

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Л.С. Муштоватова, О.С. Жданова,  
О.П. Бочкарева, А.В. Грицута

# **ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Под редакцией профессора М.Р. Карповой

Томск  
Издательство СибГМУ  
2016

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73

П691

**П 691 Практикум по общей микробиологии** / Л.С. Муштоватова, О.С. Жданова, О.П. Бочкарева, А.В. Грицута; под ред. проф. М.Р. Карповой. – Томск: Издательство СибГМУ, 2016. – 213 с.

Учебное пособие «Практикум по общей микробиологии» разработано для проведения практических занятий по дисциплине «Микробиология, вирусология». Для каждого занятия приведены цель, план, вопросы для самоподготовки, информационный и практический блоки, тестовые задания и ситуационные задачи. Предложенная структура пособия помогает выделить главные аспекты изучаемых вопросов, организовать и конкретизировать учебный процесс. Для иллюстрации изложенного материала использованы авторские рисунки и схемы.

Данное пособие составлено в соответствии с Федеральными Государственными образовательными стандартами высшего образования (ФГОС ВО) и предназначается для студентов, обучающихся по специальностям: 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия.

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73

**Рецензент:**

**М.В. Чубик** – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии СибГМУ.

*Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава (протокол № 4 от 24.05. 2016 г.).*

© Сибирский государственный медицинский университет, 2016

© Л.С. Муштоватова, О.С. Жданова, О.П. Бочкарева, А.В. Грицута, 2016

## ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Практикум по общей микробиологии» разработано для проведения практических занятий по дисциплине «Микробиология, вирусология» у студентов лечебного и педиатрического факультетов медицинских вузов.

На занятиях по микробиологии студенты не только изучают основные свойства микроорганизмов, но и приобретают навыки работы с возможными возбудителями инфекционных заболеваний, учатся выявлять их в материале для больного, знакомятся с основными методами микробиологической диагностики. Поэтому для освоения этого предмета необходим не только определенный объем теоретических знаний, но и практическая работа студентов.

Организации практического занятия и посвящено данное пособие. Оно состоит из отдельных подразделов соответственно количеству практических занятий по микробиологии. Для каждого занятия разработаны цель, план занятия, вопросы для самоподготовки. В материал также входят информационный и практический блоки.

Информационный блок содержит теоретический материал, необходимый для освоения данной темы и ответов на вопросы для самоподготовки. В этот блок включена информация, недостаточно изложенная в основном учебнике по микробиологии, для более полной подготовки к занятию. Информационный блок обильно иллюстрирован авторскими схемами, рисунками и таблицами.

Практический блок состоит из описания практической работы студента на данном занятии с подробным изложением методик окраски препаратов, посевов, серологических реакций. В конце приведен протокол, в который студент должен записать полученные результаты и при необходимости сделать свое заключение.

В конце каждого занятия приведены тестовые задания и ситуационные задачи для проверки знаний студента по данной теме.

Кроме практических занятий в пособии присутствуют семинары и итоговые занятия. Для проведения семинаров разработаны необходимый теоретический материал и вопросы для контроля и рефератов. Материал по «Общей микробиологии» разделен на три большие части: морфология микроорганизмов, физиология микроорганизмов и иммунология. Каждая часть заканчивается итоговым занятием. Для подготовки студента к итоговым занятиям приведены вопросы. В пособие также вошли вопросы для итогового зачета по всему курсу общей микробиологии.

## **ПЛАН ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ ПО КУРСУ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

1. История развития микробиологической службы. Микробиологическая лаборатория. Классификация микроорганизмов. Морфология бактерий.
2. Структура бактериальной клетки. Сложные методы окраски бактерий.
3. Структура бактериальной клетки. Морфология актиномицетов и спирохет.
4. Морфология риккетсий, хламидий и микоплазм. Микробы-эукариоты. Морфология грибов и простейших.
5. Итоговое занятие по разделу «Морфология бактерий».
6. Питание, размножение, культивирование бактерий. Выделение чистых культур аэробных бактерий.
7. Методы культивирования анаэробов. Ферменты микроорганизмов.
8. Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы.
9. Морфология и биология вирусов. Бактериофаги.
10. Экологическая микробиология. Санитарно-бактериологическое исследование почвы, воды, воздуха. Микрофлора тела человека.
11. Итоговое занятие по разделу «Физиология микроорганизмов».
12. Взаимоотношение паразита и хозяина. Инфекция. Механизмы резистентности.
13. Иммуитет и его проявления. Серологические реакции.
14. Серологические реакции (продолжение).
15. Семинар «Механизмы иммунного ответа. Аллергия и аллергические реакции».
16. Иммунобиологические препараты.
17. Итоговое занятие по разделу «Инфекция и иммунитет».
18. Организация и регуляция генетической системы прокариот.
19. ИТОГОВЫЙ СЕМЕСТРОВЫЙ ЗАЧЕТ.

19 занятий по 3 ч.

## ИСТОРИЯ КАФЕДРЫ МИКРОБИОЛОГИИ СИБИРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА



П. В. Бутягин

В 1919 г. на базе Томского бактериологического института была открыта первая в Сибири кафедра микробиологии, которую возглавил директор института профессор, заслуженный деятель науки П.В. Бутягин (1867–1953). Приоритетным направлением в деятельности кафедры в те годы была подготовка врачей-бактериологов для нужд здравоохранения. Научные исследования были посвящены вопросам общей микробиологии, эпидемиологии, изучения специфического лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

П.В. Бутягин заведовал кафедрой с 1919 г. по 1931 г. В 1931 г. П.В. Бутягин был арестован органами НКВД и осужден без суда. В 1934 г., после того как он был восстановлен в гражданских правах, П.В. Бутягин перешел на работу в Новосибирский ГИДУВ, заведовал кафедрами микробиологии в Новосибирском ГИДУВе и Новосибирском медицинском институте.

С именем П.В. Бутягина связаны становление и развитие микробиологии в Сибири. Под его руководством начинали свою деятельность такие известные микробиологи, как заслуженный деятель науки РСФСР, профессор В.А. Крестовников, заслуженный деятель науки РСФСР В.В. Сукнев, президент академии медицинских наук академик В.Д. Тимаков, академики А.А. Смородинцев и С.П. Карпов.

После П.В. Бутягина кафедру микробиологии возглавил Иван Родионович Ломакин (1883–1937). Годы его заведования кафедрой – 1931–1937. В этот период сотрудники кафедры изучали вопросы лабораторной диагностики брюшного тифа, серотерапии бешенства, фаготерапии и фагопрофилактики инфекционных заболеваний. По ложному обвинению И.Р. Ломакин был арестован и в 1937 г. расстрелян. Реабилитирован посмертно.



С.П. Карпов

С 1937 по 1976 гг. кафедрой микробиологии заведовал доктор медицинских наук, профессор, академик АМН СССР, заслуженный деятель науки РСФСР Сергей Петрович Карпов (1903–1976). Под руководством С.П. Карпова на кафедре был создан музей живых культур, разработаны учебные пособия, организован студенческий научный кружок, в котором начали свой путь в науку многие научные работники и преподаватели.

Особо нужно выделить вклад сотрудников кафедры в практику здравоохранения в годы Великой Отечественной войны, когда осуществлялась методическая и эпидемиологическая работа по предупреждению инфекционных заболеваний и ликвидации эпидемических вспышек на территории Западной Сибири, выполнялись исследования по влиянию биологических антисептиков на микроорганизмы.

Значительное место в научной деятельности кафедры занимали в те годы вопросы микробиологии, эпидемиологии, лечения и профилактики природно-очаговых заболеваний. С.П. Карпов является основоположником изучения природно-очаговых заболеваний на территории Западной Сибири. Научные интересы сотрудников кафедры были тесно связаны с тематикой Томского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии МЗ РСФСР (в дальнейшем переименованного в научно-исследовательский институт вакцин и сывороток МЗ СССР). С 1955 г. и до конца жизни С.П. Карпов работал в этом институте, руководил разработкой различных иммунобиологических препаратов для лечения, профилактики и диагностики инфекционных заболеваний.

Спектр научных исследований, которые проводили сотрудники кафедры в эти годы, был очень широк. Это и токсинообразование у бактерий, бактериофагия и биологические антисептики, вопросы эпидемиологии, специфической профилактики и микробиологической диагностики инфекционных заболеваний, иммунобиологическая реактивность организма, вирусная аллергия.

С.П. Карпов уделял большое внимание подготовке научных кадров. Он создал школу сибирских микробиологов, вирусологов, иммунологов. Под его руководством выполнены 13 докторских и около 100 кандидатских диссертаций. Учениками С.П. Карпова являются академик АМН СССР Н.В. Васильев, профессора З.М. Землякова,

О.В. Васильева, В.Д. Подоплекин, Т.С. Федорова, Ю.В. Федоров, Е.П. Красноженов, доценты Ю.Н. Одинцов, к.м.н. Л.А. Косицина. Много готовилось научных кадров и для других вузов Сибири, в частности, кафедр микробиологии медицинских институтов Барнаула, Благовещенска, Иркутска, Кемерово, Красноярска, Омска.



Н.В. Васильев

После смерти С.П. Карпова кафедрой микробиологии возглавил академик АМН СССР Николай Владимирович Васильев (1930–2001 гг.). Годы его заведования кафедрой – 1976–1987. За эти годы сотрудниками кафедры опубликованы 26 монографий, 11 сборников трудов, 7 методических рекомендаций и указаний, более 800 научных статей. Под руководством Н.В. Васильева выполнены 14 докторских и более 100 кандидатских диссертаций.

Н.В. Васильев был блестящим организатором науки, умел сплотить вокруг себя разных специалистов для решения одной научной проблемы. В широкий круг научных интересов Н.В. Васильева входили следующие направления: регуляция иммунитета, онкоэпидемиология, иммунология экстремальных состояний, экологические и биомедицинские последствия природных и техногенных катастроф. Им были опровергнуты представления об антагонизме между естественным и приобретенным иммунитетом, описаны два варианта влияния иммунизации на факторы резистентности. Н.В. Васильев впервые оценил состояние иммунитета на различных этапах злокачественного роста в эксперименте и клинике и опроверг предположение о развитии первичной тотальной иммунодепрессии при прогрессировании опухолевого роста.

В 1987 г. Н.В. Васильев создал и возглавил кафедру клинической иммунологии и аллергологии и руководил ею до 1992 г.



Ю.В. Федоров

С 1987 по 1998 гг. кафедрой микробиологии заведовал доктор медицинских наук, член-корреспондент СО Академии наук высшей школы и Международной академии информатизации Юрий Васильевич Федоров (1930–1998 гг.).

В этот период под руководством Ю.В. Федорова защищены 2 докторских и 7 кандидатских диссертаций, выпущены 3 руководства и 2 методических пособия к практическим занятиям для студентов по общей и частной микробиологии и по иммунобиологическим препаратам. Ю.В. Федоров большую часть своей научной жизни посвятил Томскому научно-исследовательскому институту вакцин и сывороток, где занимал последовательно должности заведующего лабораторией, отделения, отдела, заместителя директора по научной работе и научного консультанта. На базе НИИ вакцин и сывороток в 1990 г. Ю.В. Федоров создал новый курс основ медицинской биотехнологии для студентов медико-биологического факультета СГМУ.

В 1998 г. заведующим кафедрой микробиологии избран профессор Евгений Павлович Красноженов. В это время были развернуты серии научных работ по исследованию участия тучных клеток в процессах инфекции и иммунитета, изучению состояния колонизационной резистентности слизистых оболочек и кожи при различных патологических процессах. В 2000 г. под руководством Е.П. Красноженова на кафедре были организованы курсы по переподготовке врачей-бактериологов. Евгений Павлович является главным бактериологом ДЗ Томской области. В 2002 г. организовал и возглавил Томское Общество бактериологов. Под руководством Е.П. Красноженова защищены 8 диссертаций, выигран 1 грант федерального значения, опубликовано свыше 100 статей в центральных рецензируемых журналах, получены 6 патентов.

На кафедре изучают микробиологию студенты лечебного, педиатрического, медико-биологического и фармацевтического факультетов. Для студентов, интересующихся микробиологией, работает кружок. Ежегодно проводятся Олимпиады по микробиологии для студентов различных факультетов и межвузовская Олимпиада по микробиологии и биотехнологии.

В 2014 г. заведующей кафедрой стала профессор Мария Ростиславовна Карпова.

# **ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ СТУДЕНТОВ В УЧЕБНОЙ ЛАБОРАТОРИИ КАФЕДРЫ МИКРОБИОЛОГИИ**

1. К практической работе в учебной лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж и знакомые с правилами техники безопасности. Учет прохождения студентами инструктажа по технике безопасности ведется в «Журнале учета академической успеваемости».
2. Вход студентов на кафедру микробиологии возможен только в халате, шапочке и второй обуви (бахилах). Верхнюю одежду обязательно сдавать в гардероб.
3. Каждый студент должен работать на закрепленном за ним месте. Переход на другое рабочее место без разрешения преподавателя не допускается.
4. Рабочее место следует содержать в чистоте, не загромождать посторонними предметами. По окончании работы следует убрать все красители, реактивы, посуду, микробные культуры, препараты. Использованные микробные культуры и предметы, загрязненные микроорганизмами, студенты должны отнести в «Автоклавную» для дальнейшего обезвреживания.
5. Запрещаются посещение студентов, работающих в учебной лаборатории, посторонними лицами, а также отвлечение студентов посторонними делами и разговорами.
6. Во время работы в лаборатории, а также проведения семинарского или зачетного занятия рекомендуется выключить сотовые телефоны.
7. Студентам запрещается работать в лаборатории без преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.
8. Запрещается выполнять в лаборатории экспериментальные работы, не связанные с выполнением учебного практикума.
9. К выполнению работы студент может приступить только после разрешения преподавателя.
10. Приступая к работе необходимо:
  - а) уяснить методику работы;
  - б) подготовить рабочее место к работе;

- в) проверить соответствие взятых реактивов, сред и культур тем, которые указаны в описании работы.
11. По окончании работы необходимо:
    - а) убрать реактивы, посуду, приборы.
    - б) унести грязную посуду, использованные культуры в «Автоклавную»;
    - в) убрать рабочее место;
    - г) выключить воду, электричество.
  12. Полученный при опыте материал, посеvy следует хранить в соответствующей посуде с этикетками или ясными надписями.
  13. Пролитую на пол или стол культуру или кислоту студенты обезвреживают под руководством преподавателя или лаборанта в соответствии с установленными правилами.
  14. Перед зажиганием спиртовки нужно удостовериться, что корпус ее исправен, фитиль выпущен на нужную высоту, а горловина и держатель фитиля сухие. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя (иначе возможны вспышка паров внутри спиртовки и взрыв).
  15. Зажженную спиртовку нельзя переносить с места на место, нельзя зажигать одну спиртовку от другой.
  16. Гасить спиртовку нужно накрывая пламя фитиля колпачком. Задудавать пламя запрещается.
  17. В рабочих помещениях запрещается:
    - а) хранить личную одежду;
    - б) убирать случайно пролитые опасные жидкости при зажженных спиртовках (в случае пролива огнеопасной жидкости спиртовки нужно немедленно погасить);
    - в) уходить с рабочего места и оставлять без присмотра зажженные спиртовки (перед уходом даже на короткое время спиртовка должна быть погашена).

