос 1:** Дайте оценку и интерпретацию полученных результатов;

**Вопрос 2:** Какова тактика дальнейшего обследования? Обоснуйте;

**Вопрос 3:** Дайте характеристику предполагаемого возбудителя заболевания;

**Вопрос 4:** Охарактеризуйте эпидемиологическую ситуацию по кори в РФ, Красноярском крае;

- 1) Результаты ИФА отрицательны; иммунитета к вирусу кори нет и серологически диагноз не подтвержден. Но результат ИФА в данном случае ложноотрицательный, т.к. сыворотка взята рано без учета особенностей иммуногенеза;
- 2) Учитывая наличие характерного признака кори - пятен Бельского-Филатова-Коплика на слизистой полости рта, нужно провести повторное серологическое исследование на корь (ИФА с определением классов иммуноглобулинов);
- 3) Вирус кори относится к семейству Paramyxoviridae, роду Morbillivirus. Является РНК-содержащим, сложным, имеет средние размеры, спиральный тип симметрии. Основными антигенами вируса являются гемагглютинин, нейраминидаза и белок F (белок слияния);
- 4) Периодически отмечаются вспышки кори в различных регионах РФ, связанные в основном с завозом инфекции из соседних государств и отсутствием специфического иммунитета у контактных (невакцинированные дети, утратившие поствакцинальный иммунитет взрослые). В Красноярском крае

эпидемиологическая ситуация благополучна, периодически регистрируются единичные случаи кори;

3. Больная обратилась к врачу с жалобами на слабость, головную боль, тошноту, тяжесть в эпигастральной области, двукратную рвоту, отсутствие аппетита, высокую температуру (38 °С), темную окраску мочи. Считает себя больной 4-й день. Из анамнеза известно, что больная работает продавцом на овощном рынке, правила гигиены соблюдает не всегда, иногда ест немытые фрукты. За последние полгода парентеральных вмешательств, посещений стоматолога и гинеколога не было. Замужем, внебрачные связи отрицает. Ранее гепатитом не болела. Врач предположил гепатит А.

**Вопрос 1:** Каким путем могло произойти заражение пациентки;

**Вопрос 2:** Данные эпидемиологического анамнеза, указывающие на гепатит А и исключающие другие вирусные гепатиты;

**Вопрос 3:** Обосновать выбор материала и методов исследования с целью подтверждения/опровержения диагноза;

**Вопрос 4:** Тактика проведения специфической профилактики гепатита А;

1) Заражение пациентки могло произойти алиментарным путем (через немытые фрукты);

2) Из анамнеза ясно, что заражение произошло алиментарным путем (не было контактов с кровью и половых связей). Данным путем передаются лишь 2 вида гепатита -А, Е. При гепатите Е источником инфекции являются больные люди, а основной путь передачи - водный. При гепатите А механизм передачи - фекально-оральный. Вирусы передаются через инфицированные предметы обихода, продукты, грязные руки, что указывает на то, что пациентка больна именно гепатитом А;

3) Материал для исследования -сыворотка крови. Основным методом диагностики в данном случае будет серологический -определение специфических антител в ИФА;

4) Вакцинация по эпидемиологическим показаниям;

## **8. Рекомендованная литература по теме занятия**

### **- обязательная:**

[Микробиология](#) : учебник / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 616 с. : ил. - Текст : электронный.

### **- дополнительная:**

[Микробиология, вирусология и иммунология. Руководство к лабораторным занятиям](#) : учебное пособие / ред. В. Б. Сбойчаков, М. М. Карапац. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 400 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 1. - 448 с. - Текст : электронный.

[Медицинская микробиология, вирусология и иммунология](#) : учебник : в 2 т. / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - Т. 2. - 472 с. - Текст : электронный.

Левинсон, У. [Медицинская микробиология и иммунология](#) : пер. с англ. / У. Левинсон ; ред.-пер. В. В. Белобородов. - 2-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 1184 с. - Текст : электронный.

[Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям](#) : учеб. пособие / ред. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. - 408 с. - Текст : электронный.