

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

Ульяновский государственный университет

Институт медицины, экологии и физической культуры

Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова,

М.Н. Артамонова

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К
ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ И
САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ «МИКРОБИОЛОГИЯ,
ВИРУСОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТОВ СПЕЦИАЛЬНОСТИ
31.05.03 –«СТОМАТОЛОГИЯ»**

Ульяновск, 2022

УДК 612.017.1(075.8)

ББК 28.073 я73 Я93

Рецензент:

доктор медицинских наук, профессор,
зав. кафедрой дерматовенерологии и инфекционных болезней

Ульяновского государственного университета

А.С. Нестеров

Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Артамонова М.Н.

Методические рекомендации к практическим занятиям и самостоятельной работы по дисциплине «Микробиологии, вирусологии, иммунологии».

Ульяновск, 2022. 67 с.

УДК

612.017.1(075.8)

ББК 28.073 я73 Я93

Пособие содержит материалы по общей и частной микробиологии, включающие основные учебные темы для выполнения работы на занятии. Каждая тема включает цель, теоретическую справку, вопросы для подготовки, самостоятельные задания по теме. Самостоятельные практические работы включают решение ситуационных задач. Все работы имеют логическое завершение в виде схем протоколов, которые студент должен заполнить, сделать выводы с учетом направляющих вопросов. Внимание уделено и организации внеаудиторной самостоятельной работы студентов.

Рекомендации написаны в соответствии с действующей учебной программой и государственными образовательными стандартами для студентов специальности 31.05.03 - Стоматология.

© Коллектив авторов, 2022

© ФГБОУ ВПО «УлГУ»

ОГЛАВЛЕНИЕ

Тема 1 Предмет и задачи микробиологии. Классификация и морфология бактерий. Микроскопический метод исследования.	4
Тема 2. Физиология микроорганизмов. Метаболизм. Питание бактерий. Метаболизм микроорганизмов. Дыхание. Способы культивирования анаэробных бактерий. Культурально-биохимический метод	10
Тема 3. Общая вирусология. Бактериофаги. Открытие вирусов, классификация. Практическое значение фагов в биологии и медицине. Генетика микроорганизмов. Молекулярно-биологические методы диагностики.	19
Тема 4. Учение об инфекции: роль микробов в инфекционном процессе. Биологический метод диагностики. Значение микроорганизмов в инфекционном процессе. Принципы асептики в стоматологии	25
Тема 5. Микробиологические основы антимикробной терапии. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Антибиотики в стоматологии	28
Тема 6. Микроэкология полости рта. Дисбиоз. Физиология биопленок полости рта. Коллоквиум	32
Тема 7. Иммунитет, классификация. Иммунная система.	42
Тема 8. Анигены. Антитела.	50
Тема 9. Серологические методы диагностики.	56
Тема 10. Клиническая микробиология, цели и задачи. Этиология и патогенез внутрибольничных инфекций в стоматологии. Возбудители внутрибольничных инфекций. Коллоквиум.	61
Литература	66

Практическое занятие №1.

**Тема: Предмет и задачи микробиологии. Классификация и морфология бактерий.
Микроскопический метод исследования.**

Цели:

1. Формирование знаний о структуре, задачах и методах микробиологии как науки, истории ее становления и положения среди других наук.

Задачи:

1. Научиться работать с бактериальными культурами.
2. Приготовить фиксированные препараты.

Основные вопросы темы занятия:

1. Предмет изучения медицинской микробиологии и ее значение для практического здравоохранения.
2. Система и номенклатура микроорганизмов.
3. Виды микробиологических лабораторий, правила работы в них. Методы микробиологии.
4. Техника приготовления мазков. Простые и сложные методы окраски. Механизм окрашивания мазков. Тинкториальные свойства микроорганизмов.
5. Световой микроскоп, его основные характеристики. Виды световой микроскопии (темнопольная, фазово-контрастная, люминисцентная, электронная, атомно-силовая). Иммерсионная микроскопия, принцип. Порядок проведения иммерсионной микроскопии. Электронная микроскопия.
6. Формы и размеры бактерий.
7. Химический состав и физические свойства бактериальных клеток.
8. Структура бактериальной клетки: ядерный аппарат, цитоплазма, рибосомы. Их строение, функции и методы выявления.
9. Оболочка бактерий: цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, капсула. Строение, функции и методы выявления.
10. Жгутики и реснички. Их строение, функции и методы выявления.
11. Споры. Их роль и особенности строения. Спорообразование. Методы выявления спор.

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, т.к. используют чистые культуры

микроорганизмов (популяции микроорганизмов одного вида), среди которых могут быть выделены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы.

Подготовка помещения для проведения микробиологических работ включает влажную уборку и тщательную вентиляцию с последующим облучением ультрафиолетовыми лучами бактерицидных ламп. Поверхность стола, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать путем протирания 3% раствором хлорамина.

Подготовку лаборатории к занятиям проводит лаборант; студенты, выполняя задания, должны соблюдать следующие правила:

1. Каждый студент в микробиологической лаборатории работает на постоянном месте, выполняя задания индивидуально.
2. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов.
3. Студент должен работать только в белых халатах, волосы должны быть подобраны.
4. При работе с культурами микроорганизмов необходимо соблюдать все правила микробиологической техники. На пробирках, колбах, чашках Петри должна быть сделана надпись, содержащая родовые и видовые названия культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы.
5. Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки).
6. Все засеянные пробирки, чашки помещают в термостат или сдают лаборанту. Отобранный материал (пробирки, чашки Петри) также помещают в определенные емкости по указанию лаборанта для дальнейшего обеззараживания.
7. В лаборатории запрещается курение, прием пищи, лишнее хождение.
8. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, вымыть руки.

Задание на занятие

1. Приготовить фиксированный препарат бактериальных клеток.
2. Провести окраску по Граму микроорганизмов.
3. Произвести иммерсионную микроскопию объективом 90х, зарисовать.

Задание на самостоятельную работу

ТАКСОНОМИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вид – _____

Чистая культура – _____

Смешанная культура – _____

Штамм – _____

Клон – _____

Биовар – _____

Серовар – _____

*ОСНОВНЫЕ ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ*

Определение	Пример
<i>Царство Эукариоты</i>	
Простейшие –	
Грибы –	
<i>Царство Прокариоты</i>	
Бактерии –	
Микоплазмы –	
Риккетсии –	
Хламидии –	
Спирохеты –	
<i>Царство Вирусы –</i>	

ТИПЫ МИКРОСКОПОВ

Разрешающая способность объектива – _____

Увеличительная способность микроскопа – _____

1. Иммерсионный микроскоп.

Иммерсионный микроскоп отличается от обычного светового микроскопа –

Иммерсионное масло необходимо для _____

2. Темнопольный микроскоп.

Темнопольный микроскоп отличается от обычного светового микроскопа

3. Фазово-контрастный микроскоп.

Принцип работы

Фазово-контрастный микроскоп отличается от обычного светового микроскопа

4. Люминесцентный микроскоп.

Принцип работы _____

Люминесцентный микроскоп отличается от обычного светового микроскопа

Электронный микроскоп.

Принцип работы

Электронный микроскоп отличается от обычного светового микроскопа

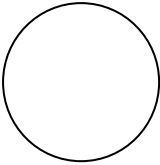
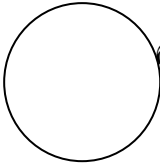
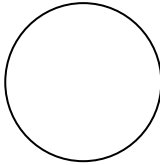
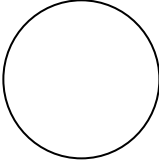
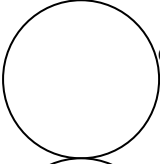
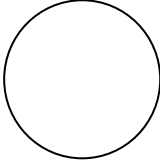
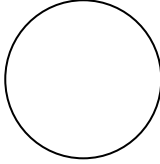
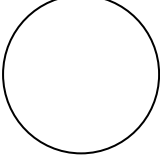
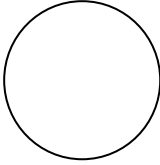
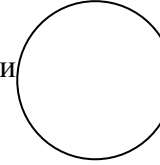
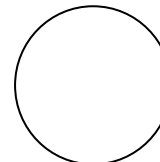
5. Атомно-силовая микроскопия.

Принцип работы

Атомно-силовая микроскопия отличается от обычного светового микроскопа

Вывод (область применения разных типов микроскопов)

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
ОСНОВНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ БАКТЕРИЙ

Кокки	Палочки	Извитые	Нитчатые
 диплококки	 бактерии	 вибрионы	 актиномицеты
 стрептококки	 бациллы	 спирохеты	
 сарцины	 кlostридии	 спириллы	
 стафилококки			

Морфология бактерий – размер, форма и взаимное расположение бактериальных клеток.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФИКСИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА

Этапы приготовления фиксированного препарата:

- Подготовка стекла
- Приготовление мазка
- Высушивание
- Фиксация

Простые методы окраски – методы, основанные на применении одного красителя. Примеры: _____

Сложные методы окраски – _____

Тинкториальные свойства – _____

Общая схема сложных (дифференцированных) методов окраски:

- Основной краситель;
- Дифференцирующее вещество;
- Дополнительный краситель.

ОКРАСКА ПО ГРАММУ

Этап	Вещество	Время обработки
Основной краситель	Генцианвиолет	1 мин
Фиксатор	Р-р Люголь	1 мин
Дифференцирующее вещество	Спирт этиловый 96 ⁰	5-10 сек
Промывка	Вода	5-10 сек
Дополнительный краситель	Водный фуксин	1 мин
Промывка	Вода	5-10 сек

Принцип метода:

Генцианвиолет связывается с пептидогликаном клеточной стенки. Толстый слой пептидогликана грамположительных бактерий связывает много красителя, тонкий слой – грамотрицательных – мало. Раствор Люголя фиксирует краситель за счет образования комплекса краситель-пептидогликан-йод. При обработке мазка спиртом грамотрицательные микроорганизмы быстро теряют краситель и обесцвечиваются, а грамположительные – остаются окрашенными в синий цвет. Дополнительный краситель окрашивает грамотрицательные микроорганизмы в красный цвет.

Бактерии	
грамположительные	граммотрицательные
	

Общий вывод.

Практическое занятие №2

Тема: Физиология микроорганизмов. Метаболизм. Питание бактерий. Метаболизм микроорганизмов. Дыхание. Способы культивирования анаэробных бактерий. Культурально-биохимический метод исследования.

Цель:

1. Систематизация знаний о метаболизме микроорганизмов.

Задачи:

1. Изучить механизмы питания микроорганизмов.
2. Изучить различные виды питательных сред.
3. Рассмотреть технику посева микроорганизмов на питательные среды.

Основные вопросы темы занятия:

1. Понятие анаболизма и катаболизма.
2. Механизм питания бактерий.
3. Аутотрофы и гетеротрофы, ауксотрофы и прототрофы.
4. Требования к искусственным питательным средам.
5. Классификация питательных сред.
6. Простые и сложные питательные среды.
7. Стерилизация и дезинфекция. Методы стерилизации.
8. Методика посева на искусственные питательные среды.
9. Фазы роста на искусственной питательной среде.
10. Выделение чистой культуры аэробов.
11. Механизм дыхания бактерий. Аэробы и анаэробы.
12. Методы культивирования анаэробных бактерий: питательные среды, аппаратура.
13. Выделение чистой культуры анаэробов.
14. Идентификация выделенной чистой культуры бактерий.
15. Основные группы ферментов бактерий.
16. Определение сахаролитических свойств бактерий.
17. Определение протеолитических ферментов.
18. Выделение пептолитических ферментов.
19. Ферменты агрессии: коагулаза, гиалуронидаза, нейроминидаза, ДНК – аза, гемолизин.

В любой биологической системе рост может быть определен как согласованное увеличение количества всех химических компонентов, как увеличение количества живого вещества. Рост микроорганизмов возможен,

если в окружающей среде присутствуют все необходимые питательные вещества источники углерода, азота, водорода, кислорода и микроэлементы.

Культивирование микроорганизмов называют их выращивание на искусственных средах.

Натуральные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения – мяса, молока, картофеля, моркови и т.д. Примеры:

- мясо-пептонный бульон, состоящий из экстракта мяса (500 г мяса на 1л воды), 0,5% NaCl и 1% пептона;
- картофельная среда, которая готовится путем отвара картофеля (200 г картофеля на 1л воды).

Полусинтетические среды в своем составе наряду с соединениями известной химической природы содержат вещества неопределенного состава.

К полусинтетическим средам относятся мясо-пептонный бульон с глюкозой и фосфорнокислым калием, картофельную среду с глюкозой и пептоном.

Синтетические среды – среды, в состав которых входят химические соединения в определенных концентрациях. Примеры:

- среда Чапека для культивирования грибов (глюкоза, азотнокислый натрий, фосфорнокислый калий, сернокислый магний, сернокислое железо, вода).