# **РАЗДЕЛ 1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

## **ЗАНЯТИЕ № 1. История развития микробиологической службы. Микробиологическая лаборатория. Классификация микроорганизмов. Морфология бактерий**

**Цель занятия:** изучить принципы современной классификации прокариот, морфологию бактерий (размер, форму, взаимное расположение). Освоить технику иммерсионной микроскопии, технику приготовления микробиологических препаратов и их окраску простым методом.

### **План занятия**

1. Вводное слово преподавателя о структуре учебного курса и взаимосвязи с другими медико-биологическими дисциплинами.
2. Знакомство с историей кафедры микробиологии и вирусологии СибГМУ.
3. Знакомство студентов с основными реактивами, инструментами и аппаратурой, используемыми при выполнении самостоятельных работ на кафедре.
4. Изучение правил техники безопасности при выполнении микробиологических исследований.
5. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок**

#### **Принципы организации и оборудования микробиологической лаборатории**

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

робиологическая лаборатория общего назначения должна иметь следующие комнаты:

- 1) лабораторные комнаты;
- 2) автоклавную комнату;
- 3) средоварочную комнату;
- 4) бактериологическую комнату с боксами;
- 5) моечную комнату;
- 6) виварий;
- 7) подсобные помещения (душ, склад, гардероб, туалет).

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

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

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

Виварий предназначен для проведения исследований на животных. Необходимо иметь два помещения вивария – одно для содержа-

ния чистых животных и второе для лабораторных животных, с которыми проводятся исследования. Вход в виварий должен быть ограничен специально отобранным персоналом. Клетки, кормушки для животных должны быть изготовлены из материала, устойчивого к дезинфицирующим растворам.

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

Средоварочная комната располагается рядом с моечной и стерилизационной комнатами и предназначена для приготовления и разлива питательных сред. Комната оборудуется газовой или электрической плитой, раковиной с подведенной холодной и горячей водой. В ней необходимо иметь дистиллятор, холодильник для хранения питательных сред и биологических компонентов, бокс для приготовления и разлива питательных сред и растворов в стерильных условиях, шкафы для хранения сухих питательных сред, лабораторной посуды и химических реактивов.

### **Классификация микроорганизмов, вызывающих заболевания у человека**

В 1923 г. американское общество бактериологов издало первый международный «Определитель бактерий» под редакцией Д. Берджи (David Henricks Bergey). В дальнейшем был создан международный коллектив из лучших специалистов по той или иной группе микроорганизмов, который продолжал обобщать знания по структуре, функциям микроорганизмов и их систематике.

В настоящее время сведения по систематике и идентификации бактерий публикуются отдельно: в виде определителя бактерий и классификации бактерий. Определитель является справочным материалом для работников практических лабораторий и используется для идентификации бактерий по характерным для них фенотипическим признакам (окраска по Граму, форма и размер клетки, химический состав клеточной стенки, подвижность, наличие капсулы, спор, тип дыхания, биохимическая активность и др.). Определитель отражает первое направление в систематизации микроорганизмов – их каталогизация на основе ограниченного числа признаков.

Определитель бактерий Берджи делит царство прокариот на четыре отдела и 35 групп:

1. Gracilicutes – тонкостенные, грамотрицательные (1–16 группы).
2. Firmicutes – толстостенные, грамположительные (бактерии – 17–21 группы и актиномицеты – 22–29 группы).
3. Tenericutes – лишённые клеточной стенки (30-ая группа).
4. Mendosicutes – археобактерии, их клеточные стенки лишены пептидогликана, они имеют особенности строения рибосом, мембраны и РНК (31–35 группы).

Классификатор Берджи соответствует второму направлению в систематизации микроорганизмов – построению системы их филогенетического родства. При подготовке классификации используются стандартные признаки.

#### **Фенотипические признаки:**

- 1) морфологические признаки (размеры, форма, наличие жгутиков, капсул, спор и др.);
- 2) дифференциальные окраски (Грама, Циля-Нильсена, Нейссера, Бурри-Гинса и т.д.);
- 3) культуральные и биохимические свойства;
- 4) антигенная структура;
- 5) фаготипирование.

#### **Генотипические признаки:**

- 1) соотношение G+C;
- 2) последовательность оснований в ДНК;
- 3) степень генетического родства с другими микроорганизмами;
- 4) степень гомологии.

#### **Филогенетические признаки:**

- 1) секвенирование 16S и 23S рибосомальной РНК;
- 2) анализ рРНК-нуклеотидных последовательностей;
- 3) РНК-РНК гибридизация;
- 4) полиморфизм длины фрагментов рестрикции ДНК.

На основе комплекса фенотипических, генотипических и филогенетических признаков микроорганизмы подразделены на доклеточные формы (вирусы, царство или *Regnum Vira*) и клеточные формы, которые включают три домена:

1 домен «Archaea» – предковые прокариоты или предковые бактерии (патогенных для человека видов нет);

2 домен «Bacteria» – истинные прокариоты или истинные бактерии;

3 домен «Eukarya» – эукариотические клетки (*Regnum Fungi* и *Regnum Protista*). Среди микроорганизмов, входящих в состав 2 и 3 доменов, есть патогенные для человека виды. Домены делятся на фи-

лии (или типы), которые в свою очередь делятся на классы и т.д. Так, в домен «Bacteria» входят 23 филлии, среди которых 6 имеют медицинское значение.

Классификация Берджи касается только доменов 1 и 2. Остальные микроорганизмы (вирусы, грибки, простейшие) сведены в самостоятельные классификации.

В классификации Берджи используются следующие группы или уровни (таксоны):

**царство** – Regnum (лат.);

**домен** – Domen (лат.);

**филум** – Phylum (лат.); в классификации прокариотов для обозначения этого таксона используется термин «**филум**», а для эукариотов – «**тип**»;

**класс** – Class (лат.);

**порядок** – Ordo (лат.);

**семейство** – Familia (лат.);

**род** – Genus (лат.);

**вид** – Species (лат.).

Кроме этих таксонов широко используются и другие термины:

**штамм** – популяция бактерий одного вида, выделенных из какого-либо определенного источника;

**клон** – популяция бактерий, полученная из одной бактериальной клетки;

**подвид, инфравид** – популяция бактерий, отличающихся от основного вида по какому-либо признаку или признакам, которые могут быть детализированы как варианты (**-вары**, но не **типы**), для их обозначения используется только суффикс «**-вар**», чтобы избежать возможной ошибки – принять «вариант» за «тип», как таксон эукариотов;

**морфовары** – популяция бактерий, отличающихся от основного вида по морфологическим свойствам;

**хемовары** – по биохимическим свойствам;

**серовары** – по антигенной структуре;

**фаговары** – по чувствительности к бактериофагам;

**колициновары** – по продукции бактериоцинов;

**резистенсвары** – по устойчивости к антибиотикам;

**геновары** – по строению части генома;

**патовары** – по вирулентности;

**биовары** – по нескольким биологическим свойствам.

Ниже приводится сокращенная таксономическая схема бактерий, имеющих медицинское значение (табл. 1).

Таблица 1

**Таксономическая схема бактерий**  
(представители, имеющие медицинское значение) **Domain Bacteria**

| Phylum                                | Class                                    | Order                                 | Family                             | Genus                       |
|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Phylum BXII.</b><br>Proteobacteria | <b>Class I.</b><br>Alpha-proteobacteria  | <b>Order II.</b><br>Rickettsiales     | <b>Family I.</b> Rickettsiaceae    | Genus I. Rickettsia         |
|                                       |                                          |                                       |                                    | Genus II. Orientia          |
|                                       |                                          |                                       | <b>Family II.</b> Ehrlichiaceae    | Genus I. Ehrlichia          |
|                                       |                                          |                                       |                                    | Genus III. Anaplasma        |
|                                       |                                          | <b>Order VI.</b><br>Rhizobiales       | <b>Family II.</b> Bartonellaceae   | Genus I. Bartonella         |
|                                       |                                          |                                       | <b>Family III.</b> Brucellaceae    | Genus I. Brucella           |
|                                       | <b>Class II.</b><br>Betaproteobacteria   | <b>Order I.</b><br>Burkholderiales    | <b>Family I.</b> Burkholderiaceae  | Genus I. Burkholderia       |
|                                       |                                          |                                       | <b>Family IV.</b> Alcaligenaceae   | Genus III. Bordetella       |
|                                       |                                          | <b>Order IV.</b><br>Neisseriales      | <b>Family I.</b> Neisseriaceae     | Genus I. Neisseria          |
|                                       |                                          | <b>Order V.</b> Nitrosomonadales      | <b>Family II.</b> Spirillaceae     | Genus I. Spirillum          |
|                                       | <b>Class III.</b><br>Gammaproteobacteria | <b>Order II.</b> Xanthomonadales      | <b>Family I.</b> Xanthomonadaceae  | Genus I. Xanthomonas        |
|                                       |                                          |                                       |                                    | Genus VII. Stenotrophomonas |
|                                       |                                          | <b>Order IV.</b><br>Thiotrichales     | <b>Family III.</b> Francisellaceae | Genus I. Francisella        |
|                                       |                                          | <b>Order V.</b> Legionellales         | <b>Family I.</b> Legionellaceae    | Genus I. Legionella         |
|                                       |                                          |                                       | <b>Family II.</b> Coxiellaceae     | Genus I. Coxiella           |
|                                       |                                          | <b>Order VIII.</b><br>Pseudomonadales | <b>Family I.</b> Pseudomonadaceae  | Genus I. Pseudomonas        |
|                                       |                                          |                                       | <b>Family II.</b> Moraxellaceae    | Genus I. Moraxella          |
|                                       |                                          |                                       |                                    | Genus II. Acinetobacter     |

| Phylum | Class                                     | Order                                  | Family                                 | Genus                   |
|--------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
|        |                                           | <b>Order X.</b><br>Vibrionales         | <b>Family I.</b><br>Vibrionaceae       | Genus I. Vibrio         |
|        |                                           | <b>Order XII.</b><br>Enterobacteriales | <b>Family I.</b> Enterobacteriaceae    | Genus I. Escherichia    |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus X. Citrobacter    |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XI. Edwardsiella  |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XII. Enterobacter |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XIII. Erwinia     |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XV Hafnia         |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XVI. Klebsiella   |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXI. Morganella   |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXVIII. Proteus   |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXIX. Providencia |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXXII. Salmonella |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXXIII. Serratia  |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XXXIV. Shigella   |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus XL. Yersinia      |
|        |                                           | <b>Order XIII.</b><br>Pasteurellales   | <b>Family I.</b><br>Pasteurellaceae    | Genus I. Pasteurella    |
|        |                                           |                                        |                                        | Genus III. Haemophilus  |
|        | <b>Class V.</b><br>Epsilon-proteobacteria | <b>Order I.</b> Campylobacterales      | <b>Family I.</b><br>Campylobacteraceae | Genus I. Campylobacter  |

| Phylum                                | Class                                                                    | Order                                                                | Family                                   | Genus                       |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family II.</b> Helicobacteraceae      | Genus I. Helicobacter       |
| <b>Phylum BXIII.</b><br>Firmicutes    | <b>Class I.</b><br>Clostridia                                            | <b>Order I.</b> Clostridiales                                        | <b>Family I.</b> Clostridiaceae          | Genus I. Clostridium        |
|                                       |                                                                          |                                                                      |                                          | Genus VIII. Sarcina         |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family III.</b> Peptostreptococcaceae | Genus I. Peptostreptococcus |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family V.</b> Peptococcaceae          | Genus I. Peptococcus        |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family VII.</b> Acidaminococcaceae    | Genus XIII. Veillonella     |
|                                       | <b>Class II.</b><br>Mollicutes                                           | <b>Order I.</b> Mycoplasmatales                                      | <b>Family I.</b> Mycoplasmataceae        | Genus I. Mycoplasma         |
|                                       |                                                                          |                                                                      |                                          | Genus IV. Ureaplasma        |
|                                       | <b>Class III.</b><br>Bacilli                                             | <b>Order I.</b> Bacillales                                           | <b>Family I.</b> Bacillaceae             | Genus I. Bacillus           |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family IV.</b> Listeriaceae           | Genus I. Listeria           |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family V.</b> Staphylococcaceae       | Genus I. Staphylococcus     |
|                                       |                                                                          | <b>Order II.</b> Lactobacillales                                     | <b>Family IV.</b> Enterococcaceae        | Genus I. Enterococcus       |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family VI.</b> Streptococcaceae       | Genus I. Streptococcus      |
|                                       |                                                                          |                                                                      |                                          |                             |
| <b>Phylum BXIV.</b><br>Actinobacteria | <b>Class I.</b><br>Actinobacteria<br><b>Subclass V.</b> Actinobacteridae | <b>Order I.</b> Actinomycetales<br><b>Suborder I.</b> Actinomycineae | <b>Family I.</b> Actinomycetaceae        | Genus I. Actinomyces        |
|                                       |                                                                          |                                                                      |                                          | Genus IV. Mobiluncus        |
|                                       |                                                                          | <b>Suborder VI.</b> Micrococcineae                                   | <b>Family I.</b> Micrococcaceae          | Genus I. Micrococcus        |
|                                       |                                                                          | <b>Suborder VII.</b> Corynebacterineae                               | <b>Family I.</b> Corynebacteriaceae      | Genus I. Corynebacterium    |
|                                       |                                                                          |                                                                      | <b>Family IV.</b> Mycobacteriaceae       | Genus I. Mycobacterium      |

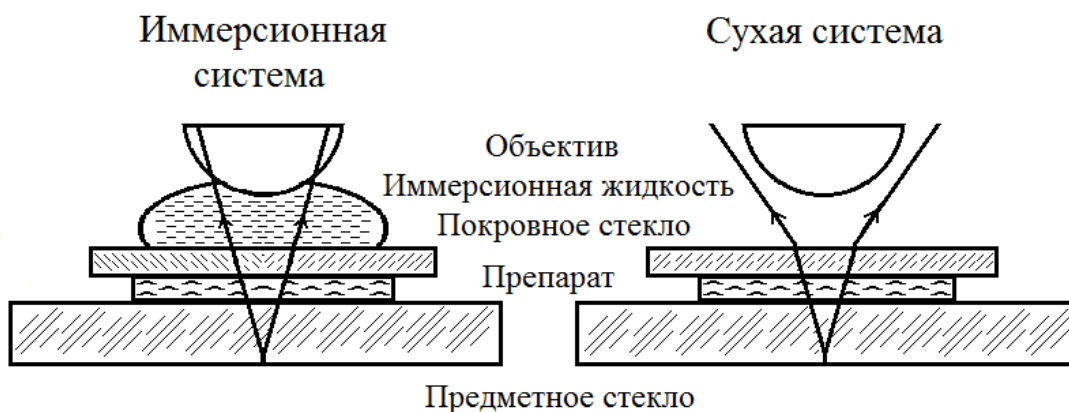
| Phylum                            | Class                        | Order                          | Family                              | Genus                    |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
|                                   |                              |                                | <b>Family V.</b> Nocardiaceae       | Genus I. Nocardia        |
|                                   |                              |                                | <b>Suborder XI.</b> Streptomycineae | Genus I. Streptomyces    |
|                                   |                              |                                | <b>Order II.</b> Bifidobacteriales  | Genus I. Bifidobacterium |
|                                   |                              |                                |                                     | Genus III. Gardnerella   |
| <b>Phylum BXVI</b> Chlamydiae     | <b>Class I.</b> Chlamydiae   | <b>Order I.</b> Chlamydiales   | <b>Family I.</b> Chlamydiaceae      | Genus I. Chlamydia       |
|                                   |                              |                                |                                     | Genus II. Chlamydophila  |
| <b>Phylum BXVII.</b> Spirochaetes | <b>Class I.</b> Spirochaetes | <b>Order I.</b> Spirochaetales | <b>Family I.</b> Spirochaetaceae    | Genus I. Spirochaeta     |
|                                   |                              |                                |                                     | Genus II. Borrelia       |
|                                   |                              |                                |                                     | Genus IX. Treponema      |
|                                   |                              |                                | <b>Family III.</b> Leptospiraceae   | Genus II. Leptospira     |
| <b>Phylum BXX.</b> Bacteroidetes  | <b>Class I.</b> Bacteroides  | <b>Order I.</b> Bacteroidales  | <b>Family I.</b> Bacteroidaceae     | Genus I. Bacteroides     |
|                                   |                              |                                | <b>Family IV.</b> Prevotellaceae    | Genus I. Prevotella      |

## Световая и иммерсионная микроскопия

Световая микроскопия осуществляется с помощью обычного светового микроскопа, основной частью которого является объектив. На оправе объективов обозначается увеличение: 8, 10, 20, 40, 90. При исследовании микробов применяются объектив с увеличением x90 и иммерсионная система.