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны (или непригодны) для развития других.

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других.

По физическому состоянию различают жидкие, плотные и сыпучие среды. Наиболее часто для уплотнения сред используется агар-агар. Это сложный полисахарид, получаемый из морских водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата.

Жидкие среды применяют для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов метаболизма, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Сыпучие среды применяют в промышленной микробиологии. К ним относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

Плотные среды используют для выделения чистых культур (полуизолированных колоний), диагностических целей (установление морфологии колоний, особенностей роста на скошенном агаре и др.), для

хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и в ряде других случаев.

При специальных исследованиях используется кремнекислый гель (селикагель) – вещество неорганической природы и его используют как твердую основу для синтетических сред.

Техника посева и пересева культур микроорганизмов

Посевом в микробиологии называют внесение клеток микроорганизмов (посевого материала – инокулята) в стерильные среды.

Пересев – это перенос выращенной культуры микроорганизмов на питательной среде на другую свежую питательную среду.

Посев (и пересев) микроорганизмов проводят при соблюдении определенных правил стерильности, которые необходимо выполнять, чтобы предохранять исследуемую культуру от загрязнения посторонними микробами и не загрязнять окружающую среду исследуемыми микроорганизмами.

1. Пересев микроорганизмов, выращенных на твердой среде в пробирках, в другие пробирки со средой.

- На пробирке со свежей питательной средой разборчиво подписывают название микроорганизма и дату посева. Надписи делают карандашом по стеклу.

- Зажигают горелку. Посевы проводят над пламенем горелки, чтобы теплый воздух препятствовал осаждению микроорганизмов из окружающего воздуха и отчасти их уничтожал.

- Берут в правую руку бактериологическую петлю, с помощью которой осуществляют посев.

- Стерилизуют бактериологическую петлю в пламени горелки, прокаливая проволоку до красна. При прокаливании петлю держат почти вертикально, чтобы вся проволока была раскалена.

- Берут в левую руку две пробирки – одну со стерильной средой (дальше от себя), другую – с культурой микроорганизмов (ближе к себе).

- Не выпуская бактериологической петли в правой руке, мизинцем и безымянным пальцем руки прижимают наружные концы ватных пробок к ладони и вынимают пробки из пробирок. Класть пробки на стол нельзя.

- Слегка обжигают в пламени горелки края открытых пробирок.

- Вводят в пробирку с культурой микроорганизмов петлю. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь к внутренней поверхности пробирки или к питательной среде, свободной от

клеток микроорганизмов, и только после этого отбирают небольшое количество микробной массы.

- Вынимают петлю и вводят ее в пробирку со стерильной питательной средой, избегая прикосновения со стенками пробирки.

- Проводят петлей от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих, слегка касаясь поверхности агара.

- Обжигают ватные пробки и края пробирок одновременно в пламени и закрывают обе пробирки.

- Обжигают петлю в пламени.

При использовании метода истощающего штриха исследуемый материал наносят петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри и аккуратно, зигзагообразно петлей по поверхности чашки (рис.1).

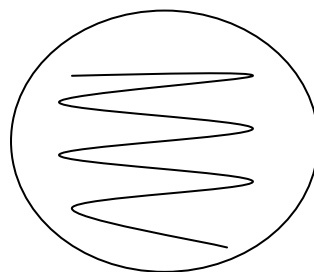


Рис. 1. Метод посева зигзагообразной петлей

После посева чашки необходимо перевернуть вверх дном и поставить в термостат при температуре, благоприятной для данного микроорганизма. Инкубируют посевы обычно в термостате в течение 2-3 дней. В результате на поверхности среды вырастают колонии микроорганизмов. Выросшие колонии сначала рассматривают невооруженным глазом, а затем при помощи микроскопа.

В микробиологической практике широко используются как чистые культуры микроорганизмов, так и консорциумы.

Консорциумы – смешанные или ассоциированные культуры, состоящие из двух и более микроорганизмов, между которыми существуют различные формы взаимоотношений.

Чистой культурой называют культуру, состоящую из микроорганизмов одного вида. Чистая культура микроорганизмов, которая является потомством одной единственной клетки, называется клоном.

Чистые культуры микроорганизмов, как правило, выделяются на поверхности или внутри твердой питательной среды.

Существуют несколько методов получения чистых культур. Наиболее распространен в практике метод выделения чистых культур с помощью твердых сред (метод Коха).

Метод заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде в результате размножения одной клетки. Метод основан на том, что при нанесении микроорганизмов из посевного материала на твердую среду отдельные клетки будут закрепляться в определенной точке среды и, размножаясь, давать потомство (клон), представляющее чистую культуру микроорганизма.

Для получения изолированных колоний на твердой среде исследуемый материал высевают на поверхность твердой питательной среды, наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала. Рассев проводят либо методом истощающего мазка, либо методом истощающего штриха. В первом случае шпателем равномерно распределяют нанесенную каплю по поверхности среды. Тем же шпателем делают посев на поверхности второй пластинки и затем третьей, т.е. перенося последовательно на твердую среду клетки микроорганизмов, которые остались на шпателе. Таким образом, количество микроорганизмов, вносимых последовательно на пластинки, будет уменьшаться: на вторую – меньше, чем на первую; на третью – еще меньше, чем на вторую и т.д.

При описании колоний микроорганизмов отмечают следующие морфологические и культуральные признаки:

- размер колоний – их диаметр в мм (если колонии не превышают 1 мм, их называют точечными);
- форма колоний – округлая, неправильная, мицелиевидная, амёбовидная, складчатая, сложная и т.д.;
- цвет колонии – белый, желтый, розовый и способность выделять пигмент в среду;
- поверхность колоний – гладкая, складчатая, с радиальной или концентрической исчерченностью, шероховатая, бугристая и др.;
- оптические свойства – прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая и т.д.;
- край колоний – ровный, извилистый, зубчатый, лопастной, волнистый, неправильный, реснитчатый, ветвистый;
- консистенция колоний – маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая.

Для описания колоний из имеющихся чашек Петри берут ту, на которой колонии достаточно изолированы друг от друга.

Из отобранных колоний готовят препараты, микроскопируют для проверки морфологической однородности клеток. При приготовлении

препаратов необходимо соблюдать все правила стерильности (не открывать широко крышку чашки, хорошо простерилизовать петлю).

Далее пересевают культуру из колоний в пробирку со скошенной плотной питательной средой (косяк).

Посев проводят следующим образом.

1. Зажимают пробирку средним пальцем левой руки (скошенная поверхность агара должна быть обращена вверх).
2. Обжигают петлю.
3. Приоткрывают крышку чашки Петри, берут петлей материал из колонии и закрывают крышку.
4. Быстро делают посев штрихом по поверхности косого агара.
5. Делают на пробирке надпись, число, номер колонии и др., ставят посев в термостат.

Для выделения чистых культур многих бактерий используют МПА.

Задание на занятие

1. Выделить чистые культуры бактерий по методу Коха на среде МПА из предоставленной суспензии культур микроорганизмов.
2. Изучить морфологические и культуральные признаки выросших колоний.
3. Зарисовать выбранную изолированную колонию.
4. Провести посев культур микроорганизмов (бактерий, дрожжей) из пробирки в пробирку с помощью бактериологической петли.

Задание на самостоятельную работу

Пути поступления питательных веществ в бактериальную клетку –

Анаболизм – _____

Катаболизм – _____

Аутотрофы – _____

Гетеротрофы – _____

Прототрофы – _____

Ауксотрофы – _____

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Питательные среды

Китта-Тароцци



Тип среды _____

Состав среды:

Питательная основа _____

Элективный фактор _____

Вывод: (опишите рост анаэробных бактерий) _____



Среда Эндо



Тип среды _____

Состав среды:

Питательная основа _____

Элективный фактор _____

Вывод: (опишите рост кишечных палочек) _____



Желточно-солевой агар



Тип среды _____

Состав среды:

Питательная основа _____

Элективный фактор _____

Дифференцирующий фактор _____



Индикатор _____

Вывод: (опишите рост стафилококков) _____

Культуральные свойства микроорганизмов

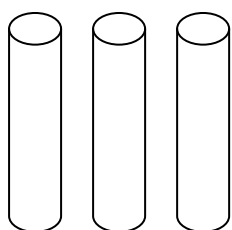
Культуральные свойства – _____

Характер роста микроорганизмов на плотных питательных средах



1. _____
2. _____
3. _____

Характер роста микроорганизмов на жидких питательных средах



1. _____
2. _____
3. _____

Дыхание микроорганизмов

Аэробы – _____

Факультативные анаэробы – _____

Облигатные анаэробы – _____

Микроаэрофилы – _____

Капнофилы – _____

Дыхательные цепи

Аэробы	Факультативные анаэробы	Облигатные анаэробы

Ферменты бактерий

Экзоферменты – _____

Эндоферменты – _____

Пермеазы – _____

Конститутивные ферменты – _____

Адаптивные ферменты – _____

Способы изучения биохимических свойств бактерий

1. Среды «пестрого ряда» (среды Гисс)

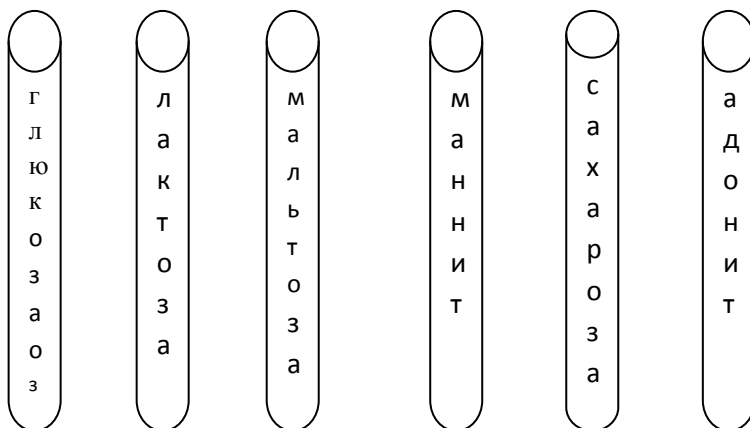
Состав – _____

Принцип действия – _____

2. Система индикаторных бумаг (СИБы)

Принцип действия: диски из фильтровальной бумаги, пропитанные питательными средами (питательная основа+субстрат+индикатор) и высушенные, хранятся во флаконах. В лаборатории диски раскладываются в стерильные пробки и заливаются густой суспензией исследуемой культуры в физрастворе. Учет проводят после 18-24 часовой инкубации в термостате по изменению цвета индикатора.

Esherichia coli



Произвести окрашивание пробирок в соответствии с изменением цвета индикатора.

Общий вывод.

Практическое занятие №3

Тема: Общая вирусология. Бактериофаги. Открытие вирусов, классификация. Практическое значение фагов в биологии и медицине. Генетика микроорганизмов. Молекулярно-биологические методы диагностики

Цель:

1. Формирование знаний об особенностях строения вирусов, бактериофагов.

Задачи:

1. Рассмотреть структуру, методы выделения, идентификации вирусов.
2. Освоить методы титрования бактериофагов.
3. Познакомиться с принципами применения препаратов бактериофагов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Основные вопросы темы занятия:

1. Классификация вирусов. Понятие вируса и вириона.
2. Морфология вирусов. Функции ДНК и РНК (- нить, + нить).
3. Химический состав нуклепротеида. Ферменты.
4. Методы культивирования вирусов.
5. Взаимодействие вируса с клеткой. Механизм транскрипции и репликации вирусного генома.
6. Механизм интеграции ДНК и РНК вируса в геном клетки.
7. Пути передачи вирусных инфекций.
8. Морфология фагов.
9. Механизм взаимодействия фагов с бактериальной клеткой.
10. Вирулентные и умеренные фаги. Лизогения.
11. Титр фага. Методы определения.
12. Принцип получения культуры фагов. Применение в медицине.
13. Организация генетического аппарата у бактерий. Генотип и фенотип.
14. Внехромосомные факторы: плазмиды у бактерий, их роль: транспозоны: Is – последовательности.
15. Формы изменчивости у микроорганизмов.
16. Мутации, виды мутаций у бактерий.
17. Генетические рекомендации у бактерий (трансформация, трансдукция, конъюгация).
18. Понятие о модификациях.
19. Практическое использование генной инженерии.
20. Теоретическое и практическое значение учения о генетике.

Царство *Vira*

Вирусы – группа ультрамикроскопических облигатных внутриклеточных паразитов, способных размножаться только в клетках живых организмов.

Все вирусы существуют в двух качественно различных формах: Вирион (внеклеточная форма) и Вирус (репродуцирующая форма, вегетативная)

Любая вирусная частица содержит только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК)

Вироиды содержат нуклеиновую кислоту, вызывают заболевания растений

Прионы не содержат нуклеиновой кислоты, только белок, активирующий ген

Вирусы не имеют клеточного строения, не способны к росту и бинарному делению; не имеют собственных систем метаболизма; содержат нуклеиновые кислоты только одного типа – ДНК или РНК; используют рибосомы клетки-хозяина для образования собственных белков; не размножаются на искусственных питательных средах и могут существовать только в организме восприимчивого к ним хозяина.