Иммерсионная система (от лат. *immersio* – погружение) – оптическая система, в которой пространство между предметом и фронтальной линзой заполнено иммерсионной жидкостью (рис. 1). В качестве иммерсионных жидкостей применяют кедровое или минеральное масло (показатель преломления 1,515), водный раствор глицерина (1,434), воду (1,333), вазелиновое масло (1,503) и др. Оптические характеристики иммерсионной жидкости (показатель преломления и дисперсия) входят в расчет иммерсионной системы, поэтому иммерсионную систему можно применять только с той жидкостью, на ко-

торую система рассчитана. В противном случае резко ухудшится качество изображения. Включение объектива в состав иммерсионной системы дает возможность повысить его апертуру (от лат. *apertura* – отверстие, действующее отверстие оптической системы, определяемое размерами линз, зеркал или диафрагмами), а следовательно, и разрешающую способность микроскопа. При использовании иммерсионной системы уменьшается рассеяние света и тем самым увеличивается контраст изображения. Это особенно важно при исследовании слабо отражающих объектов.



**Рис. 1.** Схема иммерсионной системы микроскопа

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. История развития микробиологической службы в России и Сибири.
2. История кафедры микробиологии Сибирского медицинского университета.
3. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.
4. Техника иммерсионной микроскопии.
5. Классификация микробов. Основные таксономические единицы. Понятие о виде, варианте, штамме и клоне.
6. Морфология бактерий.

### **Практический блок**

1. Изучение наиболее употребительных красителей и способов приготовления красящих растворов. Генцианвиолет, фуксин, метиленовая синька.
2. Освоение методики приготовления бактериального мазка.
3. Освоение методов простой окраски мазка.

4. Приготовление, окраска и микроскопия мазков из культур различных бактерий (стафилококки, ложносибиреязвенные бациллы, кишечные палочки).
5. Изучение техники иммерсионной микроскопии.

### **Приготовление окрашенного препарата из микроорганизмов**

Морфологические свойства микроорганизмов чаще всего изучают в окрашенных препаратах. В нативном (естественном) состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, поэтому они невидимы при световой микроскопии. Окрашивание бактерий производится как для обнаружения их в исследуемом материале при бактериоскопической диагностике, так и для их идентификации после выделения чистой культуры из исследуемого материала при бактериологическом исследовании.

**Приготовление окрашенного препарата** состоит из следующих этапов: приготовление мазка, его высушивание, фиксация и окраска. Для приготовления мазка на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды и с помощью бактериальной петли помещают в нее исследуемый материал. Материал равномерно распределяют на стекле таким образом, чтобы образовался тонкий мазок круглой или овальной формы размером 1–2 см<sup>2</sup>. Затем препарат высушивают либо при комнатной температуре на воздухе, либо в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки.

Высушенный мазок подвергают фиксации, вследствие чего он прикрепляется к стеклу (фиксируется), микробы инактивируются и становятся безопасными, возрастает их восприимчивость к окраске. Применяют различные способы фиксации. Наиболее простым и самым распространенным способом является фиксация жаром – нагреванием на пламени горелки (препарат несколько раз проводят через наиболее горячую часть пламени горелки).

После фиксации производят окраску мазка. Наиболее пригодными для окраски микробов являются основные и нейтральные анилиновые красители. Окрашенный препарат промывают водой и высушивают. На высушенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.

Существуют простые и сложные способы окрашивания микробов. При простой окраске, которая позволяет быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов, обычно используют толь-

ко один краситель, чаще всего красного цвета – фуксин (окраска производится в течение 1–2 минут), синего цвета – метиленовый синий (время обработки мазка краской – 3–5 минут) или фиолетового цвета – генцианвиолет (1–2 минуты). При сложных методах окраски применяют два или более контрастных красителя, протравы, дифференцирующие вещества и др.

### Протокол практической работы студентов

#### Простые методы окраски

| Вид микроорганизма        | Метод окраски          | Рисунок |
|---------------------------|------------------------|---------|
| <i>S. epidermidis</i>     | Генциановый фиолетовый |         |
| <i>E. coli</i>            | Водный фуксин          |         |
| <i>B. pseudoanthracis</i> | Генциановый фиолетовый |         |

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. СЕМЕЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ ПОДРАЗДЕЛЯЮТСЯ НА СЛЕДУЮЩИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ЕДИНИЦЫ

- 1) виды
- 2) роды
- 3) классы
- 4) порядки

2. ПЕРВОЕ СЛОВО В БИНАРНОМ НАИМЕНОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ЭТО НАЗВАНИЕ

- 1) вида
- 2) рода
- 3) семейства
- 4) класса

3. ВАРИАНТ БАКТЕРИЙ, ОТЛИЧАЮЩИЙСЯ ОТ ТИПОВОГО ВИДА ПО АНТИГЕННЫМ СВОЙСТВАМ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) биоваром
- 2) фаговаром
- 3) сероваром
- 4) морфоваром

4. ПОПУЛЯЦИЯ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННАЯ ИЗ ОДНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) биоваром
  - 2) штаммом
  - 3) клоном
  - 4) морфоваром
5. ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ К КОККАМ ОТНОСЯТСЯ
- 1) клостридии
  - 2) бациллы
  - 3) сарцины
  - 4) боррелии
6. СПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, РАЗМЕР СПОРЫ КОТОРЫХ ПРЕВЫШАЕТ ДИАМЕТР КЛЕТКИ, НАЗЫВАЮТСЯ
- 1) бациллами
  - 2) клостридиями
  - 3) сарцинами
  - 4) боррелиями
7. К СПИРОХЕТАМ ОТНОСЯТСЯ
- 1) вибрионы
  - 2) кампилобактерии
  - 3) сарцины
  - 4) боррелии
8. ПРИЗНАКАМИ МАРКИРОВКИ ИММЕРСИОННОГО ОБЪЕКТИВА ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) кольцо
  - 2) x8
  - 3) буквы МИ
  - 4) x90
9. ДЛЯ ФИКСАЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МАЗКА ИСПОЛЬЗУЕТСЯ
- 1) ацетон
  - 2) нагревание на пламени горелки
  - 3) спирт
  - 4) серная кислота

10. КРАСИТЕЛЬ, ОКРАШИВАЮЩИЙ МИКРООРГАНИЗМЫ В КРАСНЫЙ ЦВЕТ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) метиленовым синим
- 2) фуксином
- 3) генцианвиолетом
- 4) везувином

**Ситуационные задачи**

**Задача 1.** При микроскопии мазка в поле зрения видны мелкие шаровидные микроорганизмы, расположенные цепочками различной длины.

1. Назвать морфологическую форму этих микроорганизмов.
2. Объяснить такое расположение микроорганизмов.
3. Перечислить другие виды шаровидных бактерий.

**Задача 2.** Студент получил задание изучить морфологию бактерий в окрашенном мазке. Для этого он поместил препарат на предметный столик микроскопа, центрировал объектив с увеличением  $\times 40$ . Осветил поле зрения, нашел изображение, установил четкость изображения микрометрическим винтом и на основании просмотра ряда полей зрения сделал вывод о том, что очень трудно рассмотреть микроорганизмы в препарате.

1. Назвать причину, по которой студенту не удалось детально рассмотреть форму микроорганизмов в препарате.
2. Перечислить рекомендации студенту, выполняющему данное задание.
3. Назвать цель изучения морфологии бактерий.

**Задача 3.** В учебной лаборатории при выполнении работы студент разлил на столе питательную среду с исследуемым микроорганизмом.

1. Перечислить мероприятия, которые должен сделать студент, допустивший эту оплошность.
2. Назвать основные правила поведения студентов при работе с микробными культурами в учебной лаборатории.

**Задача 4.** Студент получил задание приготовить мазок из культуры микроорганизма, окрасить его простым методом и промикроскопировать. Для этого он бактериальной петлей в стерильных условиях набрал культуру микроорганизма, поместил ее в каплю воды на предметное стекло, приготовил мазок, поместил на него каплю красителя, смыл через 2 минуты, высушил мазок и промикроскопировал его в иммерсионной системе при увеличении микроскопа  $\times 90$ . Ни в одном поле зрения студент не увидел микроорганизмов.

- 1. Назвать ошибку, которую он допустил.*
- 2. Перечислить рекомендации студенту, выполняющему данное задание.*
- 3. Назвать основную цель изучения морфологии бактерий.*

**Задача 5.** Студент получил задание изучить морфологию бактерий в окрашенных мазках, используя иммерсионную систему светового микроскопа. Для этого на препарат он нанес каплю иммерсионного масла, центрировал объектив  $\times 90$ , опустил тубус микроскопа до погружения фронтальной линзы объектива в масло, поднимая и опуская объектив, пытался найти изображение, но рассмотреть препарат ему не удалось.

- 1. Перечислить ошибки, которые допустил студент, выполняя задание.*
- 2. Перечислить преимущества изучения морфологии бактерий с использованием иммерсионной системы микроскопа.*

## **ЗАНЯТИЕ № 2. Структура бактериальной клетки. Сложные методы окраски бактерий**

**Цель занятия:** определить основные отличия прокариотических и эукариотических клеток, изучить ультраструктуру бактериальной клетки, строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, освоить сложные методы окраски.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение основных отличий прокариотических и эукариотических клеток.
3. Изучение структуры бактериальной клетки. Определение постоянных и непостоянных компонентов бактерий.
4. Изучение строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.
5. Определение форм бактерий, лишенных клеточной стенки. Знакомство с понятиями: сферопласты, протопласты, L-формы.
6. Изучение метода и принципа окраски по Граму.
7. Изучение особенностей строения клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий, принцип их выявления.
8. Изучение включений бактерий, их функции и принцип выявления.
9. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок Отличия прокариот от эукариот**

| Признак                                                           | Прокариоты            | Эукариоты         |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Оформленное ядро                                                  | —                     | +                 |
| Размеры клеток                                                    | 0,2–2,0 мкм           | >2,0 мкм          |
| Наличие митохондрий, хлоропластов, аппарата Гольджи, лизосом, ЭПР | —                     | +                 |
| Локализация рибосом                                               | Рассеяны в цитоплазме | Прикреплены к ЭПР |
| Константа седиментации рибосом                                    | 70 S                  | 80 S              |
| Структура жгутика                                                 | —                     | 9+2               |
| Митоз                                                             | —                     | +                 |
| Число хромосом                                                    | 1                     | Обычно >1         |
| Хромосома                                                         | Кольцевая             | Линейная          |

## Структура бактериальной клетки

Бактерии являются прокариотами, относятся к одноклеточным организмам и состоят из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида, рибосом, мезосом (обязательных компонентов бактериальной клетки). Некоторые бактерии могут иметь жгутики, капсулы, споры (необязательные компоненты бактериальной клетки).



**Рис. 2.** Строение бактериальной клетки

Клеточная стенка (КС) – внешняя структура бактерий, основным компонентом которой является пептидогликан (муреин). Пептидогликан включает в себя остов и два набора пептидных цепочек – боковых и поперечных. Остов состоит из чередующихся молекул N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидными связями.

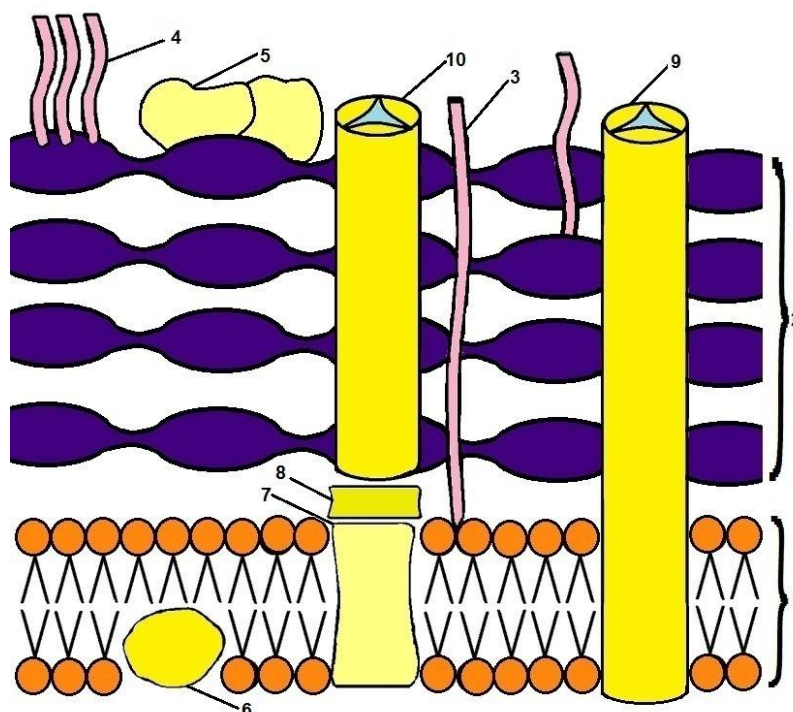
Боковые цепочки представлены набором идентичных тетрапептидов, поперечные – пентаглицинами.

Количественное содержание пептидогликана влияет на способность бактерий окрашиваться по Граму. Бактерии, имеющие значительную толщину муреинового слоя (90–95%), стойко окрашиваются генцианвиолетом в сине-фиолетовый цвет и носят название грамположительных бактерий. Грамотрицательные бактерии с тонким слоем пептидогликана (5–10%) в клеточной стенке

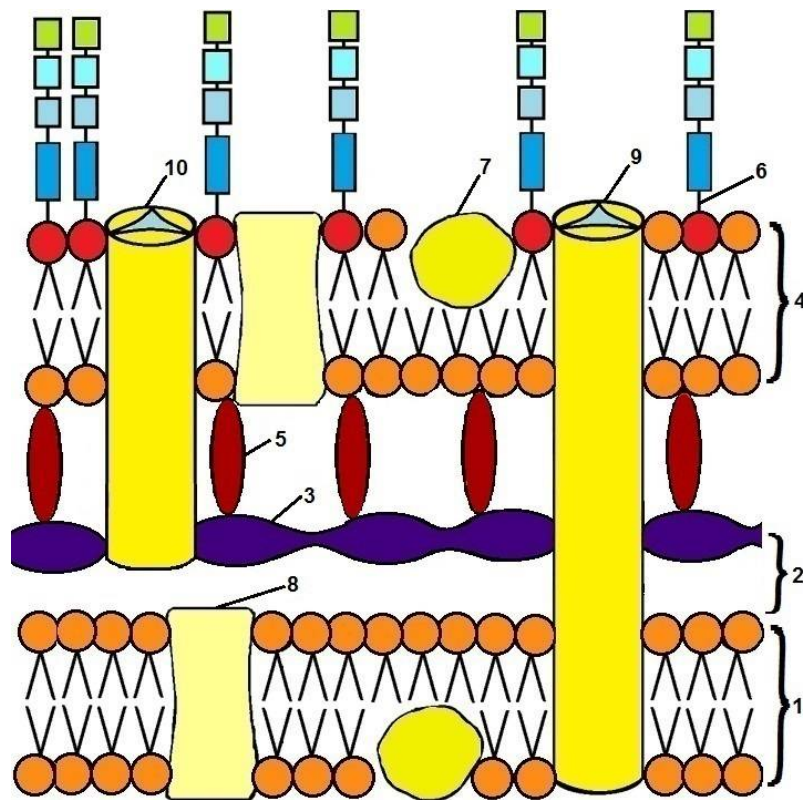
после действия спирта утрачивают генцианвиолет и дополнительно окрашиваются фуксином в розовый цвет. Клеточные стенки у грамположительных и грамотрицательных прокариот резко различаются как по химическому составу, так и по ультраструктуре (рис. 3 и 4).

Клеточная стенка у бактерий выполняет в основном формообразующую и защитную функции, обеспечивает ригидность, участвует в регуляции роста и деления клеток, формирует капсулу, определяет способность клеток к адсорбции фагов.

Для некоторых бактерий характерна усложненная структура клеточной стенки (микобактерии). Муреиновый каркас КС таких бактерий связан с полисахаридами и липидами. Липиды представлены миколовыми кислотами, которые придают клеточной поверхности гидрофобность. Гидрофобность, с одной стороны, делает клетку устойчивой к действию различных химических веществ (такие бактерии называются кислотоустойчивыми), с другой стороны, тормозит обмен клетки с окружающей средой и замедляет ее рост. Кислотоустойчивость микобактерий является важным диагностическим признаком, для ее определения пользуются окраской по методу Циля-Нильсена.



**Рис. 3.** Строение клеточной стенки грамположительных бактерий. 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – слой пептидогликана; 3 – липотейхоевые (мембранные) кислоты; 4 – тейхоевые (стеночные) кислоты; 5 – поверхностный белок; 6 – минорный белок; 7 – мажорный (интегральный) белок; 8 – вставочный белок; 9 – порин 1-го порядка; 10 – порин 3-го порядка



**Рис. 4.** Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – периплазматическое пространство; 3 – слой пептидогликана; 4 – наружная мембрана; 5 – липопротеин; 6 – липополисахарид; 7 – минорный белок; 8 – мажорный (интегральный) белок; 9 – порин 1-го порядка; 10 – порин 2-го порядка

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) отграничивает цитоплазму от КС. Это тонкая полупроницаемая структура толщиной 5–10 нм, состоящая из двойного слоя фосфолипидов, пронизанных белковыми молекулами.

ЦПМ является основным осмотическим барьером, участвует в регуляции процессов репликации хромосом и плазмид, процессах транспорта, синтезе компонентов КС, образовании мезосом.

Мезосомы – мембранные структуры, образуемые при закручивании ЦПМ. По расположению в клетке различают: мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования клеточной перегородки (септальные мезосомы), и мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков ЦПМ (латеральные мезосомы).

Мезосомы участвуют в энергетическом метаболизме, являются сайтом для формирования клеточной стенки бактерий и прикрепле-

ния нуклеоида в процессе репликации ДНК. Септальные мезосомы играют роль в построении поперечной перегородки при делении бактерий.

Цитоплазма. Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, составляет цитоплазму бактерий. Та часть цитоплазмы, которая имеет гомогенную коллоидную консистенцию и содержит растворимые РНК, ферменты, субстраты и продукты обмена веществ, обозначается как цитозоль. Другая часть цитоплазмы представлена различными структурными элементами: мезосомами, рибосомами, включениями, нуклеоидом, плазмидами.

Рибосомы – рибонуклеопротеидные гранулы диаметром 15–20 нм. В них находится 80–85% всей бактериальной РНК. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70 S и построены из двух частиц: 30 S (малая субъединица) и 50 S (большая субъединица). Рибосомы служат местом синтеза белка.

Включения. Некоторые бактерии способны накапливать фосфорную кислоту в виде гранул полифосфата (зерна волютина, метакроматические зерна, зерна Бабеша-Эрнста). Они играют роль фосфатных депо и регулярно выявляются у коринебактерий, микобактерий и спирилл в виде плотных образований, располагающихся в основном у полюсов клетки. Наличие зерен волютина у бактерий определяют методом Нейссера.

Нуклеоид – ядерный аппарат бактерий, представлен молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. Она циркулярно замкнута, не имеет отграничивающей от цитоплазмы мембраны.

В нуклеоиде бактерий содержится основная наследственная информация, которая реализуется в синтезе специфических белковых молекул. С ДНК бактериальной клетки связаны системы репликации, репарации, транскрипции и трансляции.

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Основные отличия прокариотических и эукариотических клеток.
2. Структура бактериальной клетки. Постоянные и непостоянные компоненты.
3. Строение клеточной стенки бактерий. Отличия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

4. Пептидогликан, тейхоевые кислоты, минорные и мажорные белки, липополисахарид. Биологические свойства и значение для бактериальной клетки.
5. Строение клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий. Метод и принцип выявления.
6. Принцип и метод окраски по Граму.
7. Строение цитоплазматической мембраны бактериальной клетки и ее функции.
8. Цитоплазма, генофор, мезосомы, рибосомы.
9. Включения бактерий и их выявление.

### **Практический блок**

1. Освоение методики приготовления сложного мазка.
2. Освоение метода окраски по Граму.
3. Освоение метода окраски по Цилю-Нильсену.
4. Освоение метода окраски по Нейссеру.

### **Методика окраски по Граму**

1. На мазок кладут фильтровальную бумагу, пропитанную карболовым раствором генцианового фиолетового, на 1–2 мин.
2. Снимают бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 мин.
3. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 96<sup>0</sup> спирте в течение 20 с.
4. Промывают водой.
5. Красят 1–2 мин водным раствором фуксина.
6. Промывают водой и высушивают.
7. Микроскопируют под иммерсионной системой.

В результате окраски грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный.

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

1. На фиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу, наливают карболовый фуксин Циля и осторожно нагревают на горелке до появления паров. Операцию повторяют 2–3 раза.
2. Когда препарат остынет, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают препарат водой.

3. Препарат погружают 2–3 раза в стакан с 5% серной кислотой на 1–2 с.
4. Тщательно промывают препарат водой и докрашивают щелочным метиленовым синим 3–5 мин.
5. Промывают водой и подсушивают.
6. Микроскопируют под иммерсионной системой.

Кислотоустойчивые бактерии не обесцвечиваются серной кислотой и сохраняют красный цвет, некислотоустойчивые – теряют краситель и докрашиваются метиленовым синим в голубой цвет.

### Методика окраски включений бактерий по Нейссеру

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синькой 4 мин, затем сливают краску.
2. Промывают водой и наливают раствор Люголя на 20–30 с.
3. Не промывая водой, окрашивают везувином 1–3 мин.
4. Промывают водой, высушивают.
5. Микроскопируют под иммерсионной системой.

Бактерии окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютина – в темно-синий, почти черный цвет.

### Протокол практической работы студентов

| Микроорганизм                                | Ход работы                                                                                                                              | Рисунок |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <i>S. epidermidis</i><br><i>E. coli</i>      | 1. Приготовление сложного мазка.<br>2. Окраска по методу Грама с целью выявления грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. |         |
| <i>S. epidermidis</i><br><i>M. smegmatis</i> | 1. Приготовление сложного мазка.<br>2. Окраска по методу Циля-Нильсена с целью выявления кислотоустойчивых бактерий.                    |         |
| <i>S. cerevisiae</i>                         | 1. Приготовление простого мазка.<br>2. Окраска по методу Нейссера с целью выявления включений.                                          |         |
| <i>C. diphtheriae</i>                        | 1. Микроскопия демонстрационного препарата чистой культуры, окрашенной по методу Нейссера с целью выявления зерен волютина.             |         |

## Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

### 1. К ПОСТОЯННЫМ КОМПОНЕНТАМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ ОТНОСИТСЯ

- 1) цитоплазматическая мембрана
- 2) капсула
- 3) спора
- 4) включения

### 2. В СОСТАВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ВХОДЯТ

- 1) белки и липополисахариды
- 2) липополисахариды и фосфолипиды
- 3) белки и фосфолипиды
- 4) белки и тейхоевые кислоты

### 3. РИБОСОМЫ ПРОКАРИОТ ИМЕЮТ КОНСТАНТУ СЕДИМЕНТАЦИИ

- 1) 70 S
- 2) 50 S
- 3) 30 S
- 4) 20 S

### 4. В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ РИБОСОМЫ РАСПОЛАГАЮТСЯ В

- 1) составе эндоплазматической сети
- 2) аппарате Гольджи
- 3) цитоплазме
- 4) цитоплазматической мембране

### 5. ОСНОВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ПЕПТИДОГЛИКАНА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота
- 2) N-ацетилглюкозамин и тейхоевые кислоты
- 3) N-ацетилмурамовая кислота и тейхоевые кислоты
- 4) N-ацетилглюкозамин и липополисахарид

6. ПО МЕТОДУ ГРАМА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ ОКРАШИВАЮТСЯ В

- 1) розовый цвет
- 2) малиновый цвет
- 3) рубиново-красный цвет
- 4) фиолетовый цвет

7. ПО МЕТОДУ ГРАМА ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ ОКРАШИВАЮТСЯ В

- 1) голубой цвет
- 2) синий цвет
- 3) фиолетовый цвет
- 4) розовый цвет

8. ОКРАСКА ПО МЕТОДУ НЕЙССЕРА ПРИМЕНЯЕТСЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ

- 1) включений
- 2) спор
- 3) кислотоустойчивых бактерий
- 4) капсулы

9. КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ ПО МЕТОДУ ЦИЛАНЬСЕНА ОКРАШИВАЮТСЯ В ЦВЕТ

- 1) фиолетовый
- 2) голубой
- 3) красный
- 4) синий

10. В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ СОДЕРЖАТСЯ В БОЛЬШОМ КОЛИЧЕСТВЕ

- 1) миколовые кислоты
- 2) тейхоевые кислоты
- 3) диаминопимелиновая кислота
- 4) белки

## Ситуационные задачи

**Задача 1.** У больного пневмонией в мокроте обнаружены грам-положительные кокки, располагающиеся скоплениями в виде «гроздьев винограда».

1. Назвать микроорганизм, который имеет такие морфологические и тинкториальные свойства.
2. Назвать цвет этого микроорганизма.
3. Перечислить этапы окраски микроорганизмов по Граму.

**Задача 2.** В окрашенных по Граму мазках из испражнений больного кишечной инфекцией обнаружены грамотрицательные палочки, расположенные хаотично.

1. Назвать морфологические и тинкториальные свойства выявленного микроба.
2. Назвать цвет обнаруженных палочек.
3. Перечислить разновидности этой формы микроорганизмов.

**Задача 3.** У больного с подозрением на дифтерию из отделяемого зева был приготовлен и окрашен мазок, при микроскопии которого были обнаружены светло-коричневые палочки с темно-синими утолщениями на концах.

1. Назвать структурный элемент микробной клетки, который был выявлен у палочек.
2. Назвать метод окраски данного мазка.
3. Перечислить основные этапы окраски по этому методу.

**Задача 4.** У больного гнойным уретритом при микроскопии отделяемого уретры обнаружены кокки, имеющие форму кофейных зерен, расположенные попарно, розового цвета в большом количестве.

1. Назвать тинкториальные свойства выявленных бактерий.
2. Назвать эти микроорганизмы с учетом формы и расположения.
3. Назвать метод окраски мазка.
4. Объяснить механизм окраски этим методом.

**Задача 5.** Больной Т., 50 лет, обратился в поликлинику с жалобами на сильную боль под ногтем пальца правой руки. Хирург, осмотрев палец больного, поставил диагноз: «Панариций». Основными возбудителями данного заболевания являются золотистые и эпидер-

мальные стафилококки.

- 1. Перечислить основные морфологические и тинкториальные свойства стафилококков.*
- 2. Назвать дифференциальный метод окраски бактерий, который необходимо применить в данном случае.*
- 3. Назвать метод микроскопии, который применяется для окрашенных препаратов, и перечислить его особенности.*

## **ЗАНЯТИЕ № 3. Структура бактериальной клетки. Морфология актиномицетов и спирохет**

**Цель занятия:** изучить строение и методы выявления спор, капсул, жгутиков и пилей бактерий. Изучить классификацию, особенности строения и методы выявления актиномицетов и спирохет. Освоить принципы устройства темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного микроскопов.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение значения, строения, образования, прорастания, способа окраски споры бактерий.
3. Изучение биологической роли, строения и способов обнаружения капсулы бактерий.
4. Изучение биологической роли, строения и способов обнаружения жгутиков бактерий.
5. Изучение биологической роли и строения пилей бактерий.
6. Изучение классификации, морфологии, методов обнаружения и медицинского значения актиномицетов.
7. Изучение классификации, морфологии, методов обнаружения и медицинского значения спирохет.
8. Изучение принципа устройства темнопольного, фазово-контрастного и люминесцентного микроскопов.
9. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок**

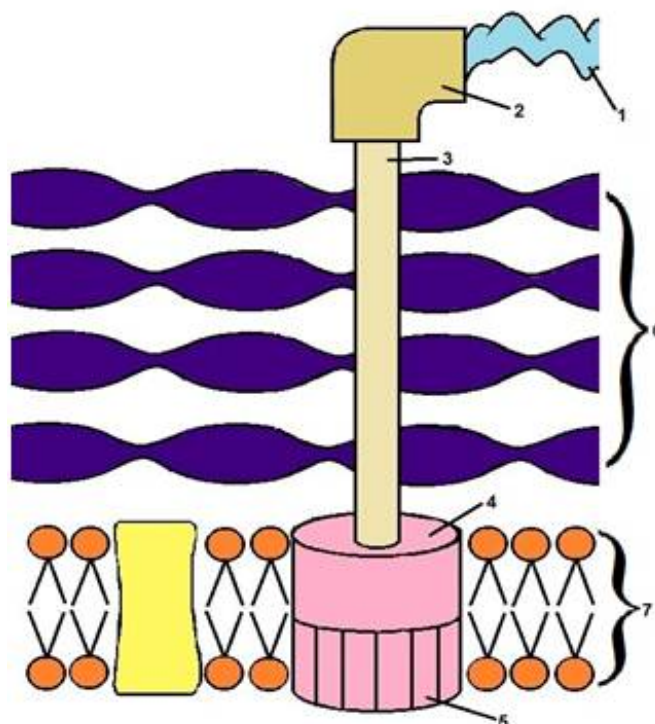
#### **Жгутики бактерий**

Жгутики бактерий определяют подвижность бактериальной клетки. Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от ЦПМ, имеющие большую длину, чем сама клетка. Толщина жгутиков – 12–20 нм, длина – 3–12 мкм.