Фаги – облигатные паразиты микроорганизмов. Бактериофаги – вирусы, пожирающие бактерии.

В настоящее время микроорганизмы являются основными объектами при изучении законов генетики. Микробы 1) являются гаплоидами, бактерии имеют одну хромосому; 2) высокая скорость изменения; 3) легко культивируются. При помощи генной инженерии можно заставить продуцировать белки, ферменты, которые необходимы человеку, можно заставить продуцировать токсины, которые считаются вредными.

Генетика позволяет создавать продукты высокого качества.

Генный аппарат бактерий – состоит из одной кольцевой молекулы ДНК, в которой гены располагаются линейно. *Ген* – это участок ДНК, ответственный за синтез одного белка.

В бактериальной хромосоме все гены расположены в линейной последовательности. Гены определенных признаков лежат в соответствующих местах хромосомы, называемых локусами. Бактерии обычно гаплоидны, т.е. они имеют только один набор генов.

Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуумов называется фенотипом. Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно различаться по фенотипу, т.е. способу проявления наследственных признаков.

У бактерий часто помимо хромосомного генома имеется дополнительный плазмидный геном, наделяющий их важными биологическими свойствами (устойчивостью к антибиотикам,

химиопрепаратам, способностью к токсинообразованию и т.д.): плазмиды, транспозоны, IS-последовательности (*Insertion seguen* – подвижная вставка).

Получение наследственно измененных форм микроорганизмов расширило возможности их использования в сельскохозяйственном и промышленном производстве, а также и в медицине. Основной метод получения новых форм микроорганизмов – индуцирование мутаций воздействием различными мутагенами на дикие, существующие в природе культуры. Таким методом удается создавать мутантов, которые выделяют в десятки и сотни раз большее количество ценных продуктов (антибиотиков, ферментов, витаминов, аминокислот и т.д.) по сравнению с дикими формами микроорганизмов.

Задание на самостоятельную работу

Бактериофаги – _____

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОФАГОВ С ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ

1. Вирулентный бактериофаг

На жидких питательных средах – лизис культуры.

На плотных питательных средах – негативные колонии фагов (бляшки).

2. Умеренные бактериофаги

Лизогенизация – _____

Лизогенная конверсия – _____

Примеры: _____

–

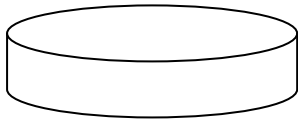
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИТРОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

1. Выделение.

Фильтрация исследуемого материала через бактериальные фильтры или обработка хлороформом для уничтожения бактериальной и грибковой микрофлоры.

2. Индикация и идентификация бактериофага

Качественные пробы на бактериофаг:



по Фишеру

Принцип метода: _____

Титр бактериофага – _____

а) Титрование в жидкой среде по Аппельману

Принцип метода: В ряд пробирок с МПБ вносят индикаторную культуру и по 1 мл соответствующего разведения фагосодержащего материала. После инкубации учитывают результат: «+» - лизис индикаторной культуры (просветление среды); «-» – рост индикаторной культуры (помутнение среды).

Сделать рисунок-схему.

б) Метод агаровых слоев по Грациа

Принцип метода: В пробирке с растопленным полужидким агаром вносят индикаторную культуру и 1 мл соответствующего разведения фагосодержащего материала, тщательно перемешивают и выливают в чашки с МПА. После инкубации подсчитывают число негативных колоний на чашке и делают пересчет на 1 мл неразведенного материала.

Сделать рисунок-схему.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

1. Фаготерапия.

Фаготерапия – _____

Примеры: _____

2. Фагопрофилактика.

Фагопрофилактика – _____

Примеры: _____

3. Фаготипирование.

Фаготипирование – _____

Фаготип – _____

БИОПРЕПАРАТЫ

Все биопрепараты бактериофагов содержат фильтрат фаголизата соответствующей культуры бактерий.

1. Лечебно-профилактические бактериофаги:

- а) таблетированные, покрытые кислотоустойчивой оболочкой (дизентерийный);
- б) жидкие для местного или перорального применения (пиобактериофаг, стафилофаг)

2. Диагностические бактериофаги:

- а) видовые (индикаторные) – применяются для _____
_____ (чумной, холерный, дизентерийный);
- б) типовые – применяются для _____
(стафилококковые, брюшнотифозные).

Изменчивость микроорганизмов

Генотип – _____

Мутационная изменчивость – _____

Модификационная изменчивость – _____

R и S формы энтеробактерий

Свойства	S -формы	R - формы
Морфологические - капсула - жгутики		
Вирулентность		

РЕКОМБИНАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Трансформация – _____

Трансдукция – _____

Конъюгация – _____

ПЛАЗМИДЫ БАКТЕРИЙ

Плазмиды – _____

Название плазмид	Функции плазмид

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕДИЦИНЕ

1. _____
2. _____
3. _____

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации (ДНК/РНК) инфекционного возбудителя, многократно его размножить и выявить с помощью различных современных технологий (гибридизационно-флюоресцентная детекция в режиме «реального времени» и «по конечной точке»).

В настоящее время ПЦР является одним из высокочувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний, который позволяет выявлять единичные вирусные частицы или бактериальные клетки.

Появление ПЦР значительно расширило возможности клинической лабораторной диагностики.

Принцип метода: исследуемый материал подвергается специальной обработке, при которой происходит лизис клеток возбудителя с выходом ДНК. Часть материала переносится в пробирку, содержащую смесь мононуклеотидов, ДНК-полимеразу и праймер – уникальную последовательность нуклеотидов, присущую искомому возбудителю. Циклическое изменение температуры (30 циклов) позволяет осуществить репликацию определенного гена возбудителя *in vitro*. Этот процесс

называется амплификацией, в результате которого количество специфической ДНК увеличивается в миллионы раз. Такие количества ДНК могут быть выявлены с помощью электрофореза в агарозном геле.

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний –

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Общий вывод.

.

Практическое занятие №4

Тема: Учение об инфекции: роль микробов в инфекционном процессе. Биологический метод диагностики. Значение микроорганизмов в инфекционном процессе. Принципы асептики в стоматологии

Цель:

1. Формирование знаний о механизмах инфекционного процесса.

Задачи:

1. Изучить процессы взаимодействия и роль макро- и микроорганизмов в возникновении и развитии инфекционного процесса.
2. Рассмотреть факторы вирулентности бактерий.
3. Изучить механизм действия эндо- и экзо- токсинов микроорганизмов.

Основные вопросы темы занятия:

1. Понятие инфекционного процесса и инфекционной болезни. Формы инфекционного процесса.
2. Экзогенные и эндогенные инфекции. Понятие “Входных ворот и инфицирующей дозы”. Пути передачи инфекции.
3. Очаговый и генерализованный инфекционный процесс. Пути распространения инфекций в организме. Понятие: бактериемия, вирусемия, токсемия, сепсис, септикопиемия.
4. Моно - микстиинфекция, первичная и вторичная инфекция, реинфекция, суперинфекция, рецидив.

5. Классификация инфекционного процесса: по источнику, течению, тяжести, по распространенности.
6. Периоды инфекционного заболевания.
7. Патогенность и вирулентность микроорганизмов, единицы измерения вирулентности.
8. Факторы вирулентности: адгезия, колонизация, пенетрация, инвазия. Их характеристики. Способность подавлять защитные силы макроорганизма.
9. Токсичность. Экзотоксины. Классификация по механизму действия.
10. Эндотоксины. Химическая природа, действие на макроорганизм.
11. Роль макроорганизма в возникновении инфекционного процесса.

Инфекционный процесс - совокупность физиологических и патологических процессов, возникающих и развивающихся в организме при внедрении в него патогенных микробов, которые вызывают нарушение постоянства его внутренней среды и физиологических функций. Инфекционное заболевание является одной из форм инфекционного процесса. Различные формы проявления инфекционного процесса обуславливаются биологическими и социальными факторами окружающей среды.

Инфекционный процесс может быть искусственно воспроизведен путем заражения лабораторных животных: кроликов, морских свинок, белых мышей, белых крыс и др. Экспериментальное заражение животных производится для: 1) изучения патогенности и вирулентности микроорганизмов; 2) выделения чистой культуры возбудителя из различных материалов; 3) воспроизведения экспериментальной инфекции, испытания лечебного действия химиотерапевтических препаратов и других целей. Перед постановкой опыта отбирают группу животных определенного вида, возраста, веса и, если нужно по условиям опыта, одного пола. Животные должны быть совершенно здоровы. Отобранных животных рассаживают по клеткам и в течение нескольких дней взвешивают, измеряют температуру.

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривенным, пероральным, интраназальным, интрацеребральным.

В возникновении и развитии инфекционного процесса исключительно важное и решающее значение имеют состояние организма человека, его индивидуальные особенности, а также условия окружающей среды, труда и быта.

Инфекционный процесс может протекать в разнообразной форме в зависимости от происхождения, локализации возбудителя и других факторов.

Задание на самостоятельную работу

Инфекция - _____

Эндогенная инфекция (аутоинфекция) - _____

Экзогенная инфекция - _____

Патогенность - _____

Вирулентность - _____

Персистенция - _____

Патогенные микроорганизмы - _____

Условно-патогенные микроорганизмы - _____

Единицы измерения вирулентности - _____

Входные ворота инфекции - _____

Инвазивность - _____

Токсичность - _____

Токсигенность - _____

Эндотоксин - _____

Практическое применение эндотоксинов - _____

Экзотоксин - _____

Приведите примеры токсигенных микроорганизмов - _____

Анатоксин - _____

Практическое применение экзотоксинов:

1. _____
2. _____

Биологический метод диагностики - _____

ЭТАПЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ

1. Заражение животного
2. Наблюдение за развитием заболевания
3. Вскрытие погибшего животного
4. Выявление возбудителя в тканях и органах погибшего животного с помощью бактериоскопического метода и выделение - с помощью бактериологического метода.

Достоинства биологического метода:

Недостатки биологического метода:

Общий вывод.

.

Практическое занятие №5

Тема: Микробиологические основы антимикробной терапии. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Антибиотики в стоматологии

Цель:

1. Формирование знаний о антимикробных препаратах.

Задачи:

1. Изучить процессы взаимодействия и роль макро- и микроорганизмов в возникновении и развитии инфекционного процесса.
2. Рассмотреть факторы вирулентности бактерий.
3. Изучить механизм действия эндо- и экзо- токсинов микроорганизмов.

Антибиотики – это специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов и их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов, избирательно задерживая или полностью подавляя их рост.

Антибиотические вещества разнообразны по химическому составу и механизму действия. Характерной особенностью антибиотиков является избирательность их действия: каждый антибиотик проявляет биологическое воздействие (эффективен) лишь по отношению к определенным организмам или группам организмов, не оказывая воздействия на другие.

Образование антибиотиков – это наследственно закрепленная особенность метаболизма организмов, это специфическая особенность вида или даже штамма микроорганизмов, возникшая в результате эволюционного развития как одна из приспособительных особенностей, обуславливающая проявление широко распространенных в мире микроорганизмов антагонистических отношений.

Процесс образования антибиотиков тесно связан с развитием организмов-продуцентов и осуществляется, как правило, в фазу замедления роста. Для определения спектра антимикробного действия антибиотика или чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используются методы, основанные на способности антибиотика диффундировать в толщу агара.

Для определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам на чашки Петри с подсушенной средой МПА засевают исследуемую культуру сплошным газоном. Посев производят стерильным ватным тампоном, смоченным суспензией исследуемой культуры. Стерильным пинцетом на агар плотно накладывают индикаторные бумажные диски (4-5 штук), пропитанные раствором определенного антибиотика на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии около 2,5 см от центра чашки.

Диски номеруют на обратной стороне дна чашки. Засеянные чашки с нанесенными дисками термостатируют (вверх дном) при 37⁰ С в течение 16-18 ч.

Антибиотики, диффундирующие в толщу агара, предотвращают или задерживают рост чувствительных к ним культур микроорганизмов, что проявляется в образовании вокруг соответствующих дисков зоны угнетения роста, четко выделяющейся на фоне сплошного газона роста тестируемой культуры.

Таблица 1

Величина зоны угнетения определяет степень чувствительности микроорганизмов к данному антибиотику

Диаметр зоны задержки роста, мм	Степень чувствительности к антибиотику
Более 25	высокочувствительные
15-25	чувствительные
10-14	малочувствительные
Менее 10 и полное отсутствие	устойчивые

Для определения спектра антимикробного действия продуцента антибиотиков на наружной поверхности дна чашки Петри с агаризованной пептоно-глюкозной средой по диаметру чашки на расстоянии 1 см друг от друга проводят две параллельные линии. Петлей проводят посев спор культуры актиномицета вдоль отмеченных полос. При посеве чашки держат агаровой пластинкой вниз (чтобы споры не разлетались). Через 6-7 дней перпендикулярно штриху выросшего актиномицета проводят посев штрихов тест-организмов. Посев делают петлей из густых суспензий тест-организмов в стерильной водопроводной воде. Чашки инкубируют при 30⁰ С в течение 1-2 суток.

Воздействие антибиотика, продуцируемого актиномицетом, на тестируемые микроорганизмы определяют по величине между краем штриха актиномицета и началом роста тест-организма.

Задание на самостоятельную работу

АНТИБИОТИКИ

Химиопрепараты – _____

Антибиотики – _____

ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ АНТИБИОТИКОВ

Классификация	Примеры
По происхождению	
По способу получения	
По группам чувствительных микроорганизмов	
По спектру действия	
По механизму действия	

Применение антибиотиков в медицине

1. _____
2. _____
3. _____

Осложнения и побочные эффекты антибиотикотерапии

1. _____
2. _____
3. _____

Общий вывод.

Лабораторное занятие №6

**Тема: Микрoэкология полости рта. Дисбиоз. Физиология биопленок полости рта.
Коллоквиум**

Цель:

1. Систематизация знаний об экологии микроорганизмов.

Задачи:

1. Научиться определять микробное число воздуха, воды.
2. Научиться проводить бактериологическое исследование зева.
3. Освоить методы определения коли-титра и коли-индекса воды.
4. Изучить состав микрофлоры ротовой полости.
5. Оценить состояние нормальной микрофлоры по результатам лабораторных исследований.

Основные вопросы темы занятия:

1. Экология микроорганизмов. Формы межвидовых взаимоотношений.
2. Санитарная микробиология, ее значение и методы.
3. Микрофлора воды, санитарно – микробиологические показатели: коли – титр, коли – индекс, микробное число, методы их определения.
4. Микробиоценозы почвы. Оценка санитарно – микробиологического состояния почвы: показатели, методы их определения.
5. Микрофлора воздуха, методы определения санитарно – микробиологического состояния.
6. Оценка санитарно – микробного состояния пищевых продуктов и объектов окружающей среды.
7. Нормальная микрофлора организма человека и ее значение. Гнотобиология.
8. Факторы, нарушающие нормальную микрофлору организма. Дисбиоз, пути его устранения.

Водные экосистемы являются средой обитания микроорганизмов. Первичными продуцентами служат одноклеточные водоросли. Микрофлора воды чаще всего отражает микробный пейзаж почвы около водоема, постоянно меняется и обновляется, что связано с попаданием различных бактерий с ливневыми дождями, сточными, тальными водами, с пылью. Микрофлора в пресных и соленых водоемах различна.

Вода артезианских скважин почти не содержит микроорганизмов, что объясняется фильтрующей способностью почвы.

С ливневыми, талыми и сточными водами в реки и озера попадают микроорганизмы – представители нормальной флоры кишечника человека и животных, например, кишечная палочка, энтерококки, различные клостридии. Вместе с ними могут попасть и патогенные микроорганизмы (брюшнотифозные, дизентерийные бактерии, холерные вибрионы, вирусы гепатита) которые сохраняются от нескольких дней до недель. Именно поэтому водный путь передачи является одним из возможных факторов распространения кишечных инфекций.

Отбор проб воды

В зависимости от задачи исследования определяют место и время отбора пробы.

Для исследования воды открытых водоемов, а также колодцев отбирают пробы воды на глубине 10-15 см от поверхности в стерильные флаконы.

Для отбора проб водопроводной воды используют стерильные склянки вместимостью 500 мл с ватно-марлевыми пробками. Бактериологическое исследование отобранных проб должно производиться не позднее 2 ч с момента отбора или не позднее 6 ч при хранении пробы при 1-5⁰ С.

Методы определения микробного числа

В 1 мл исследуемой воды определяют содержание мезофильных аэробов и факультативных анаэробов, способных при 37⁰ С в течение суток на МПА образовывать колонии, видимые невооруженным глазом или при увеличении в 2-5 раз. Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, выбранных с таким расчетом, чтобы число выросших колоний на чашке колебалось от 30 до 300.

При исследовании водопроводной воды в каждую из двух чашек вносят по 1-0,1 мл чистых вод и по 0,01 и 0,001 мл более загрязненных. При определении микробного числа сильно загрязненных вод и сточных жидкостей исследуют по 0,0001 и 0,00001 мл.

Для посева 0,1 мл и меньших объемов исследуемую воду разводят стерильной дистиллированной водой. Готовят последовательно 10-кратные разведения.

По 1 мл каждого разведения вносят в 2 чашки Петри и заливают тонким слоем предварительно растопленного и остуженного до 45⁰ С питательного агара (10-12 мл агара). После интенсивного перемешивания среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы

выращивают в течение суток при температуре 37⁰ С. С лупой при увеличении в 2-5 раз подсчитывают все выросшие колонии. Учитывают результаты только на тех чашках, где число колоний колеблется в пределах от 30 до 300, и производят перерасчет содержания бактерий в 1 мл исследуемой воды.

Общепринятым показателем санитарно-микробиологического исследования воды является показатель коли-индекс, т.е. количество бактерий группы кишечных палочек в 1 мл воды или коли-титр – наименьшее количество или наибольшее разведение воды, в котором еще обнаруживается кишечная палочка.

Воздух не является средой обитания микроорганизмов, а является транзитной средой.

Микрофлору воздуха можно условно разделить на постоянную, часто встречающуюся, и переменную, представители которой, попадая в воздух из собственных им мест обитания, недолго сохраняют жизнеспособность. Постоянно в воздухе обнаруживаются пигментообразующие кокки, палочки, дрожжи, грибы, актиномицеты. В воздухе крупных городов количество микроорганизмов больше, чем в сельской местности. Дождь и снег способствуют очищению воздуха от микробов.

В воздухе закрытых помещений микробов значительно больше, чем в открытых воздушных бассейнах, особенно зимой, при недостаточном проветривании. Состав микрофлоры и количество микроорганизмов, обнаруживаемых в 1 м³ воздуха, зависят от санитарно-гигиенического режима, числа находящихся в помещении людей, состояния их здоровья и других условий.

В воздух могут попадать и патогенные микроорганизмы от животных, людей (больных и носителей).

Для микробиологического исследования воздуха пользуются методами, в основу которых положены оседание (седиментация) и аспирация. При помощи седиментационных методов можно получить общее представление о встречающихся в воздухе микроорганизмов. Аспирационные методы дают возможность определить не только качественное, но и количественные содержание бактерий в определенном объеме воздуха.

Метод оседания

Простейший метод бактериологического исследования воздуха. Это метод оседания, который основан на оседании бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности агара открытой чашки Петри. Чашки с МПА экспонируют 5-10-15 минут в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Метод оседания не дает

количественного представления о содержании микрофлоры в воздухе, так как на открытых чашках плохо улавливаются тонкодисперсные фракции бактериальных капель и пылевых частиц, которые оседают или прибываются токами воздуха к поверхности среды. Метод оседания может быть использован в тех случаях, когда отсутствуют более совершенные приборы и методы или когда нет источника электроэнергии. Для расчета микробного числа воздуха используют следующую формулу:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{v \cdot 10 \cdot t},$$

где X – количество микробов в 1 м^3 воздуха; a – количество колоний в чашке; v – площадь чашки (табл. 3); t – время экспозиции; 5 – время экспозиции; 10 – объем воздуха из которого происходит оседание микробов за 5 мин., л; 100 – площадь, на которую происходит оседание, см^2 ; 1000 – объем воздуха, л.

Таблица

Площадь чашки в зависимости от диаметра

Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см^2
8	50
9	63
10	78,5

Простейшие аспирационные методы основаны на улавливании бактерий жидкостью.

Через сосуд с определенным объемом изотонического раствора NaCl или водопроводной воды просасывают (с помощью насоса) определенный объем воздуха.

Затем проводят высеив на МПА по 0,1-0,2 мл улавливающей жидкости.

Совокупность множества микробиоценозов, характеризующихся определенными взаимосвязями и местом обитания, составляет *нормальную микрофлору человека*. Нормальная микрофлора рассматривается как самостоятельный экстракорпоральный орган с определенной анатомической структурой и функциями.

Виды нормальной микрофлоры:

- *резидентная* – постоянная (естественная) – представлена относительно стабильным составом микроорганизмов, обычно обнаруживаемых в определенных местах тела человека определенного возраста; после нарушений состав этой флоры быстро восстанавливается;

- *транзиторная* – временно попавшая, не характерна для данного биотопа; попадает на кожу или слизистые оболочки из окружающей среды, не вызывая заболеваний. Она представлена непатогенными, т.е. сапрофитными или потенциально патогенными (условно-патогенными) микроорганизмами.

Нормальная микрофлора формируется с рождения. На ее формирование оказывают влияние микрофлора матери и внутрибольничной среды, характер вскармливания.

Дисбактериоз (дисбиоз) – любые количественные или качественные изменения типичной для данного биотопа нормальной микрофлоры человек, возникающие в результате воздействия на макро- или микроорганизм различных неблагоприятных факторов.

Микробиологическими показателями дисбиоза служат:

- 1) снижение численности одного или нескольких постоянных видов;
- 2) потеря бактериями тех или иных признаков или приобретение новых;
- 3) повышение численности транзиторных видов;
- 4) появление новых, несвойственных данному биотопу видов;
- 5) ослабление антагонистической активности нормофлоры.

Лабораторная диагностика дисбактериоза: основной метод – бактериологическое исследование, дополнительный – хроматография жирных кислот в исследуемом материале. Каждому роду бактерий соответствует свой спектр жирных кислот. С отдельных участков тела человека делают мазок и изучают содержащиеся микроорганизмы.

Лечение дисбиоза должно быть комплексным и направленным в основном на устранение причин дисбактериоза и восстановление нормофлоры. При дисбактериозе проводится коррекция состава микрофлоры с помощью:

а) эубиотиков – препараты, содержащие живые бактерициногенные штаммы нормальной микрофлоры (колибактерин, бификол, бифидумбактерин); б) пробиотиков – вещества немикробного происхождения и продукты питания, содержащие добавки, стимулирующие собственную нормальную микрофлору (олигосахариды, муцин, лактоферин).

Задание на занятие

- 1) Определить содержание микроорганизмов в воздухе лабораторных помещений методом седиментации.
- 2) Определить содержание микроорганизмов в ротовой полости (сделать мазок зубного налета).

Задание на самостоятельную работу

Аллохтонная микрофлора – _____

Аутохтонная микрофлора – _____

Общее микробное число – _____

Санитарно-микробиологическое исследование почвы:

Характер загрязнения – _____

Санитарно-показательные микроорганизмы – _____

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха:

Характер загрязнения – _____

Санитарно-показательные микроорганизмы – _____

Примеры инфекционных заболеваний, которые могут передаваться через воздух:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Санитарно-микробиологическое исследование воды поверхностных водоемов:

Характер загрязнения – _____

Санитарно-показательные микроорганизмы – _____

Примеры инфекционных заболеваний, которые могут передаваться через воду:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Титр микроорганизмов – _____

Индекс микроорганизмов – _____

Значение нормальной микрофлоры тела человека:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Дисбактериоз – это _____

Лабораторная диагностика кишечника:

Исследуемый материал – фекалии не позже 2 часов после дефекации.

Метод исследования – бактериологический: посев исследуемого материала с целью определения количества микроорганизмов наиболее значимых групп.

Этапы исследования:

I – приготовление серийных разведений суспензии испражнений;

II – посев на питательные среды из разведений;

III – учет результатов посев и ориентировочная идентификация микроорганизмов;

IV – оценка результатов.

Причины дисбактериозов:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Пути коррекции дисбактериоза:

Эубиотики – _____

Пробиотики – _____

Пребиотики – _____

Общий вывод.