Жгутики состоят из сократительного белка типа миозина – флагеллина (от. лат. *flagellum* – жгутик), обладающего антигенной специфичностью. Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

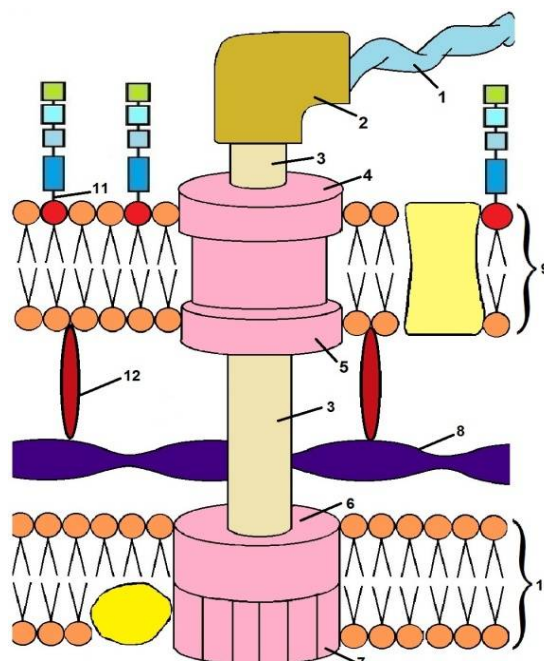
Жгутик состоит из трех компонентов – спиральной жгутиковой нити (филамента) постоянной толщины, крючка (колена) и базаль-

ного тельца (рис. 5 и 6). Крючок, к которому присоединена жгутиковая нить, имеет длину 30–45 нм и состоит из отличающегося от флагеллина белка. Он соединен с базальным тельцем, которое располагается в оболочке (в клеточной стенке и ЦПМ). Нити жгутиков приводит в движение мембранный шарнироподобный базальный крюк. Базальное тельце состоит из центрального стержня, заключенного в систему особых колец. Кольца выполняют роль «приводного диска» и «подшипника» на внутренней поверхности пептидогликанового слоя. Вся конструкция выполняет функцию хемомеханического преобразователя (флагеллиновый мотор).



**Рис. 5.** Строение жгутика грамположительной бактерии. 1 – филамент; 2 – колено; 3 – стержень; 4 – S-диск; 5 – M-диск; 6 – пептидогликан; 7 – цитоплазматическая мембрана

У грамотрицательных бактерий две пары колец (рис. 6): внешняя (кольца L и P) и внутренняя (кольца S и M). Кольца L и P расположены внутри клеточной стенки (кольцо L в ЛПС, а кольцо P в слое пептидогликана). Они выполняют, очевидно, роль втулки для стержня. Внутренняя пара (кольца S и M) фиксирована на ЦПМ, причем кольцо S располагается в периплазматическом пространстве, а кольцо M – на ЦПМ или в ней.



**Рис. 6.** Строение жгутика граммотрицательной бактерии. 1 – филамент; 2 – колено; 3 – стержень; 4 – L-диск; 5 – Р-диск; 6 – S-диск; 7 – М-диск; 8 – пептидогликан; 9 – наружная мембрана; 10 – цитоплазматическая мембрана; 11 – липополисахарид; 12 – липопротеин

Жгутики грамположительных бактерий, имеющих более толстую гомогенную клеточную стенку, содержат только одну пару колец – S и M (рис. 5).

Вращение жгутика в клеточной стенке происходит из-за вращательного движения колец S и M относительно друг друга и обеспечивается за счет энергии трансмембранного градиента ионов водорода или натрия. Благодаря такому вращению происходит движение бактерий в наиболее благоприятном для них направлении. Жгутиковый аппарат обладает особым бинарным переключателем, который позволяет менять направление вращения жгутиков против часовой стрелки на противоположное. Таким образом, бактерии, получив химический сигнал из окружающей среды, изменяют направление движения и выбирают оптимальные условия обитания.

Число жгутиков у бактерий различных видов варьирует от одного (монотрих) у холерного вибриона до десятка и сотен жгутиков, отходящих по периметру бактерии (перитрих), у кишечной палочки, протей и др. Лофотрихи имеют пучок жгутиков на одном конце клетки. Амфитрихи имеют по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки.

Жгутики выявляют при помощи электронной микроскопии препаратов, напыленных тяжелыми металлами, или в световом микро-

скопе после обработки специальными методами, основанными на протравливании и адсорбции различных веществ, приводящих к увеличению толщины жгутиков (например, после серебрения). Подвижность бактерий определяют при помощи фазово-контрастной или темнопольной микроскопии. Для этого готовят мазки типа «раздавленной» или «висячей» капли.

### Темнопольная микроскопия

Микроскопия в темном поле зрения основана на следующем принципе (рис. 7). Лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид) или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.

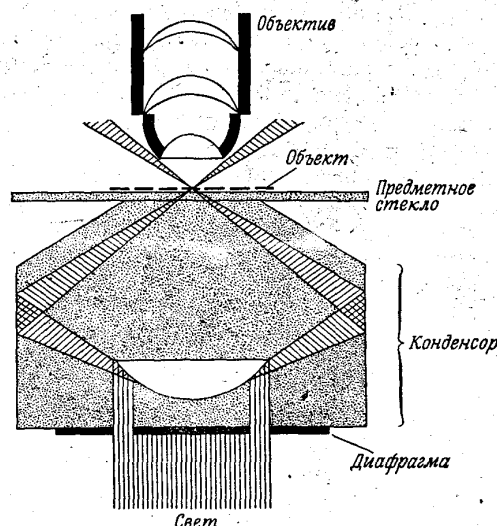


Рис. 7. Схема микроскопа для наблюдения в темном поле (Стейниер Р. и др., 1979)

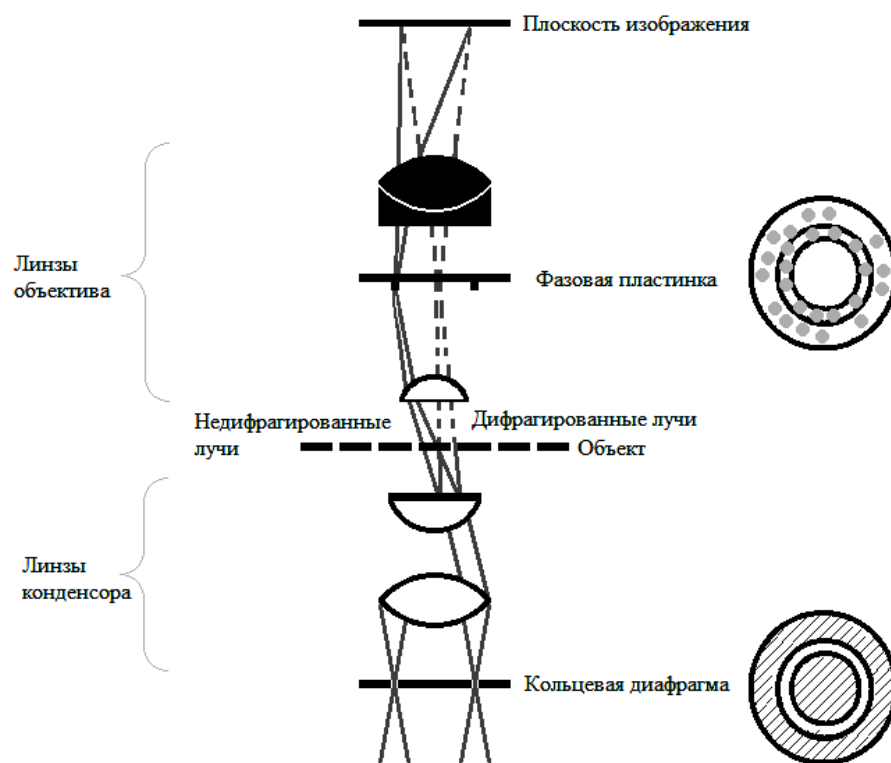
Препараты для темнопольной микроскопии готовят по типу раздавленной капли. Исследуемый материал (бактериальная культура в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным. Капля материала заполняет все пространство между покровным и предметным стеклами, образуя ровный слой. Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.

### Фазовоконтрастная микроскопия

При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринима-

ется человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным, необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива (рис. 8).

Фазовоконтрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.

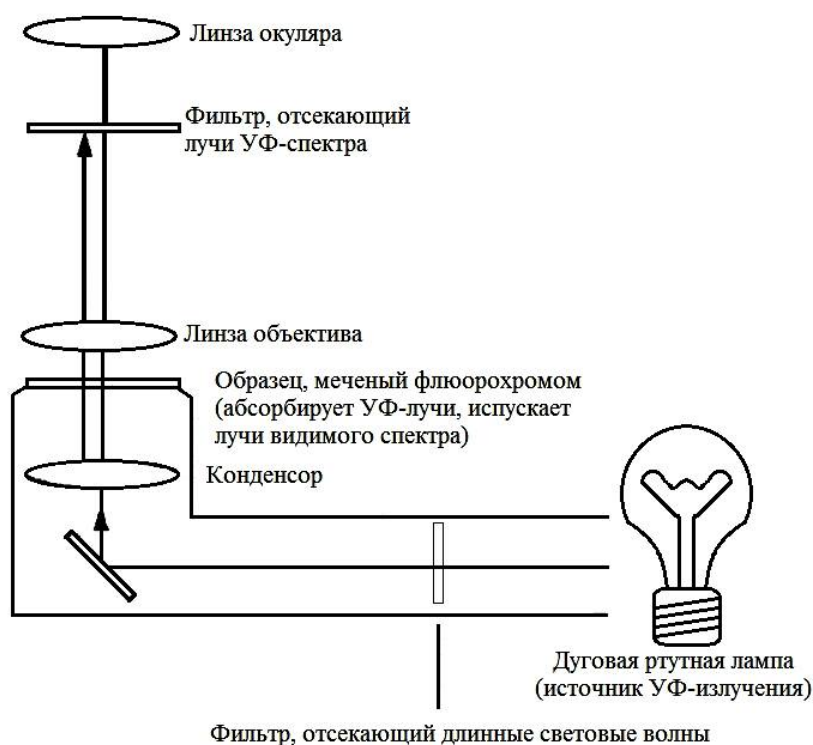


**Рис. 8.** Схема фазово-контрастного микроскопа

## Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света испускать лучи с другой (обычно большей) длиной волны (флюоресцировать). Такие вещества называют флюорохромами (акридиновый желтый, ФИТЦ, родамин и др.). Объект, обработанный флюорохромом, при

освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает яркий цвет в темном поле зрения.



**Рис. 9.** Схема люминесцентной микроскопии

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета и систему фильтров к нему (рис. 9). Очень важно использование нефлюоресцентного иммерсионного масла.

Люминесцентная микроскопия в практической микробиологии используется для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний с помощью реакции иммунофлюоресценции.

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Споры бактерий, их строение, образование, прорастание, способ окраски.
2. Капсула бактерий, их биологическая роль и способы обнаружения.
3. Жгутики бактерий, их строение, методы обнаружения. Пили, их физиологическая роль.
4. Классификация и морфология актиномицетов.
5. Классификация, морфология и ультраструктура спирохет. Методы исследования.

6. Принцип устройства темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного микроскопов и их использование в микробиологии.

### **Практический блок**

1. Изучение метода окраски спор по методу Ожешко. Микроскопия и зарисовка мазка из чистой культуры *B. pseudoanthracis*, окрашенного по методу Ожешко.
2. Изучение метода окраски капсулы по методу Бурри-Гинса. Микроскопия и зарисовка мазка из чистой культуры *K. pneumoniae*, окрашенного по методу Бурри-Гинса.
3. Изучение методов выявления жгутиков бактерий: окраска по Леффлеру и темнопольная микроскопия нативных препаратов. Микроскопия нативного смешанного мазка из культур *P. vulgaris* и *B. subtilis* в темнопольном микроскопе.
4. Приготовление мазка из чистой культуры актиномицетов и окраска его по методу Грама. Микроскопия и зарисовка.
5. Микроскопия и зарисовка препаратов спирохет, окрашенных по методу Романовского-Гимзе.

### **Методика окраски спор по Ожешко**

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

Споры прочно удерживают карболовый фуксин и окрашиваются в красный цвет, цитоплазма бактерий обесцвечивается 5% серной кислотой и после докрашивания метиленовым синим приобретает синий цвет.

### **Методика выявления капсулы по Бурри-Гинсу**

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

4. Осторожно промывают водой, высушивают.

Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выделяются на темном фоне препарата.

### Методика окраски жгутиков методом Леффлера

В основе выявления жгутиков лежит осаждение на них красителя, чем достигаются увеличение толщины жгутиков и уменьшение их прозрачности.

1. Препарат готовят из 16–18 часовой культуры, которую вносят в 1–2 мл стерильной водопроводной воды до получения тонкой опалесцирующей взвеси.
2. Через 20 мин каплю суспензии наносят на поверхность чистого обезжиренного стекла и высушивают на воздухе.
3. Обрабатывают в течение 15 мин протравой следующего состава: 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 10 мл 25% водного раствора таннина, 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа.
4. Препарат промывают водой.
5. Окрашивают карболовым фуксином Циля, разведенным водой в соотношении 1:1, в течение 5 мин при легком подогревании.
6. Промывают водой, высушивают.

При микроскопии готового препарата жгутики видны как тонкие нитевидные структуры.

### Протокол практической работы студентов Сложные методы окраски

| Вид микроорганизма              | Метод окраски  | Рисунок |
|---------------------------------|----------------|---------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | По Бурри-Гинсу |         |
| <i>Bacillus pseudoanthracis</i> | По Ожешко      |         |

### Морфология актиномицетов и спирохет

|                                                                                                |                           |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--|
| <i>Actinomyces bovis</i>                                                                       | По Граму                  |  |
| <i>Treponema pallidum</i><br>в гнойном отделяемом твер-<br>дого шанкра больного сифи-<br>лисом | По Романовскому-<br>Гимзе |  |
| <i>Borrelia recurrentis</i><br>в мазке крови больного воз-<br>вратным тифом                    | По Романовскому-<br>Гимзе |  |

## Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

### 1. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ СПОР БАКТЕРИЙ – ЭТО

- 1) размножение
- 2) движение
- 3) сохранение в неблагоприятных условиях
- 4) защита от иммунных механизмов организма

### 2. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ОКРАСКИ СПОР ЯВЛЯЕТСЯ ОКРАСКА ПО

- 1) Граму
- 2) Ожешко
- 3) Бурри-Гинсу
- 4) Нейссеру

### 3. БАКТЕРИЯ, ОБРАЗУЮЩАЯ СПОРУ БОЛЬШЕ ДИАМЕТРА СВОЕЙ КЛЕТКИ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) клостридия
- 2) сарцина
- 3) бацилла
- 4) эшерихия

### 4. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ – ЭТО

- 1) размножение
- 2) движение
- 3) сохранение в неблагоприятных условиях
- 4) защита от иммунных механизмов организма

### 5. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ВЫЯВЛЕНИЯ КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ ЯВЛЯЕТСЯ ОКРАСКА ПО

- 1) Граму
- 2) Ожешко
- 3) Бурри-Гинсу
- 4) Нейссеру

### 6. КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) спорангии
- 2) гифы
- 3) цисты

4) канидии

7. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ВЫЯВЛЕНИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ ЯВЛЯЕТСЯ МЕТОД

- 1) Ожешко
- 2) Грама
- 3) Бурри-Гинса
- 4) Нейссера

8. В ПОРАЖЕННЫХ ТКАНЯХ АКТИНОМИЦЕТЫ ОБРАЗУЮТ

- 1) зерна
- 2) гранулы
- 3) друзы
- 4) цисты

9. ОСНОВНЫМ СОКРАТИТЕЛЬНЫМ БЕЛКОМ БАКТЕРИЙ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) актин
- 2) миозин
- 3) флагеллин
- 4) альбумин

10. БАКТЕРИЯ С РАСПОЛОЖЕНИЕМ БОЛЬШОГО КОЛИЧЕСТВА ЖГУТИКОВ ПО ВСЕЙ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) монотрих
- 2) лофотрих
- 3) амфитрих
- 4) перитрих

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** Из консервированных пищевых продуктов выделена культура возбудителя ботулизма – *Clostridium botulinum*.