Вопросы к коллоквиуму

1. Предмет изучения медицинской микробиологии и ее значение для практического здравоохранения.
2. Система и номенклатура микроорганизмов.
3. Виды микробиологических лабораторий, правила работы в них. Методы микробиологии.
4. Техника приготовления мазков. Простые и сложные методы окраски. Механизм окрашивания мазков. Тинкториальные свойства микроорганизмов.
5. Световой микроскоп, его основные характеристики. Виды световой микроскопии (темнопольная, фазово-контрастная, люминисцентная). Иммерсионная микроскопия, принцип. Порядок проведения иммерсионной микроскопии. Электронная микроскопия.
6. Формы и размеры бактерий.
7. Химический состав и физические свойства бактериальных клеток.
8. Структура бактериальной клетки: ядерный аппарат, цитоплазма, рибосомы. Их строение, функции и методы выявления.
9. Оболочка бактерий: цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, капсула. Строение, функции и методы выявления.
10. Жгутики и реснички. Их строение, функции и методы выявления.
11. Споры. Их роль и особенности строения. Спорообразование. Методы выявления спор.
12. Понятие анаболизма и катаболизма.
13. Механизм питания бактерий.
14. Аутотрофы и гетеротрофы, ауксотрофы и прототрофы.
15. Требования к искусственным питательным средам.
16. Классификация питательных сред.
17. Простые и сложные питательные среды.
18. Стерилизация и дезинфекция. Методы стерилизации.
19. Методика посева на искусственные питательные среды.
20. Фазы роста на искусственной питательной среде.
21. Выделение чистой культуры аэробов.
22. Механизм дыхания бактерий. Аэробы и анаэробы.
23. Методы культивирования анаэробных бактерий: питательные среды, аппаратура.
24. Выделение чистой культуры анаэробов.
25. Идентификация выделенной чистой культуры бактерий.
26. Основные группы ферментов бактерий.

27. Определение сахаролитических свойств бактерий.
28. Определение протеолитических ферментов.
29. Выделение пептолитических ферментов.
30. Ферменты агрессии: коагулаза, гиалуронидаза, нейроминидаза, ДНК – аза, гемолизин.
31. Классификация вирусов. Понятие вируса и вириона.
32. Морфология вирусов. Функции ДНК и РНК (- нить, + нить).
33. Химический состав нуклепротеида. Ферменты.
34. Методы культивирования вирусов.
35. Взаимодействие вируса с клеткой. Механизм транскрипции и репликации вирусного генома.
36. Механизм интеграции ДНК и РНК вируса в геном клетки.
37. Пути передачи вирусных инфекций.
38. Морфология фагов.
39. Механизм взаимодействия фагов с бактериальной клеткой.
40. Вирулентные и умеренные фаги. Лизогения.
41. Титр фага. Методы определения.
42. Принцип получения культуры фагов. Применение в медицине.
43. Организация генетического аппарата у бактерий. Генотип и фенотип.
44. Внехромосомные факторы: плазмиды у бактерий, их роль: транспозоны: Is – последовательности.
45. Формы изменчивости у микроорганизмов.
46. Мутации, виды мутаций у бактерий.
47. Генетические рекомендации у бактерий (трансформация, трансдукция, конъюгация).
48. Понятие о модификациях.
49. Практическое использование генной инженерии.
50. Теоретическое и практическое значение учения о генетике.
51. Понятие инфекционного процесса и инфекционной болезни. Формы инфекционного процесса.
52. Экзогенные и эндогенные инфекции. Понятие “Входных ворот и инфицирующей дозы”. Пути передачи инфекции.
53. Очаговый и генерализованный инфекционный процесс. Пути распространения инфекций в организме. Понятие: бактериемия, вирусемия, токсинемия, сепсис, септикопиемия.
54. Моно - микстиинфекция, первичная и вторичная инфекция, реинфекция, суперинфекция, рецидив.

55. Классификация инфекционного процесса: по источнику, течению, тяжести, по распространенности.
56. Периоды инфекционного заболевания.
57. Патогенность и вирулентность микроорганизмов, единицы измерения вирулентности.
58. Факторы вирулентности: адгезия, колонизация, пенетрация, инвазия. Их характеристики. Способность подавлять защитные силы макроорганизма.
59. Токсичность. Экзотоксины. Классификация по механизму действия.
60. Эндотоксины. Химическая природа, действие на макроорганизм.
61. Роль макроорганизма в возникновении инфекционного процесса.
62. Понятие об антибиотиках, их открытие.
63. Классификация антибиотиков: по происхождению, способу получения, действию на микроорганизм, антимикробному спектру.
64. Механизм действия антибиотиков на клетки микроорганизмов.
65. Принцип получения антибиотиков.
66. Единицы активности антибиотиков.
67. Механизм устойчивости бактерий к антибиотикам и способы борьбы с ними.
68. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
69. Побочные действия антибиотиков.
70. Экология микроорганизмов. Формы межвидовых взаимоотношений.
71. Санитарная микробиология, ее значение и методы.
72. Микрофлора воды, санитарно – микробиологические показатели: коли – титр, коли – индекс, микробное число, методы их определения.
73. Микробиоценозы почвы. Оценка санитарно – микробиологического состояния почвы: показатели, методы их определения.
74. Микрофлора воздуха, методы определения санитарно – микробиологического состояния.
75. Оценка санитарно – микробного состояния пищевых продуктов и объектов окружающей среды.
76. Нормальная микрофлора организма человека и ее значение. Гнотобиология.
77. Факторы, нарушающие нормальную микрофлору организма. Дисбиоз, пути его устранения.

Практическое занятие №7

Тема: Иммуитет, классификация. Иммуная система

Цель:

1. Систематизация знаний об основных положениях иммунологии.

Задачи:

1. Изучить основные этапы развития иммунологии и аллергологии.
2. Рассмотреть особенности строения иммуной системы.
3. Изучить роль клеток крови и иммунокомпетентных клеток в функционировании иммуной системы.

Основные вопросы темы занятия:

1. Иммунология, задачи иммунологии.
2. История развития иммунологии, основные периоды в становлении иммунологии.
3. Понятие иммуитета. Классификация иммуитета.
4. Разделы современной иммунологии.
5. Структура иммуной системы. Центральные органы иммуной системы.
6. Периферические органы иммуной системы.
7. Роль клеток крови в иммуитете.
8. Иммунокомпетентные клетки: понятие, классификация.
9. Основные клеточные популяции иммуной системы.
10. Формы иммуного ответа.
11. Механизм взаимодействия иммунокомпетентных клеток.

Иммунология – это наука об органах, клетках и молекулах, составляющих иммуную систему, ответственную за обнаружение и удаление чужеродных веществ. *Иммуитет* – совокупность реакций и механизмов, направленных на поддержание гомеостаза и защиту от генетически чужеродных агентов-антигенов. Становление иммунологии начинается с работ Э. Дженнера (1796 г.), который разработал способ искусственной иммунизации против оспы путём заражения коровьей оспой.

Начало иммунологии как самостоятельной науки было положено открытиями Л. Пастера (1880), обнаружившего, что иммунизация кур старой холерной культурой создаёт у них устойчивость к заражению высоковирулентным возбудителем куриной холеры. Пастер сформулировал основной принцип создания вакцин и получил вакцины

против сибирской язвы и бешенства. И. И. Мечников (1887) открыл феномен фагоцитоза и создал клеточную (фагоцитарную) теорию иммунитета. К 1890 гг. работами немецкого бактериолога Э. Беринга его сотрудников было показано, что в ответ на введение микробов и их ядов в организме вырабатываются защитные вещества — антитела. Немецкий ученый П. Эрлих (1898,1900) выдвинул гуморальную теорию иммунитета. В 189-1899 бельгийский ученый Ж. Борде и русский ученый Н. Н. Чистович обнаружили образование антител в ответ на введение чужеродных эритроцитов и сывороточных белков. В 1900 г. австрийский иммунолог К. Ландштейнер открыл группы крови человека и создал основу учения о тканевых изоантигенах. Новое, предсказанное австралийским учёным Ф. Бернетом направление в иммунологии — учение об иммунологической толерантности – возникло после экспериментального воспроизведения этого феномена английским учёным П. Медавара (1953).

Начало отечественной иммунологии положили работы И. И. Мечникова, А.А. Безредки, Г.Н. Габричевского, Н.Ф.Гамалеи, Л.А. Тарасевича. Советская иммунология 20—30-гг. наряду с решением практических вопросов плодотворно занималась теоретическими исследованиями (работы И.Л. Кричевского, В. А. Барыкина, В. А. Любарского, С.И. Гинзбург-Калининой). В 40—60-е гг. проблемы иммунологии успешно решались под руководством Л.А. Зильбера, П.Ф. Здродовского, Г.В. Выгодчикова, М.П. Покровской, В.И. Иоффе, А.Т. Кравченко, П.Н. Косякова и др.

В настоящее время выделяют общую и частную (прикладную) иммунологию. Общая, или фундаментальная, иммунология подразделяется на молекулярную иммунологию, клеточную иммунологию, иммуногенетику, иммунотолерантность, иммунохимию, эволюционную иммунологию, физико-химическую иммунологию. Она изучает структуру и функцию молекул, клеток и органов иммунной системы. функционирование последней как единой гомеостатической. самоуправляемой системы, а также ее связи с другими системами — нервной, эндокринной и т.д. Важными направлениями частной иммунологии являются иммунопрофилактика, инфекционная иммунология, иммунопатология, иммунобиотехнология. трансплантационная иммунология, иммунология репродукции, клиническая, ветеринарная, экологическая и иммуногенотерапия.

Иммунная система состоит из многочисленных солидных и рассредоточенных элементов. Центральными органами иммуногенеза, где развиваются и подвергаются первичному клональному отбору незрелые лимфоциты, являются костный мозг и тимус, к периферическим, где зрелые лимфоциты живут и осуществляют иммунные

ответы, относятся, помимо селезенки и лимфатических узлов, также лимфоэпителиальное глоточное кольцо Вальдейера-Пирогова, и неинкапсулированные рассеянные лимфоцитарные скопления желудочно-кишечного тракта, бронхов и мочеполовой системы. Костный мозг выполняет функции и центрального, и периферического органа. Кровь – также часть иммунной системы, так как элементы иммунной системы, как специфические, так и неспецифические, обладают способностью циркулировать. Это относится к Т- и В-клеткам, иммуноглобулинам (Ig), комплементу и другим эффекторам иммунного ответа.

Оптимальное функционирование иммунной системы обеспечивается взаимодействием специфических клеточных элементов (лимфоцитов) и продуктов клеток (антител и цитокинов) друг с другом, а также с нелимфоидными элементами. Главными из них являются антиген-представляющие клетки (АПК).

Иммунологические исследования проводятся в иммунологических лабораториях, хотя отдельные виды исследований могут выполняться и в микробиологических лабораториях, например серодиагностика инфекционных болезней.

Основные правила работы в базовой лаборатории включают:

1. запрет приема пищи, питья, курения, хранения пищи и применения косметических средств в рабочих помещениях;
2. поддержание чистоты и порядка;
3. дезинфекцию рабочих поверхностей не реже 1 раза в день и после каждого попадания на них заразного материала;
4. мытье рук персоналом после работы с заразным материалом, животными, перед уходом из лаборатории;
5. запрет работ с пипеткой при помощи рта;
6. проведение всех работ таким образом, чтобы свести к минимуму возможность образования аэрозоля;
7. обеззараживание всех инфицированных материалов перед выбросом или повторным использованием.

Лабораторная иммунология имеет собственный предмет исследования, связанный с оценкой иммунного статуса, включая определение параметров клеточного и гуморального иммунитета, диагностику и характеристику аутоиммунных заболеваний, иммунный компонент широко распространенной патологии. Патогенез

таких болезней как диабет II типа, диффузный токсический зоб, ревматизм связывают в первую очередь с иммунными нарушениями. Без иммунологического исследования невозможно диагностировать ВИЧ-инфекцию, вид гепатита, системные коллагенозы, ряд злокачественных заболеваний, лимфолифферативную патологию и т.д. Инфекционная иммунология становится отдельным современным направлением лабораторной диагностики, позволяющим не только идентифицировать вирусные, бактериальные, паразитарные инфекции, но и определить титры антител, оценить иммунитет к отдельным видам инфекционных заболеваний, на базе определения вирусной нагрузки прогнозировать переход инфицирования в клинические формы заболевания, в частности развитие СПИД.

Иммунологические методы исследования широко внедрились в смежные виды лабораторной диагностики: цитологию (иммуоцитохимия), биохимию (иммуоферментный анализ, иммуотурбидиметрия, нефелометрия, радиоиммунный, иммуохимический анализ), микробиологию, гематологию и др. Высокая специфичность и чувствительность делает эти подходы наиболее перспективными при разработке новых диагностических методов и тестов. Разработка отечественных панелей поликлональных и моноклональных антител, создание на их основе широкого спектра диагностических тест систем — актуальная задача научных коллективов, тесно взаимодействующих с лабораторной службой. Лабораторная диагностика — наиболее перспективная область внедрения научных разработок в области иммунологической диагностики. В свою очередь необходимо внедрять иммунологические исследования в рутинную лабораторную службу и развивать и укреплять сеть профильных лабораторий, специализирующихся на иммунологических методах диагностики. Отечественная производственная индустрия не выпускает высокопроизводительные иммуохимические, иммуоферментные анализаторы, проточные фотометры другую специализированную лабораторную технику. Тенденцию к закупке исключительно импортного лабораторного оборудования необходимо переломить и способствовать всячески развитию отечественной производственной базы.

Задания практической работы:

1. Освоить правила техники безопасности в иммунологической лаборатории.