- 1. Назвать метод окраски, который будет использован для выявления спор.
- 2. Назвать этапы окраски спор по этому методу.
- 3. Назвать цвет, в который окрашиваются споры по этому методу. Объяснить механизм окраски спор.

**Задача 2.** При микроскопии мазка в поле зрения были обнаружены споры. Назвать морфологические группы спорообразующих микроорганизмов.

- 1. Указать варианты расположения спор в составе микробной клетки.*
- 2. Назвать метод окраски для выявления спор.*

**Задача 3.** В мазке из фекалий обнаружены грамотрицательные бактерии в виде запятой.

- 1. Определить подвижность микроорганизма.*
- 2. Предложить вид микроскопа для этого.*
- 3. Описать принцип устройства этого микроскопа.*

**Задача 4.** В лаборатории при исследовании материала от больного был выделен палочковидный микроорганизм.

- 1. Установить наличие у него капсулы.*
- 2. Назвать метод и этапы выявления капсул.*

**Задача 5.** В лаборатории при микроскопии мазка был выявлен подвижный микроорганизм.

- 1. Назвать варианты расположения жгутиков у бактерий.*
- 2. Назвать метод микроскопии для выявления подвижности бактерий.*
- 3. Назвать особенности строения микроскопа, который применяется для этого метода.*

## **ЗАНЯТИЕ № 4. Морфология риккетсий, хламидий и микоплазм. Микробы-эукариоты. Морфология грибов и простейших**

**Цель занятия:** изучить таксономическое положение, особенности строения, методы выявления и значение для медицины риккетсий, хламидий, микоплазм, грибов и простейших.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение таксономического положения, особенностей строения, методов выявления и медицинского значения риккетсий.
3. Изучение таксономического положения, особенностей строения, методов выявления и медицинского значения хламидий.
4. Изучение таксономического положения, особенностей строения, методов выявления и медицинского значения микоплазм.
5. Изучение таксономического положения, особенностей строения, методов выявления и медицинского значения грибов.
6. Изучение таксономического положения, особенностей строения, методов выявления и медицинского значения простейших.
7. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок**

Таксономическое положение простейших, имеющих медицинское значение, см. в табл. 2. Таксономическое положение грибов, имеющих медицинское значение, см. в табл. 3.

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Таксономическое положение и морфология риккетсий. Методы выявления и значение для медицины.
2. Таксономическое положение и морфология хламидий. Методы выявления и значение для медицины.
3. Таксономическое положение и морфология микоплазм. Методы выявления и значение для медицины.
4. Классификация и общая характеристика грибов.
5. Морфология и методы исследования дрожжей и дрожжеподобных грибов.

6. Морфология и методы исследования нитчатых грибов.
7. Классификация и морфология простейших. Методы исследования.

### **Практический блок**

1. Изучение морфологии риккетсий в демонстрационных препаратах, окрашенных по Граму и Романовскому-Гимзе.
2. Изучение мазка из влагалища больной хламидиозом. Окраска по Романовскому-Гимзе.
3. Изучение морфологии мукоровых, аспергилловых и пеницилловых грибов.
4. Изучение морфологии дрожжевых и дрожжеподобных грибов.
5. Изучение морфологии простейших в демонстрационных препаратах (лямблии, трипаносомы, малярийные плазмодии, токсоплазмы).

Таблица 2

## Классификация патогенных простейших

| Царство (Regnum) Protista    |                                               |                                                        |                                      |                                                   |                                                  |                                                               |
|------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Тип (Type)                   | Субтип (Subtype)                              | Класс (Class)                                          | Отряд (Ordo),<br>Семейство (Familia) |                                                   | Род (Genus)                                      | Вид (Species)                                                 |
|                              |                                               |                                                        |                                      |                                                   | <u>Genus</u> Trypanosoma                         | <u>Species</u> T. brucei gambiensi<br><u>Species</u> T. cruzi |
|                              |                                               |                                                        | <u>Ordo 2</u> Trichomonadida         |                                                   | <u>Genus</u> Trichomonas                         | <u>Species</u> T. vaginalis<br><u>Species</u> T. hominis      |
|                              |                                               |                                                        | <u>Ordo 3</u> Diplomonadida          |                                                   | <u>Genus</u> Giardia (Lamblia)                   | <u>Species</u> Giardia lamblia (Lamblia intestinalis)         |
|                              | <u>Subtype 2</u><br>Sarcodinae                | <u>Superclass</u><br>Rhizopoda<br><u>Class</u> Lobosea | <u>Ordo</u> Amoebida                 | Familia Etamoebidae                               | <u>Genus</u> Entamoeba                           | <u>Species</u> E. histolytica                                 |
|                              |                                               |                                                        |                                      | Familia Acanthamoebidae                           | <u>Genus</u> Acanthamoeba                        | <u>Species</u> A. castellani<br><u>Species</u> A. culbertsoni |
|                              |                                               |                                                        | <u>Ordo</u> Schizopyrenida           | Familia Vahlkampfiidae                            | <u>Genus</u> Naegleria                           | <u>Species</u> N. fowleri                                     |
| Царство (Regnum) Protista    |                                               |                                                        |                                      |                                                   |                                                  |                                                               |
| <u>Type 2</u><br>Apicomplexa | <u>Class</u> Sporozoea                        |                                                        | <u>Ordo</u> Coccidia                 | <u>Subordo</u> Haemosporina                       | <u>Genus</u> Plasmodium                          | <u>Species</u> Pl. vivax<br><u>Species</u> Pl. falciparum     |
|                              |                                               |                                                        |                                      | <u>Subordo</u> Eimeriina<br>Familia Eimeriidae    | <u>Genus</u> Toxoplasma<br><u>Genus</u> Isospora | <u>Species</u> T. gondii<br><u>Species</u> I. belli           |
|                              |                                               |                                                        |                                      |                                                   | <u>Genus</u> Cyclospora                          | <u>Species</u> C. cayetanensis                                |
|                              |                                               |                                                        |                                      | Familia Cryptosporididae                          | <u>Genus</u> Cryptosporidium                     | <u>Species</u> C. muris<br><u>Species</u> C. parvum           |
|                              |                                               |                                                        |                                      | <u>Subordo</u> Piroplasmida<br>Familia Babesiidae | <u>Genus</u> Babesia                             | <u>Species</u> B. divergens<br><u>Species</u> B. microti      |
| <u>Type 3</u><br>Ciliophora  | <u>Class</u> Ciliatea<br>Subclass Holotrichia |                                                        | <u>Ordo</u> Trichostomatida          |                                                   | <u>Genus</u> Balantidium                         | <u>Species</u> B. coli                                        |
| <u>Type 4</u><br>Microspora  | <u>Class</u> Microsporea                      |                                                        | <u>Ordo</u> Microsporida             |                                                   | <u>Genus</u> Enterocytozoon                      | <u>Species</u> E. bienersi                                    |

Таблица 3

## Классификация грибов, имеющих медицинское значение

| царство FUNGI (MYCOTA) | Т е л е о м о р ф ы | Тип                                                 | Класс         | Основные порядки                                                                                             | Основные роды                                             | Болезни человека                    |
|------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|                        |                     | ZYGOMYCOTA                                          | ZYGOMYCETES   | MUCORALES                                                                                                    | Rhizopus, Mucor, Rhizomucor                               | Зигомикозы                          |
|                        |                     |                                                     |               | ENTOMOPHTHORALES                                                                                             | Basidiobolus, Canidiobolus                                |                                     |
|                        |                     | ASCOMYCOTA                                          | ENDOMYCETES   | SACCHAROMYCETALES                                                                                            | Saccharomyces, Pichia (телеоморфы некоторых Candida spp.) | Многочисленные микозы               |
|                        |                     |                                                     | EUASCOMYCETES | <b>EUROTIALES</b>                                                                                            | Телеоморфы Aspergillus Penicillium spp.                   | Аспергиллезы, пенициллиозы          |
|                        |                     |                                                     |               | <b>MICROASCALES</b>                                                                                          | Pseudallescheria boydii                                   | Мицетомы, гиамогифомикоз            |
|                        |                     |                                                     |               | ONYGENALES                                                                                                   | Телеоморфы Trichophyton и Microsporum spp.                | Дерматомикозы                       |
|                        |                     |                                                     |               | HYPOCREALES                                                                                                  | Телеоморфы Fusarium spp.                                  | Кератоз, гиамогифомикоз             |
|                        |                     |                                                     |               | FILOBASIDIALES                                                                                               | Телеоморфы Cryptococcus spp.                              | Криптококкоз                        |
|                        |                     |                                                     |               | <b>USTILAGINALES</b>                                                                                         | Sporidiobolus                                             | Дерматит                            |
|                        |                     |                                                     |               | APHYLLOPHORALES                                                                                              | Schizophyllum                                             | Отравление ядовитыми грибами        |
|                        |                     |                                                     |               |                                                                                                              |                                                           |                                     |
|                        | А н а м о р ф ы     | <i>DEUTEROMYCOTA</i><br>или <i>FUNGI IMPERFECTI</i> | HYPHOMYCETES  | <b>Основные роды: Aspergillus, Epidermophyton, Exophiala, Fusarium, Microsporum, Penicillium, Sporothrix</b> |                                                           | Многочисленные микозы               |
|                        |                     |                                                     | BLASTOMYCETES | Основные роды: Cryptococcus, Candida, Malassezia, Trichosporon                                               |                                                           | Многочисленные микозы               |
|                        |                     |                                                     | COELOMYCETES  | Основные роды: Coniothyrium, Phoma, Lasiodiplodia                                                            |                                                           | Феогифомикоз, многочисленные микозы |

## Протокол практической работы студентов

### Морфология риккетсий и хламидий

| Вид микроорганизма                                                                  | Метод окраски         | Рисунок |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|
| Чистая культура <i>R. prowazekii</i>                                                | По Граму              |         |
| <i>R. prowazekii</i> в клетках эпителия кишечника платяной вши                      | По Романовскому-Гимзе |         |
| <i>C. trachomatis</i> в клетках эпителия репродуктивного тракта больной хламидиозом | По Романовскому-Гимзе |         |

### Морфология плесневых, дрожжевых и дрожжеподобных грибов

| Вид микроорганизма   | Метод окраски    | Рисунок |
|----------------------|------------------|---------|
| <i>Penicillium</i>   |                  |         |
| <i>Aspergillus</i>   |                  |         |
| <i>Mucor</i>         |                  |         |
| <i>S. cerevisiae</i> | Метиленовая синь |         |
| <i>C. albicans</i>   | По Граму         |         |

### Морфология простейших

| Вид микроорганизма                             | Метод окраски         | Рисунок |
|------------------------------------------------|-----------------------|---------|
| Лямблии                                        | По Романовскому-Гимзе |         |
| Малярийный плазмодий в крови больного малярией | По Романовскому-Гимзе |         |
| Токсоплазма                                    | По Романовскому-Гимзе |         |
| Трипаносома в крови больного трипаносомозом    | По Романовскому-Гимзе |         |

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. УКАЖИТЕ БАКТЕРИИ, ИМЕЮЩИЕ САМЫЙ МАЛЕНЬКИЙ ГЕНОМ
  - 1) кишечная палочка
  - 2) хламидии
  - 3) микоплазмы
  - 4) актиномицеты
  
2. ОБЩЕЕ НАЗВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ РИККЕТСИЯМИ
  - 1) микозы
  - 2) хламидиозы

- 3) риккетсиозы
- 4) актиномикозы

3. МИКРОКОЛОНИИ ХЛАМИДИЙ В ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) ретикулярные тельца
- 2) хламидийные включения
- 3) элементарные тельца
- 4) тельца Гварниери

4. ПО СТРОЕНИЮ ЯДРА ГРИБКИ ОТНОСЯТСЯ К

- 1) прокариотам
- 2) эукариотам
- 3) вирусам

5. ВЕГЕТАТИВНОЕ ТЕЛО ГРИБКА, СОСТОЯЩЕЕ ИЗ ГИФОВ, НАЗЫВАЮТ

- 1) мицелий
- 2) грибница
- 3) друзы

6. ГРИБКИ, ОБРАЗУЮЩИЕ ГИФЫ, НАЗЫВАЮТ

- 1) бластомицеты
- 2) дрожжеподобные
- 3) спорообразующие
- 4) гифомицеты

7. ГРИБКИ МОГУТ РАЗМНОЖАТЬСЯ

- 1) половым путем
- 2) бесполом путем
- 3) половым и бесполом путями
- 4) бинарным делением

8. *TRICHOMONAS VAGINALIS* ВЫЗЫВАЕТ

- 1) сифилис
- 2) сонную болезнь
- 3) трихомониаз
- 4) гонорею

9. ТИП SARCOMASTIGOPHORAE ИМЕЕТ ДВА ВИДА ОРГАНЕЛЛ ДВИЖЕНИЯ

- 1) псевдоподии и жгутики
- 2) ложноножки и реснички
- 3) плавники и реснички
- 4) жгутики и реснички

10. ПРИ ОКРАСКЕ ПРОСТЕЙШИХ ПО РОМАНОВСКОМУ-ГИМЗЕ ЯДРО И ЖГУТИКИ ОКРАШИВАЮТСЯ В

- 1) голубой цвет
- 2) красный цвет
- 3) фиолетовый цвет
- 4) коричневый цвет

**Ситуационные задачи**

**Задача 1.** Студент, пропустивший занятие по микробиологии, получил задание приготовить реферат о микроорганизмах, лишенных (не имеющих) клеточной стенки. С заданием он справился и в реферате описал сферопласты, протопласты и L-формы бактерий. Но преподаватель посчитал реферат неполным и вернул его студенту на доработку.

1. Назвать микроорганизмы, лишенные (не имеющие) клеточной стенки, о которых забыл студент.
2. Указать их таксономическое положение и основные биологические свойства.
3. Перечислить наиболее поражаемые ими системы и органы.
4. Указать, какие методы микроскопического исследования можно использовать, чтобы обнаружить эти микроорганизмы.

**Задача 2.** Врач-бактериолог исследовал мазок, приготовленный из отделяемого влагалища и окрашенный по Романовскому-Гимзе. В мазке он выявил клетки, в цитоплазме которых располагались включения фиолетового цвета.

1. Указать микроорганизмы, паразитирование которых в клетках должен заподозрить бактериолог.
2. Дать название включениям, обнаруженным бактериологом в клетках.
3. Перечислить, какие формы микроорганизмов могут находиться в этих включениях.

4. *Указать предварительный диагноз, который можно поставить на основании проведенного исследования.*

**Задача 3.** На студенческой конференции «Микозы и их возбудители» между студентами возник спор: одна группа студентов утверждала, что грибки – это растения, другая же была убеждена в животном происхождении грибков.