Оснащение занятия:

1. Микроскоп.
2. Фиксированные препараты нейтрофилов и гонококков

Задание на самостоятельную работу

1. Дайте определения понятиям:

Иммунология – _____

Иммунитет – _____

Иммунокомпетентные клетки- _____

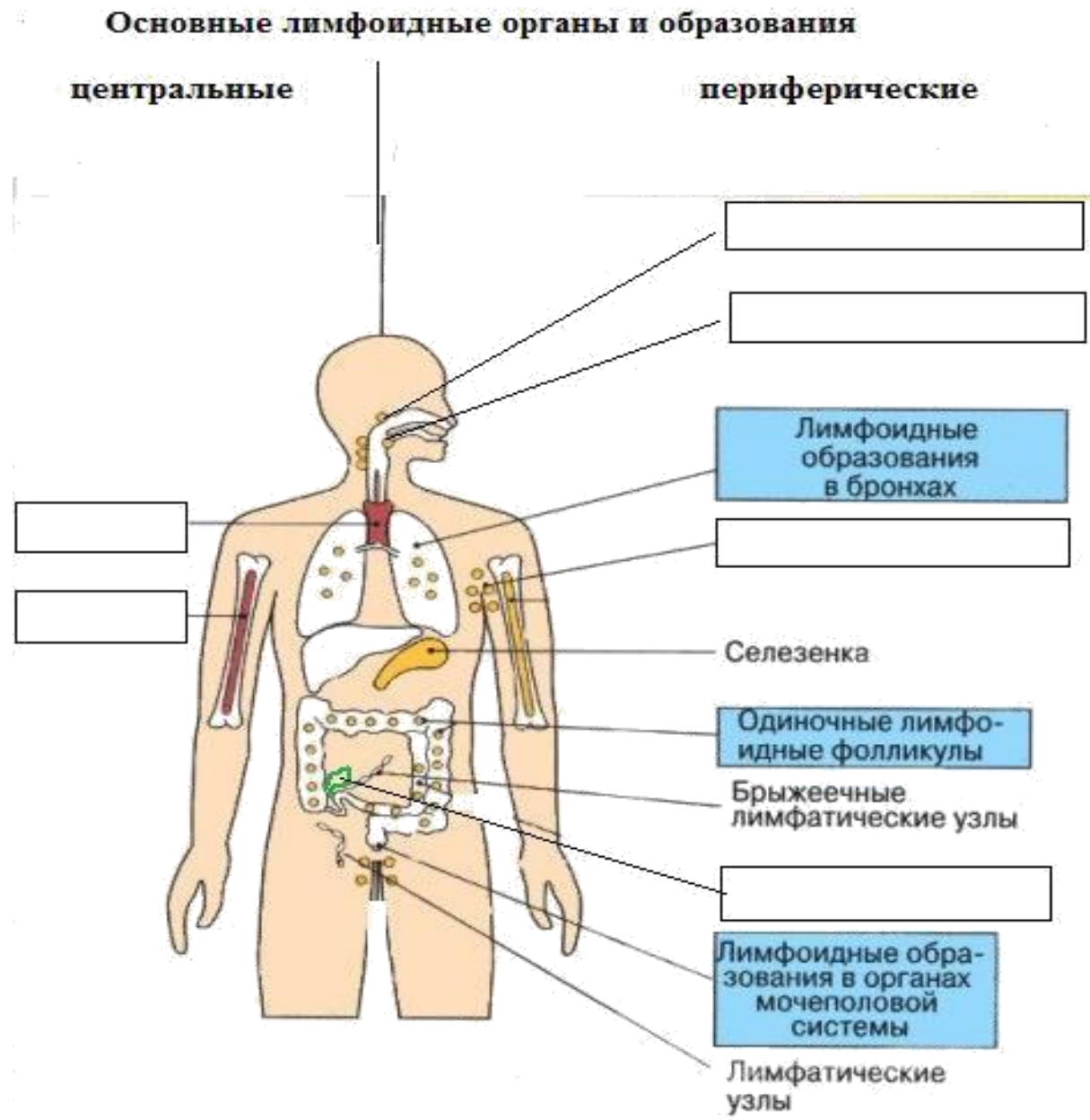
Антигенпрезентирующие клетки- _____

CD (claster of differentiation)- _____

2. Заполните таблицу.

Виды иммунитета	Определение
Естественный	
Искусственный	
Приобретенный	
Врожденный	
Стерильный	
Нестерильный	
Искусственный активный	
Искусственный пассивный	
Антитоксический	
Антимикробный	
Клеточный	
Гуморальный	

3. На схематическом изображении отметьте основные органы иммунной системы.



4. Заполните таблицу.

Маркеры клеток иммунной системы

<i>Маркер</i>	<i>Распространенность</i>	<i>Функции</i>
CD1	Тимоциты	
CD3	Все зрелые Т-лимфоциты	
CD4	Т-хелперы	
CD8	Цитотоксические и супрессорные Т-лимфоциты, НК	
CD14	Моноциты, возможно гранулоциты и клетки Лангерганса	
CD15	Гранулоциты, моноциты	
D16	НК, моноциты, гранулоциты	
CD18	Все лейкоциты	
CD20	В-лимфоциты	
CD28	Т-клетки, активированные В	
CD29	Все лейкоциты, макрофаги, тромбоциты. Отсутствует на стволовых клетках.	
CD31	В, моноциты, гранулоциты, Тромбоциты	
CD34	Костномозговые стволовые клетки, эндотелий	
CD40	В, фолликулярные дендритные клетки	
CD45R O	Ранние Т-, В-лимфоциты, НК, моноциты, макрофаги, гранулоциты	

CD45	Все лейкоциты	
CD54	Все лейкоциты, макрофаги, тромбоциты, клетки Лангерганса, стволовые клетки.	
CD61	Тромбоциты	
CD71	Макрофаги, стволовые клетки, активированные лимфоциты и моноциты.	

5. Дайте определение функции клеток крови в иммунитете:

лимфоциты –

нейтрофилы –

моноциты –

тромбоциты –

базофилы –

эозинофилы –

6. Допишите предложения.

Фундаментальное и прикладное значение иммунологии

1. _____
2. _____
3. _____

Теории иммунитета

Теория естественного отбора Н. Эрне – _____

Теория непрямо́й матрицы Ф. Бернета и Ф. Феннера
– _____

Клонально-селекционная теория Ф. Бернета
– _____

Общий вывод.

Практическое занятие №8

Тема: Антигены. Антитела

Цель: сформулировать знания о механизмах гуморального иммунного ответа; формирование у студентов навыков анализа теоретических вопросов по общей иммунологии на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы

Задачи:

1. Рассмотреть понятия «антигены», «антитела».
2. Изучить фазы антителообразования.

Основные вопросы занятия:

1. Антигены: понятие, химическая природа.
2. Строение антигена.
3. Свойства антигенов: гетерогенность, иммуногенность. Виды антигенов по степени чужеродности.
4. Специфичность антигенов, типы антигенной специфичности.
5. Классификация антигенов.
6. Классификация антигенов по иммунному реагированию. Гаптены. Адъюванты.
7. Антигены организма человека.
8. Антигены бактерий, вирусов, опухолевые антигены. Аутоантигены.
9. Пути проникновения антигенов в макроорганизм.
10. Антитела: понятие, структура.
11. Структура иммуноглобулина, классы иммуноглобулинов. Сывороточные иммуноглобулины.
12. Свойства антител.
13. Фазы антителообразования.
14. Функции антител при образовании иммунного комплекса.

Антигенами называют биополимерные природные и синтетические молекулы размером от 1 до 10 кД (белки, полисахариды, сложные эфиры, сложные циклические соединения, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды, а также их комплексы, в том

числе, липидсодержащие), способные специфическим образом взаимодействовать с рецепторами Т- и В-лимфоцитов. Следовательно, антигеном является молекула, способная вызвать при введении в организм иммунный ответ. Иммунный ответ на антигены может выражаться в различных формах (биосинтез комплементарных антигену белков – антител, антигенспецифические клеточные реакции, аллергия, иммунологическая толерантность). Низкомолекулярные вещества могут вызывать иммунный ответ не сами по себе, а только образуя структурно комплексы с биополимером носителем. В этом качестве они именуется гаптенами. Характерными свойствами антигенов являются антигенность, иммуногенность и специфичность. Антигенность – это потенциальная способность молекулы антигена активировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с факторами иммунитета (антитела, клон эффекторных лимфоцитов). При этом компоненты иммунной системы взаимодействуют не со всей молекулой антигена, а только с ее небольшим участком, который получил название антигенной детерминанты, или эпитопа. Иммуногенность – потенциальная способность антигена вызывать по отношению к себе в макроорганизме специфический продуктивный ответ. Иммуногенность зависит от трех групп факторов: молекулярных особенностей антигена, кинетики антигена в организме, реактивности макроорганизма. Специфичностью называют способность антигена индуцировать иммунный ответ к строго определенному эпитопу. Специфичность антигена во многом определяется свойствами составляющих его эпитопов.

Иммуноглобулины (Ig) или, антитела, являются продуктами функционально активных В-клеток или плазмацитов. Они состоят из полипептидных цепей различной конфигурации. Имеется 5 основных классов (или, иммунологических изоформ) Ig, различают также и подклассы. Молекулы Ig состоят из полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными мостиками. Они имеют характерную пространственную конфигурацию, содержат также углеводородные группировки, хотя последние непосредственно не относятся к специфической части антител. Тяжелые (H) и легкие (L) цепи составляют основной каркас Ig. IgG может служить примером типовой молекулы Ig и состоит из двух одинаковых тяжелых и двух идентичных легких цепей. Разные участки целых молекул Ig выполняют различные функции.

Основные свойства иммуноглобулинов включают связывание специфического антигена, индуцировавшего их образование, и их взаимодействие с Fc-рецептором эффекторной клетки или клетки-мишени. В результате связывания патогена антитела препятствуют его распространению в организме, в случае связывания токсических

продуктов они способствуют их нейтрализации. Иммуноглобулины по структуре, антигенным и иммунобиологическим свойствам разделяются на пять классов: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD.

Повторное попадание антигена приводит к развертыванию вторичного ответа. При первичном иммунном ответе сывороточные антитела определяются через 1-2 недели после того, как организм сталкивается с новым антигеном. Их титр достигает максимума через 1-2 месяца, а затем уровень их концентрации падает. При этом, преобладают иммуноглобулины класса М. Повторная встреча организма на антиген ведет более быстрому и мощному ответу: антитела определяются уже через несколько дней, их титры достигают многократно более высоких уровней, а падения концентрации не происходит в течение многих месяцев. При этом преобладают иммуноглобулины класса G.

Задания практической работы:

1. Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК)

Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) является показателем естественной способности крови к самоочищению. В 1886 г. Высокович обнаружил, что различные бактерии, введенные в кровь кроликов и собак, не удаляются из организма выделительными органами, если эти микробы не повреждены. Исчезновение их из организма связано с наличием в сыворотке особых веществ, убивающих и растворяющих микробные клетки. Бактерицидное действие сыворотки крови распространяется как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии.

Ход работы

Из 18-ти часовой культуры кишечной палочки методом серийных разведений готовят рабочую концентрацию до 40-50 тыс. м. т. в 1 мл. Рабочую взвесь тест-микробов в количестве 0,1 мл высевают на чашку Петри с МПА. Шаблоном диаметром 20 мм по поверхности агара с культурой микроорганизмов делают отверстия (в центре и по периферии отмечают контрольные отверстия, на которые не наносится испытуемая сыворотка). На каждую площадку с посевом тест-культуры наносят пипеткой 0,05 мл исследуемой сыворотки. Через 24 часа инкубации в условиях термостата проводят подсчет выросших колоний, как на опытных, так и на контрольных площадках. Бактерицидную активность сыворотки крови рассчитывают по формуле:

$$\text{БАСК}(\%) = 100 \times (1 - \frac{\text{конечное количество жизнеспособных бактерий}}{\text{исходное количество бактерий}})$$

исходное количество бактерий

Нормативное значение – 80 - 90%

Записать вывод.

Оснащение занятия

1. Микроскоп.
2. Чашки Петри с МПА – 5 шт.
3. 18-ти часовая культура кишечной палочки
4. Физ. раствор 200 мл
5. Испытуемая сыворотка крови
6. Термостат

Задание на самостоятельную работу:

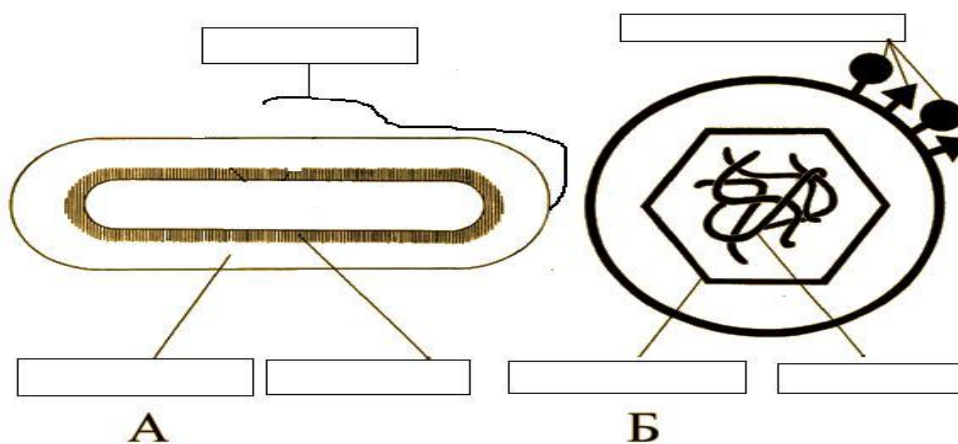
1. Дайте определение:

Иммуноглобулины – _____

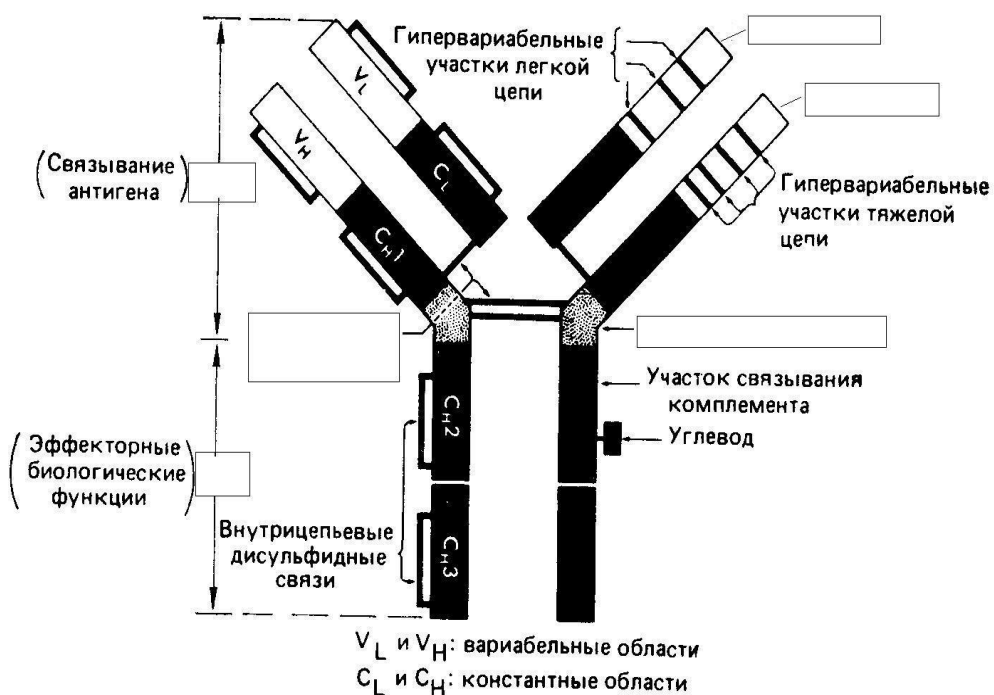
Авидность – _____

Аффинность – _____

2. В схеме впишите антигены бактерий (А) и антигены вирусов (Б):



3. В схеме строения иммуноглобулина впишите недостающие компоненты.



4. Выберите правильный ответ.

а) При иммунодефиците с поражением В-лимфоцитов наблюдается:

1) полное отсутствие выработки антител; 2) выработка антител только при введении гаптенов; 3) выработка антител только на тимусзависимые антигены; 4) выработка антител только на тимуснезависимые.

б) Главными клетками-регуляторами иммунного ответа являются:

1) макрофаги, моноциты; 2) Т-хелперы; 3) Т-киллеры; 4) В-лимфоциты; 5) Т-супрессоры.

в) Лимфокины – это: 1) факторы, обуславливающие подвижность лимфоцитов; 2) медиаторы иммунного ответа, продуцируемые лимфоцитами; 3) вещества, продуцируемые бактериями и убивающие лимфоциты.

г) В распознавании антигенов «свой-чужой» участвуют: 1) макрофаги; 2) моноциты; 3) Т-лимфоциты; 4) плазматические клетки; 5) В-лимфоциты.

д) Цитотоксический эффект в клеточных реакциях иммунитета осуществляют: 1) макрофаги; 2) моноциты; 3) Т-хелперы; 4) Т-киллеры; 5) В-лимфоциты; 6) Т-супрессоры.

е) Интерферон – это: 1) неспецифический фактор противовирусного иммунитета; 2) белок, принимающий участие в активации комплемента по альтернативному пути; 3) белок, принимающий участие в активации комплемента по классическому пути; 4) фермент, расщепляющий пептидогликан (муреин).

ж) Пропердин – это: 1) неспецифический фактор противовирусного иммунитета; 2) белок, принимающий участие в активации комплемента по альтернативному пути; 3) белок, принимающий участие в активации комплемента по классическому пути; 4) фермент, расщепляющий пептидогликан (муреин).

з) Лизоцим – это фермент, расщепляющий: 1) пептидогликан (муреин); 2) пептиды; 3) лизин.

и) К макрофагальной системе относятся: 1) моноциты; 2) микроглия ЦНС; 3) купферовские клетки печени; 4) нейтрофилы; 5) базофилы; 6) эозинофилы; 7) лимфоциты.

5. Сформулируйте и запишите ответы на вопросы:

1) Почему наиболее важное клиническое значение имеют антигены человека системы АВ0 и резус - фактор?

2) Чем отличаются антигены системы АВ0?

3)Что такое антигены гистосовместимости?

4) Какую биологическую роль играют антигены гистосовместимости?

5) Какое клиническое значение имеют опухолевые антигены?

6. Зарисуйте график динамики образования антител при первичном и вторичном иммунном ответе. Дать краткую характеристику фазам иммунного ответа.

Общий вывод.

Практическое занятие №9

Тема: Серологические методы диагностики

Цель: формирование знаний о видах серологических реакций.

Задачи:

1. Рассмотреть виды серологических реакций.
2. Изучить механизмы постановки серологических реакций.

Основные вопросы темы занятия:

1. Серологические реакции - понятие, свойства, применение.
2. Реакция агглютинации – определение, компоненты, применение.
3. Стадии реакции агглютинации, учет результатов (О-, Н-агглютинация).
4. Способы постановки реакции агглютинации – ориентировочная и развернутая. Титр реакции агглютинации.
5. Варианты реакции агглютинации – РПГА, РНГА, РТГА, реакция коагглютинации, Реакция Кумбса.
6. Реакция преципитации – определение, компоненты, применение.
7. Способы постановки реакции преципитации – кольцепреципитация, преципитация в геле (по Манчини, Оухтерлони), термопреципитация, реакция флоккуляции.
8. Реакция связывания комплемента – компоненты, фазы, применение.
9. Механизм, учет результатов реакции связывания комплемента.
10. Реакция иммуноблотинга, реакция нейтрализации токсина антитоксином (in vivo, in vitro).
11. Реакции с мечеными антигенами и антителами – реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, радиоиммунный метод. Принцип постановки, механизм.

Иммунные реакции используют при диагностических и иммунологических исследованиях у больных и здоровых людей. С этой целью применяют серологические методы, т. е. методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген—антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма.

Обнаружение в сыворотке крови больного антител против антигенов возбудителя позволяет поставить диагноз болезни. Серологические исследования применяют также

для идентификации антигенов микробов, различных биологически активных веществ, групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, иммунных комплексов, рецепторов клеток и др.

В иммунологии широко применяются реакции агглютинации, преципитации, нейтрализации, реакции с участием комплемента, с использованием меченых антител и антигенов (радиоиммунологический, иммуноферментный, иммунофлюоресцентный методы). Перечисленные реакции различаются по регистрируемому эффекту и технике постановки, однако, все они основаны на реакции взаимодействия антигена с антителом и применяются для выявления как антител, так и антигенов. Реакции иммунитета характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью.

Реакция агглютинации бактерий с использованием соответствующей антибактериальной сыворотки относится к наиболее простым серологическим реакциям. Преципитация происходит в результате взаимодействия антител с растворимыми антигенами. Простейшим примером реакции преципитации является образование в пробирке непрозрачной полосы преципитации на границе наслоения антигена на антитело. Широко применяют различные разновидности реакции преципитации в полужидких гелях агара или агарозы (метод двойной иммунодиффузии по Оухтерлоню, метод радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез).

Имунофлюоресценция заключается в использовании меченных флюорохромом антител, точнее, иммуноглобулиновой фракции антител IgG. Меченное флюорохромом антитело образует с антигеном комплекс антиген-антитело, который становится доступным наблюдению под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флюорохрома.

Характерным отличием реакции связывания комплемента (РСК) от реакции агглютинации и преципитации есть участие в ней, кроме антигена и антитела, ингредиентов реакции гемолиза, которая выступает в виде индикаторной системы. Взаимодействие антигена с антителом не всегда предопределяет визуальные изменения, которые позволяют определить результат реакции. Однако известно, что при образовании комплекса антиген-антитело к нему всегда присоединяется комплемент. Если антиген и антитело не отвечают друг другу, то комплемент не связывается, остается свободным в системе. При добавлении комплекса эритроциты барана - гемолизины свободный комплемент, связываясь с ним, вызывает гемолиз эритроцитов. Этот принцип и положено в основу РСК. При соответствии антигена антителу с ним связывается комплемент. Чтобы убедиться в этом, добавляют эритроциты барана и гемолитическую сыворотку. При

отсутствии гемолиза заключают, что реакция положительная, при наличии гемолиза - реакция негативная.

Задания практической работы:

1. Реакция связывания комплемента

Вначале в 2 пробирки разливается инактивированная и разведённая 1:5 испытуемая сыворотка. Затем в 1-ю пробирку приливается антиген, во вторую — физиологический раствор. После этого во все пробирки добавляется рабочая доза комплемента.

После смешивания ингредиентов штатив с пробирками помещается в термостат при 37 °С на 30 минут (горячее связывание). При холодном связывании штатив с пробирками помещается в ледник при температуре — 4°С на 18 часов. После выдерживания в термостате во все пробирки добавляется гемолитическая система. Реакция ставится в объёме 0,5 мл. Пробирки снова помещают в термостат на 2 часа, после чего производится предварительная регистрация результатов. Пробирки остаются при комнатной температуре, а на следующий день отмечается окончательный результат.

Степень интенсивности реакции оценивается в плюсах. Полная задержка гемолиза — четыре плюса (++++), неполная - три и один плюс. Полный гемолиз обозначается минусами (-).

Записать вывод.

Оснащение занятия

1. пробирки
2. Диагностикумы
3. Сыворотки
4. Гемолитическая система
5. Пастеровские пипетки
6. Эритроциты барана
7. Физиологический раствор

Задание на самостоятельную работу:

1. Заполните таблицу.

Реакции АГ+АТ протекают в 2 фазы:

1-я специфическая

Взаимодействуют антиген и антитело с образованием комплекса АГ+АТ

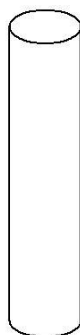
2-я неспецифическая

Проявление этой реакции, видимый эффект

Определяемые свойства реакции	Фазы реакции	
	1-я – взаимодействие АГ+АТ	2-я развитие видимых проявлений
Специфичность	+	
Вид реакции		+
Чувствительность		+
Скорость		+

2. Напишите определение и зарисуйте результат реакции агглютинации.

Реакция агглютинации – _____

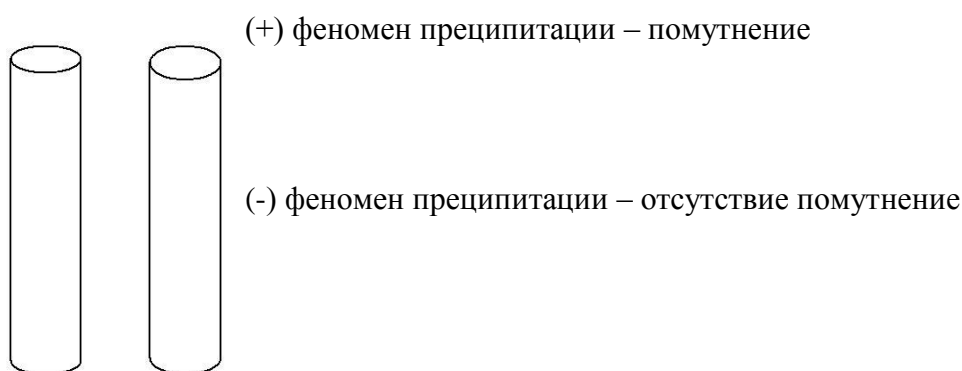


(+) феномен агглютинации – образование агрегатов (крупнохлопчатых при наличии у бактерий жгутиков или мелкозернистых при их отсутствии)

(-) феномен агглютинации – равномерная муть

3. Напишите определение и зарисуйте результат реакции преципитации.