1. *Аргументированно помочь студентам разрешить спор.*

**Задача 4.** На занятии по теме «Грибки – микробы эукариоты» студент не смог ответить на вопросы, задаваемые преподавателем. Помогите ему:

1. *Назвать, какие существуют типы роста грибков.*
2. *Охарактеризовать гифальный тип роста грибков.*
3. *Назвать особенность строения гиф высших грибков.*
4. *Дать определение конидиям.*
5. *Перечислить виды спор грибков.*
6. *Назвать вид грибка, образующего эндоспоры.*

**Задача 5.** Школьнику задали на уроке биологии подготовить доклад на тему «Диморфизм грибков». Помогите школьнику справиться с заданием.

1. *Объяснить, что значит «Диморфизм грибков».*
2. *Назвать, какие грибки обладают этим феноменом.*
3. *Указать медицинское значение грибков.*
4. *Перечислить методы исследования, которые можно применять для изучения морфологии грибков.*

## **ЗАНЯТИЕ № 5. Итоговое занятие по разделу «История микробиологии. Морфология бактерий»**

**Цель занятия:** промежуточный контроль знаний студентов по теме «История микробиологии. Морфология бактерий».

### **Вопросы для итогового контроля**

1. Медицинская микробиология, ее задачи, методы, разделы.
2. Основные этапы развития микробиологии. Работы Л. Пастера и Р. Коха и их значение для развития микробиологии.
3. История кафедры микробиологии Сибирского медицинского университета.
4. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.
5. Техника приготовления бактериального мазка и простые методы его окраски.
6. Устройство светового микроскопа и техника иммерсионной микроскопии.
7. Принцип устройства темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного, электронного микроскопов и их использование в микробиологии.
8. Классификация прокариотов. Основные таксономические единицы. Понятие о виде, варианте, штамме, клоне, квазивиде.
9. Основные отличия эукариотических и прокариотических клеток.
10. Морфология и анатомия бактерий. Постоянные и непостоянные компоненты бактериальной клетки.
11. Цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, рибосомы, мезосомы, генофор, их строение, функции и значение для бактериальной клетки.
12. Строение пептидогликана у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Его биологические свойства и значение для бактериальной клетки.
13. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий. Тейхоевые кислоты, минорные и мажорные белки, их строение, функции.
14. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Липополисахарид (ЛПС), его строение и функции.
15. Фильтрующиеся, инволютивные формы бактерий, протопласты, сферопласты, L-формы.

16. Тинкториальные свойства бактерий. Сложные методы окраски. Принцип окраски бактерий по методу Грама.
17. Особенности химического состава клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий. Принцип окраски по методу Циля-Нильсена.
18. Включения бактерий, их состав и биологическая роль. Принцип окраски по методу Нейссера.
19. Споры бактерий, их строение, образование, прорастание и биологическая роль. Принцип окраски спор по методу Ожешко.
20. Капсула и микрокапсула бактерий, ее биологическая роль и методы выявления. Принцип окраски по методу Бурри-Гинса.
21. Жгутики бактерий, их ультраструктура, значение и методы обнаружения.
22. Пили, их физиологическая роль.
23. Таксономическое положение и морфология актиномицетов. Методы их исследования и медицинское значение.
24. Таксономическое положение, морфология и ультраструктура спирохет. Методы их исследования и медицинское значение.
25. Таксономическое положение и морфология риккетсий. Методы их исследования и медицинское значение.
26. Таксономическое положение и морфология хламидий. Методы их исследования и медицинское значение.
27. Таксономическое положение и морфология микоплазм. Методы их исследования и медицинское значение.
28. Основные принципы классификации и общая характеристика грибов. Методы их исследования и медицинское значение.
29. Морфология и методы исследования дрожжей и дрожжеподобных грибов.
30. Морфология и методы исследования нитчатых грибов.
31. Основные принципы классификации и морфология простейших. Методы их исследования и медицинское значение.

## **Раздел 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

### **ЗАНЯТИЕ № 6. Питание, размножение, культивирование бактерий. Выделение чистых культур аэробных бактерий**

**Цель занятия:** ознакомление с механизмами питания и методами культивирования бактерий, питательными средами и методами выделения чистых культур.

#### **План занятия**

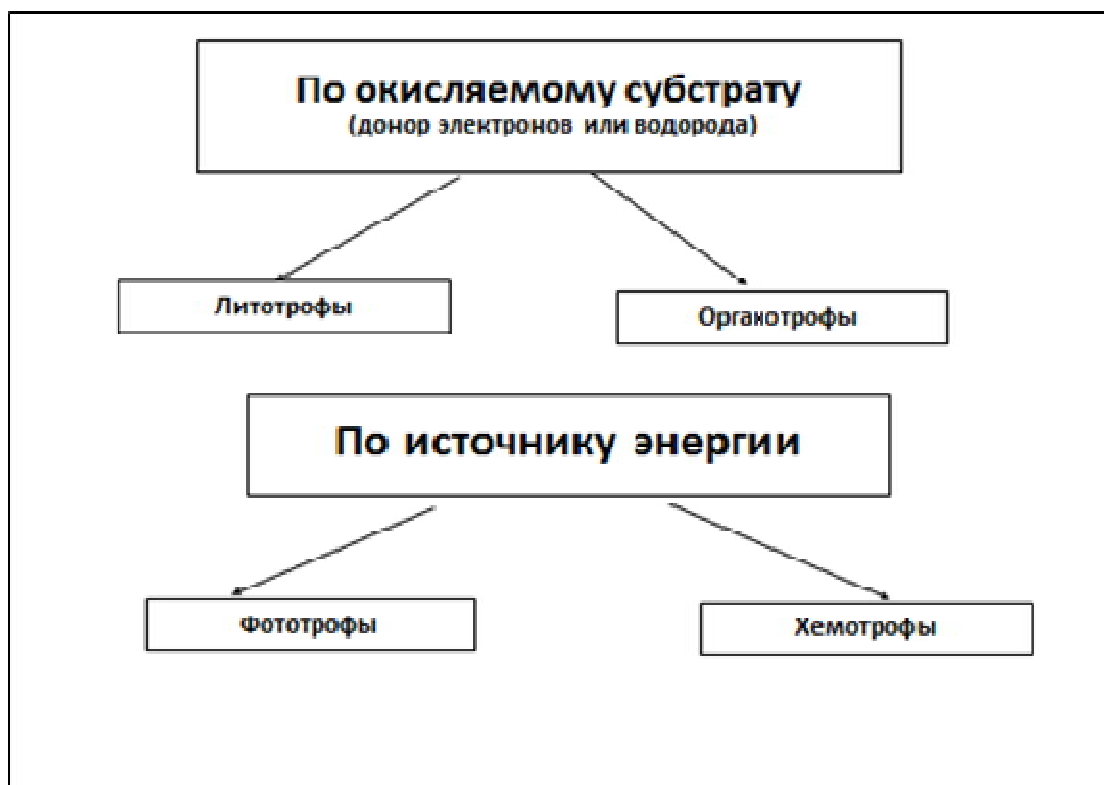
1. Проведение тест-контроля.
2. Знакомство студентов с типами и механизмами питания бактерий.
3. Изучение транспорта метаболитов у бактерий: пассивная и облегченная диффузия, активный транспорт.
4. Знакомство студентов с основными принципами и аппаратурой для культивирования бактерий.
5. Изучение культуральных свойств бактерий.
6. Изучение искусственных питательных сред, их классификации и требований, предъявляемых к питательным средам.
7. Овладение методом выделения чистых культур аэробных бактерий.
8. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

#### **Информационный блок**

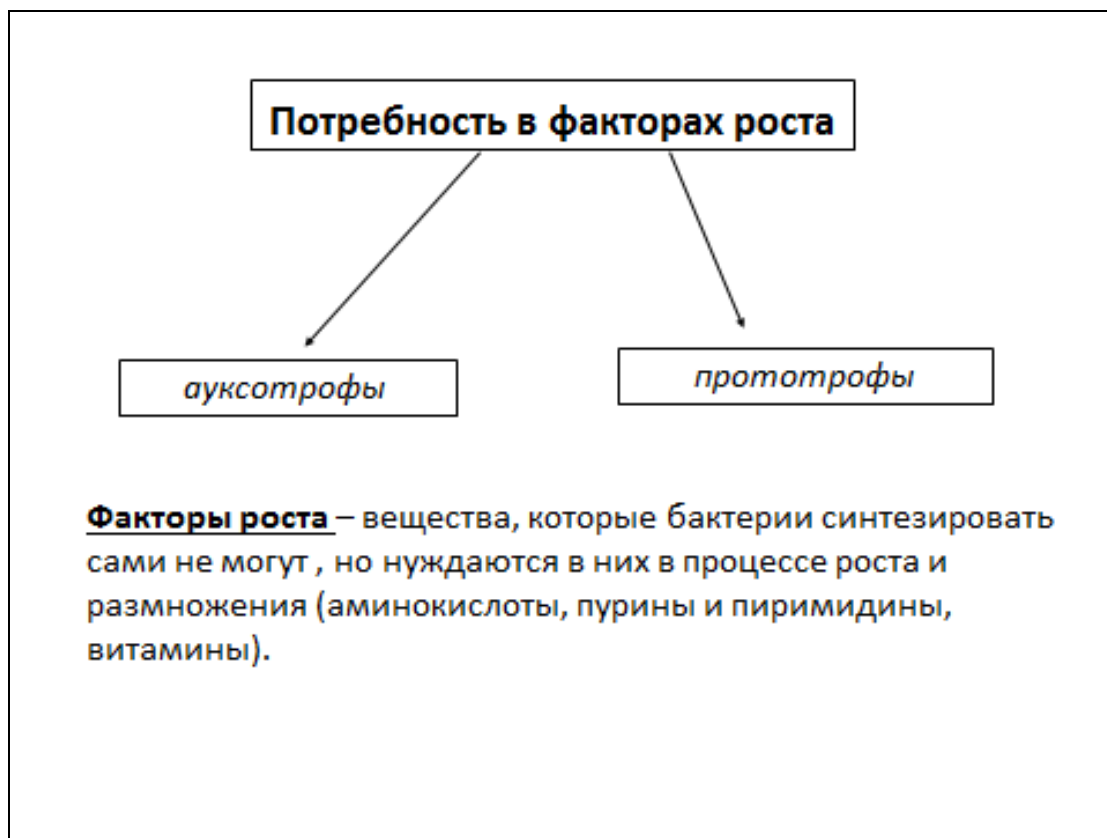
**Схемы для подготовки к занятию «Питание, размножение, культивирование бактерий. Выделение чистых культур аэробных бактерий»**



**Рис. 10.** Схема классификации бактерий по типам питания



**Рис. 11.** Схема классификации бактерий по окисляемому субстрату и источнику энергии



**Рис. 12.** Схема классификации бактерий в зависимости от потребности в факторах роста



**Рис. 13.** Схема транспорта веществ в бактериальной клетке

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Химический состав бактерий.
2. Механизмы питания и классификация бактерий по типам питания.
3. Питательные среды: классификация и принцип их приготовления. Требования к питательным средам.
4. Рост и размножение бактерий. Фазы размножения бактерий в замкнутой среде.
5. Культуральные свойства бактерий.
6. Методы выделения чистых культур аэробных бактерий.

### **Практический блок**

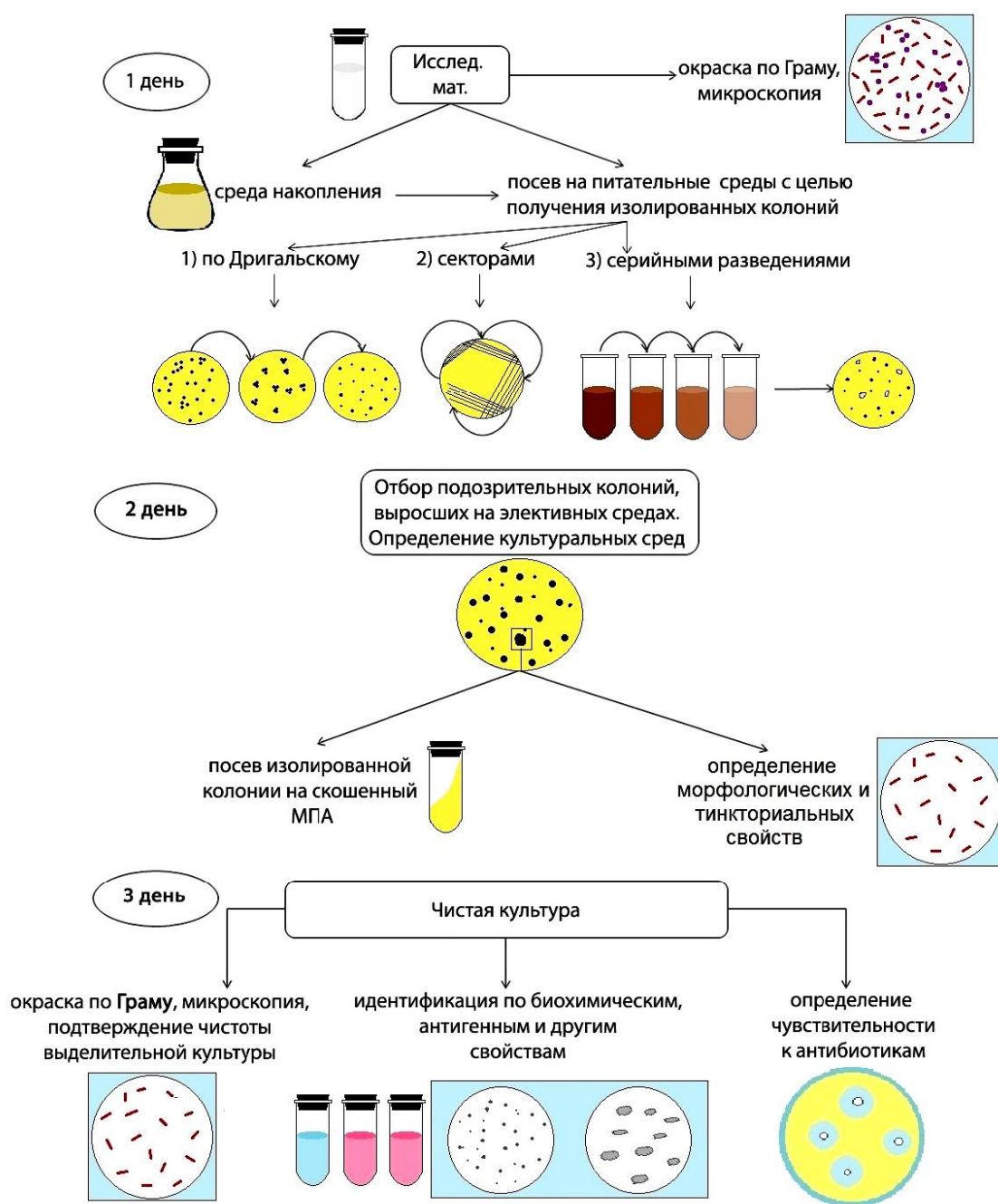
1. Изучение набора питательных сред.
2. Изучение типов роста бактерий на жидких и плотных питательных средах.
3. Изучение методов выделения чистой культуры аэробных бактерий. Посев по Дригальскому.
4. Составление схемы бактериологического исследования и выполнение первого этапа выделения чистых культур аэробных бактерий.

### **Методика выделения чистой культуры аэробных бактерий из смеси микроорганизмов**

#### **(I этап – посев по Дригальскому)**

0,1 мл смеси микроорганизмов капают на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри с МПА. Стерильным шпателем тщательно распределяют смесь по крышке. Затем этим же шпателем осторожно проводят по всей поверхности МПА. Закрывают чашку и инкубируют при 37<sup>0</sup>С 18–24 ч.