Реакция преципитации – _____



Преципитирующие сыворотки получают _____ *Титром*
преципитирующей сыворотки называется _____

4. Опишите реакцию связывания комплемента (РСК)

Ингредиенты:

АГ – _____

АТ – _____

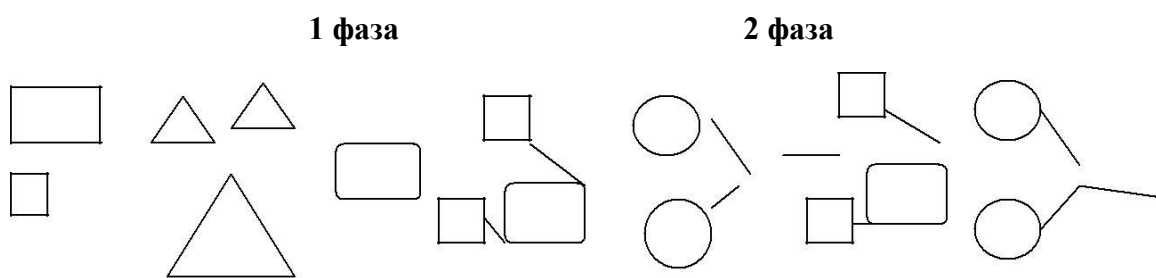
Комплемент – _____

Титр комплемента – _____

Гемолитическая система:

Эритроциты барана

Гемолитическая сыворотка



положительный результат

Для получения достоверного результата необходимо, чтобы все известные ингредиенты были взяты в определенных количествах (рабочие дозы). Для этого комплемент и гемолитическую сыворотку предварительно титруют и вычисляют их рабочие дозы.

Общий вывод.

Практическое занятие №10

Тема: Клиническая микробиология, цели и задачи. Этиология и патогенез внутрибольничных инфекций. Возбудители внутрибольничных инфекций.
Коллоквиум

Цель:

1. Формирование знаний о внутрибольничных инфекциях и их возбудителях.

Задачи:

1. Познакомиться с возбудителями внутрибольничных инфекций.
2. Изучить эпидемиологию и патогенез внутрибольничных инфекций.
3. Рассмотреть методы лабораторной диагностики внутрибольничных инфекций.

Основные вопросы темы занятия:

1. Клиническая микробиология, её задачи.
2. Причины возникновения внутрибольничных инфекций.
3. Классификация в\б инфекций.
4. Основные возбудители госпитальных инфекций.
5. Источники и пути распространения госпитальных инфекций.
6. Характеристика условно- патогенных микроорганизмов, возбудители в\б инфекций.
7. Особенности в\б инфекций.
8. Микробиологическая диагностика и профилактика в\б инфекций.
9. Классификация клебсиелл и их роль в возникновении внутрибольничных инфекций.
10. Биологические свойства клебсиелл: морфология, тинкториальные свойства, культивирование, биохимические свойства, антигены, токсины, другие факторы патогенности.
11. Вызываемые заболевания. Эпидемиология и патогенез.
12. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика клебсиллезов.
13. Классификация и биологические свойства протеев.
14. Заболевания. Эпидемиология и патогенез.
15. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика протейной инфекции.
16. Роль синегнойной палочки в возникновении госпитальных инфекций, классификация.
17. Биологические свойства синегнойных палочек.
18. Эпидемиология. Вызываемые заболевания.

19. Микробиологическая диагностика, лечение и спец. профилактика синегнойной инфекции.
20. Классификация кампилобактерий и их роль в возникновении заболеваний человека.
21. Биологические свойства кампилобактерий.
22. Эпидемиология. Вызываемые заболевания и патогенез.
23. Микробиологическая диагностика, лечение, профилактика кампилобактерий.

Внутрибольничными инфекциями называют инфекции возникающие после поступления больного в больницу. Они связаны с оказанием медицинской помощи. Эти инфекции называют еще госпитальными, нозоминальными и ятрогенными (от греч. *iatros* врач, *genus* порождение).

Внутрибольничные инфекции появились с открытием первых больниц. Заболеваемость послеродовой горячкой, сепсисом после хирургических операций, тяжело протекающие диареи со смертельным исходом были очень широко распространены, и только в конце XIX века с разработкой методов антисептики, предложенный Земмельвейсом и Листером, а также асептики, введенный Пастером и Коком, удалось добиться снижения заболеваемости госпитальными инфекциями.

Новый период нарастания госпитальных инфекций наступает с началом ЭРЫ антибиотиков и продолжается до настоящего времени. Уже в начале 50-х годов начинается новая волна стафилококковых инфекций. Их характерной особенностью было то, что они представляли угрозу в основном для стационарных больных. Начиная с 70-х годов на первое нести выходят заболевания, вызываемые грамотрицательными бактериями. Возникли тяжелые эпидемии энтероколита среди новорожденных, вызываемые неизвестными до этого патогенными штаммами *E. coli*.

В настоящее время все больше госпитальных инфекций вызывается условно патогенными микроорганизмами, которые, как правило, обладают устойчивостью к лекарственным препаратам, что снижает эффективность химиотерапии, с каждым годом увеличивается количество таких инфекций. Такое положение обуславливает необходимость постоянный микробиологический исследований в клиниках. Возникает клиническая микробиология как раздел медицинской микробиологии, изучающий заболевания микробной этиологии, возникающие у больных в неинфекционных клиниках. Клиническая микробиология решает следующие задачи:°

1. Исследование микробиологических аспектов внутрибольничных инфекций, дисбактериозов, лекарственной устойчивости возбудителей.
2. Изучение биологии и роли условно патогенных микроорганизмов в этиологии и патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний человека.
3. Разработка методов диагностики, терапии и профилактики микробных заболеваний, возникающий в неинфекционных стационарах.
4. Микробиологическое обоснование и контроль за антимикробными мероприятиями в стационарах.

Задание на занятие

1. Изучить колонии клебсиелл, протей, синегнойной палочки на МПА в чашках Петри.
2. Изучить биохимические свойства клебсиелл, протей, синегнойной палочки.
3. Сделать рисунок-схему окрашенных по Граму микроорганизмов в мазке.

Задание на самостоятельную работу

Внутрибольничные инфекции - _____

Источники внутрибольничных инфекций - _____

Пути распространения внутрибольничных инфекций - _____

КЛАССИФИКАЦИЯ ГОСПИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Тип инфекции	Примеры возбудителей

Опишите методы лабораторной диагностики протей, клебсиелл:

Общий вывод.

Вопросы к коллоквиуму:

1. Иммунология, задачи иммунологии.
2. История развития иммунологии, основные периоды в становлении иммунологии.

3. Понятие иммунитета. Классификация иммунитета.
4. Структура иммунной системы. Центральные органы иммунной системы.
5. Периферические органы иммунной системы.
6. Роль клеток крови в иммунитете.
7. Имунокомпетентные клетки: понятие, классификация.
8. Основные клеточные популяции иммунной системы.
9. Формы иммунного ответа.
10. Механизм взаимодействия иммунокомпетентных клеток.
11. Антигены: понятие, химическая природа.
12. Строение антигена.
13. Свойства антигенов: гетерогенность, иммуногенность. Виды антигенов по степени чужеродности.
14. Специфичность антигенов, типы антигенной специфичности.
15. Классификация антигенов.
16. Классификация антигенов по иммунному реагированию. Гаптены. Адъюванты.
17. Антигены организма человека.
18. Антигены бактерий, вирусов, опухолевые антигены. Аутоантигены.
19. Пути проникновения антигенов в макроорганизм.
20. Антитела: понятие, структура.
21. Структура иммуноглобулина, классы иммуноглобулинов. Сывороточные иммуноглобулины.
22. Свойства антител.
23. Фазы антителообразования.
24. Функции антител при образовании иммунного комплекса.
25. Теории иммунитета.
26. Серологические реакции - понятие, свойства. применение.
27. Реакция агглютинации - определение, компоненты, применение.
28. Стадии реакции агглютинации, учет результатов (О-, Н-агглютинация).
29. Способы постановки реакции агглютинации - ориентировочная и развернутая. Титр реакции агглютинации.
30. Варианты реакции агглютинации - РПГА, РНГА, РТГА, реакция коагглютинации, Реакция Кумбса.
31. Реакция преципитации - определение, компоненты, применение.
32. Способы постановки реакции преципитации - кольцепреципитация, преципитация в геле (по Манчини, Оухтерлони), термопреципитация, реакция флоккуляции.

33. Реакция связывания комплемента - компоненты, фазы, применение.
34. Механизм, учет результатов реакции связывания комплемента.
35. Реакция иммуноблотинга, реакция нейтрализации токсина антитоксином (in vivo, in vitro).
36. Реакции с мечеными антигенами и антителами - реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, радиоиммунный метод. Принцип постановки, механизм.
37. Клиническая микробиология, её задачи.
38. Причины возникновения внутрибольничных инфекций.
39. Классификация в/б инфекций.
40. Основные возбудители госпитальных инфекций.
41. Источники и пути распространения госпитальных инфекций.
42. Характеристика условно – патогенных микроорганизмов, возбудители в/б инфекций.
43. Особенности в/б инфекций.
44. Микробиологическая диагностика и профилактика в/б инфекций.
45. Классификация клебсиелл и их роль в возникновении внутрибольничных инфекций.
46. Биологические свойства клебсиелл: морфология, тинкториальные свойства, культивирование, биохимические свойства, антигены, токсины, другие факторы патогенности.
47. Вызываемые заболевания. Эпидемиология и патогенез.
48. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика клебсиллезов.
49. Классификация и биологические свойства протеев.
50. Заболевания. Эпидемиология и патогенез.
51. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика протейной инфекции.
52. Роль синегнойной палочки в возникновении госпитальных инфекций, классификация.
53. Биологические свойства синегнойных палочек.
54. Эпидемиология. Вызываемые заболевания.
55. Микробиологическая диагностика, лечение и спец. профилактика синегнойной инфекции.
56. Биологические свойства *Helicobacter pylori*.
57. Эпидемиология. Вызываемые заболевания и патогенез.
Микробиологическая диагностика, лечение, профилактика вызываемых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аленушкина А.В. Медицинская микробиология: Учебное пособие - Ростов н/Д.: Феникс, 2003. – 480с.
2. Асонов Н.Р. Микробиология: учебник. - М. : Колос : Колос-Пресс, 2002. – 351 с.
3. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 736 с.
4. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова и др. – М.: Медицина, 2005. – 367с.
5. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Перунова Н.Б., Усвяцов Б.Я., Черкасов С.В. Симбиоз и его роль в инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 300с.
6. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: учебник. - М.: Академия, 2006. – 461 с.
7. Клиническая лабораторная аналитика. Том 4. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Агат-Мед, 2003. - 816с.
8. Коробкин В.И., Передельский Л.В. Экология. – Ростов н/Д: Феникс, 2003. – 575с.
9. Кренделев М.С. Нормальная микрофлора ротовой полости человека // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.
10. Лобзин, Ю.В. Дисбактериозы кишечника / Ю.В. Лобзин, В.Г. Макаров, Е.Р. Корвякова, С.М. Захаренко // СПб.: Фолиант, 2003. – 256 с.
11. Лысак В.В. Микробиология. – Минск: БГУ, 2007. – 429с.
12. Маянский А.Н. Патологическая микробиология / А.Н. Маянский. – Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2006. – 520с.
13. Микробиология и иммунология для стоматологов, [пер. с англ.] / Под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантц, Р. А. Берне, Д. Дж. Лебланка; пер. с англ. под ред. В. К. Леонтьева. — М.: Практическая медицина, 2010. — 504 с.: ил..
14. Прозоркина Н.В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие / Н.В. Прозоркина. – Ростов н/Д: Феникс, 2006. – 384с.
15. Пыльцев М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пыльцев // М.: Медицина. – 2004. – 496 с.
16. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. и др. Практические аспекты современной клинической микробиологии. - Тверь: Триада, 2004. - 312с.

17. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции в оториноларингологии. _СПб.: КЛЕ-Т, 2009. – С.28-38.
18. Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. - М. : Дрофа, 2005. – 255 с.
19. Хаитов, Р.М. / Микробиоценоз кишечника и иммунитет / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Русский медицинский журнал. – 2003. № 11. С. 122-125.
20. Чернова Н.М., Былова А.М. Общая экология. – М.: Дрофа, 2004. – 416с.
21. Экология микроорганизмов: учебник / под ред. А.И. Нетрусова. - М. : Академия, 2004. – 266 с.
22. Микробиология, вирусология и иммунология: учебник. / под ред. В.Н. Царева. – М.: Практическая медицина, 2010. – 576 с.