### Схема выделения чистой культуры аэробных бактерий



**Рис. 14.** Схема выделения чистой культуры аэробных микроорганизмов

## Протокол практической работы студентов

### Выделение чистой культуры аэробных бактерий из смеси микроорганизмов

| Этап | Материал                               | Ход работы                                                                                                                                               | Результат |
|------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I    | Смесь микроорганизмов                  | 1. Приготовление мазка из смеси микроорганизмов и окраска по Граму.<br>2. Посев смеси микроорганизмов на МПА по Дригальскому.                            |           |
| II   | Изолированные колонии, выросшие на МПА | 1. Описание выросших колоний.<br>2. Приготовление мазка-препарата из колонии и окраска по Граму.<br>3. Посев оставшейся части колонии на скошенный агар. |           |
| III  | Чистая культура                        | Приготовление мазка и окраска по Граму                                                                                                                   |           |

Заключение:

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. ОСНОВНЫМ ТРЕБОВАНИЕМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ, ЯВЛЯЕТСЯ
  - 1) высокое содержание солей
  - 2) стерильность
  - 3) наличие ферментов
  - 4) наличие липидов
2. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СРЕДОЙ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ
  - 1) МПА
  - 2) среда Эндо
  - 3) среда Плоскирева
  - 4) среда Гисса
3. ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МПБ НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ
  - 1) аминокислоты
  - 2) пептон

- 3) хлористый натрий
- 4) мясная вода

4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ПОДРАЗДЕЛЯЮТСЯ НА

- 1) синтезированные
- 2) естественные
- 3) полусинтетические
- 4) физические

5. ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ

- 1) простые среды
- 2) сложные среды
- 3) элективные среды
- 4) среды, содержащие глицерин

6. СРЕДЫ ОБОГАЩЕНИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНЫ ДЛЯ

- 1) изучения двигательной активности бактерий
- 2) определения ферментативной активности микроорганизма
- 3) стимуляции роста определенного микроорганизма
- 4) выращивания галофильных бактерий

7. АУТОТРОФЫ – ЭТО БАКТЕРИИ, КОТОРЫЕ

- 1) используют органический углерод
- 2) используют для построения клеток  $\text{CO}_2$
- 3) используют для питания свет
- 4) используют в качестве доноров электронов органические соединения

8. ФОТОТРОФЫ – ЭТО МИКРООРГАНИЗМЫ, КОТОРЫЕ

- 1) в качестве источника энергии используют свет
- 2) получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций
- 3) питаются инертным органическим материалом
- 4) зависят от питательных веществ макроорганизма

9. ФАКТОРАМИ РОСТА НЕ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) аминокислоты
- 2) пуриновые и пиримидиновые основания

- 3) витамины
- 4) липиды

## 10. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ В БАКТЕРИАЛЬНУЮ КЛЕТКУ НЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ

- 1) простой диффузией
- 2) облегченной диффузией
- 3) активным транспортом
- 4) эндоцитозом

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** Студент получил задание приготовить реферат по пропущенному занятию «Питание, размножение и культивирование бактерий». Он выбрал тему «Химический состав бактерий». Помогите студенту справиться с рефератом.

1. *Перечислить основные соединения, которые усваивает бактериальная клетка.*
2. *Назвать основные элементы и микроэлементы, необходимые бактериям.*
3. *Объяснить предназначение микроэлементов для бактерий.*
4. *Дать определение «факторам роста» и представить классификацию бактерий по способности синтезировать «факторы роста».*

**Задача 2.** Группа студентов, занимающихся в кружке по микробиологии, решила создать компьютерную модель бактериальной клетки. Студент, отвечающий за моделирование клеточной стенки бактерии, задался следующим вопросом: «Как питательные вещества проникают внутрь бактериальной клетки через такую плотную структуру, как клеточная стенка?» Помогите студенту разобраться в этом вопросе.

1. *Назвать структуры в клеточной стенке бактерий, через которые проникают питательные вещества внутрь клетки.*
2. *Назвать отличия в строении этих структур у грамположительных и грамотрицательных бактерий.*
3. *Перечислить механизмы проникновения питательных веществ в бактериальную клетку.*
4. *Назвать механизмы проникновения питательных веществ в бактерию, которые проходят с затратой энергии АТФ.*

**Задача 3.** Студент получил задание приготовить реферат по пропущенному занятию «Питание, размножение и культивирование бактерий». От преподавателя он получил подробный план реферата и встретил там много новых непонятных терминов. Разъясните студенту часть этих терминов.

1. *Разъяснить смысл терминов «автотрофы» и «гетеротрофы».*
2. *Определить, какие микроорганизмы называются «хемотрофами», а какие – «фототрофами».*
3. *Пояснить термины «литотрофы» и «органотрофы».*
4. *Выяснить, к каким группам по типам питания относится большинство патогенных микроорганизмов.*

**Задача 4.** Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, вызывающие заболевания у человека. Охарактеризуйте эти микроорганизмы по типам питания.

1. *Привести название микроорганизмов, способных утилизировать продукты метаболизма только живой клетки.*
2. *Назвать основные группы, на которые подразделяются эти микроорганизмы.*
3. *Привести примеры прокариотов, которые не способны размножаться вне живой клетки.*
4. *Объяснить, с чем связан такой тип их существования.*

**Задача 5.** К практическому занятию по микробиологии лаборант должен приготовить плотную питательную среду.

1. *Назвать вещество, которое должен добавить в среду лаборант, чтобы она стала плотной.*
2. *Назвать основной способ его получения.*
3. *Перечислить требования, которым должна отвечать эта питательная среда.*
4. *Назвать основную плотную питательную среду, используемую в бактериологии.*

## ЗАНЯТИЕ № 7. Дыхание бактерий. Методы культивирования анаэробов. Ферменты микроорганизмов

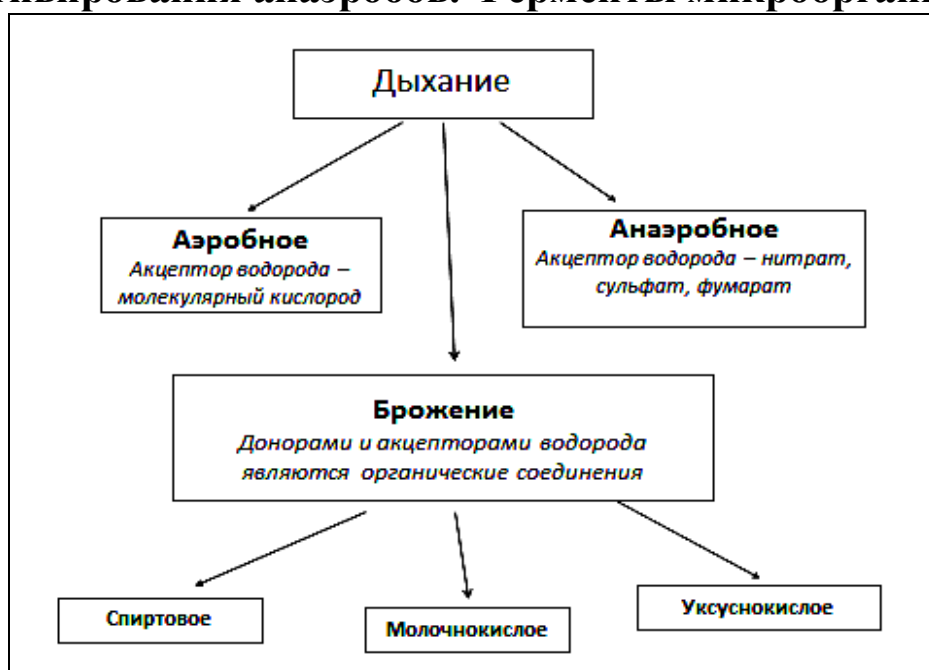
**Цель занятия:** изучить механизмы дыхания бактерий, методы культивирования анаэробов, методику выделения чистых культур анаэробов и определение биохимических свойств бактерий.

### План занятия

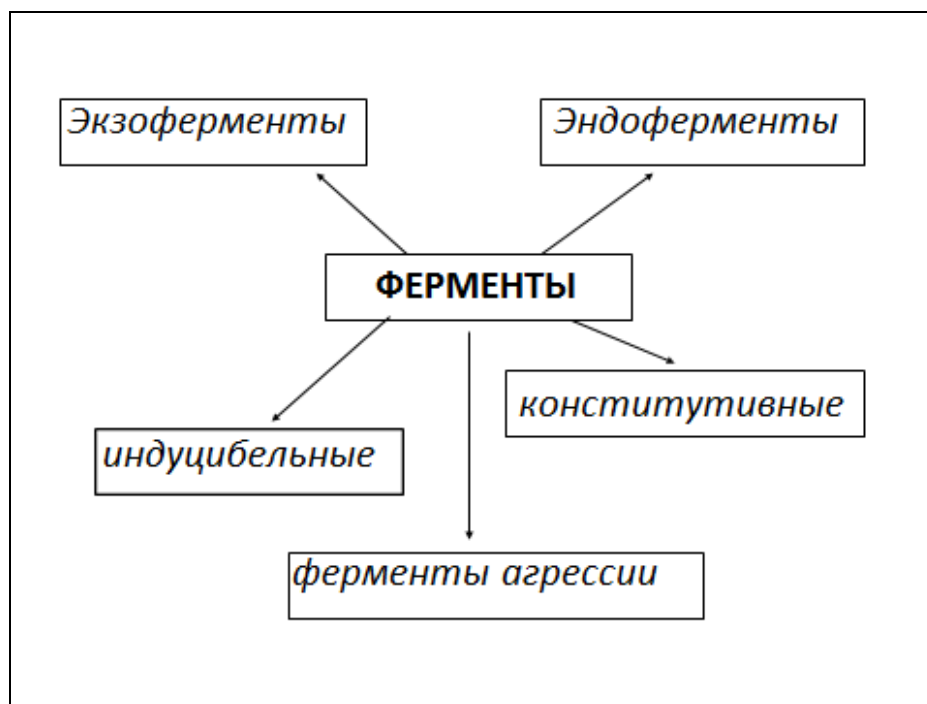
1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение способов получения энергии бактериями (дыхание, брожение).
3. Ознакомиться с методами культивирования и выделения чистой культуры анаэробов.
4. Ознакомиться с международной классификацией и характеристикой ферментов бактерий.
5. Изучение методов определения гликолитических и протеолитических ферментов бактерий.
6. Изучение идентификации бактерий по ферментативной активности.
7. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### Информационный блок

**Схемы для подготовки к занятию «Дыхание бактерий. Методы культивирования анаэробов. Ферменты микроорганизмов»**



**Рис. 15.** Схема классификации бактерий по типу дыхания



**Рис. 16.** Схема классификации ферментов микроорганизмов по назначению и связи с бактериальной клеткой

### Ферменты бактерий

(белки, участвующие в процессах метаболизма )

- оксидоредуктазы – окислительно-восстановительные ферменты (к ним относятся дегидрогеназы, оксидазы и др.);
- трансферазы, переносящие отдельные радикалы и атомы от одних соединений к другим;
- гидролазы, ускоряющие реакции гидролиза, т.е. расщепление веществ на более простые с присоединением молекулы воды (эстеразы, фосфатазы, глюкозидазы и др.);
- лиазы, отщепляющие от субстрата химические группы негидролитическим путем (карбоксилазы и др.);
- изомеразы, превращающие органические соединения в их изомеры (фосфогексоизомераза и др.);
- лигазы, или синтетазы, ускоряющие синтез сложных соединений из более простых (аспарагинсинтетаза, глутаминсинтетаза и др.).

**Рис. 17.** Схема классификации ферментов микроорганизмов по механизму действия

# Схема выделения чистой культуры анаэробных бактерий

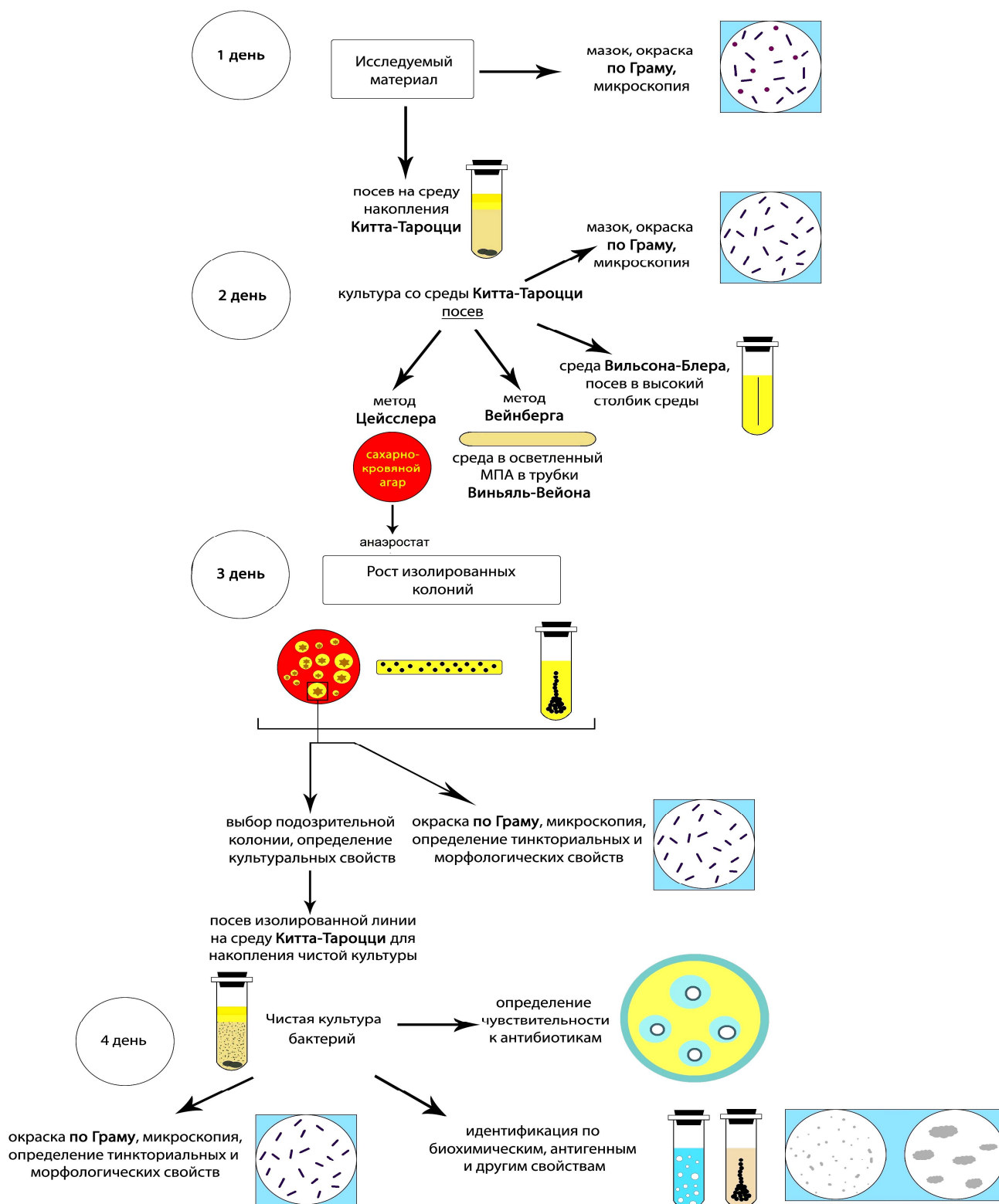


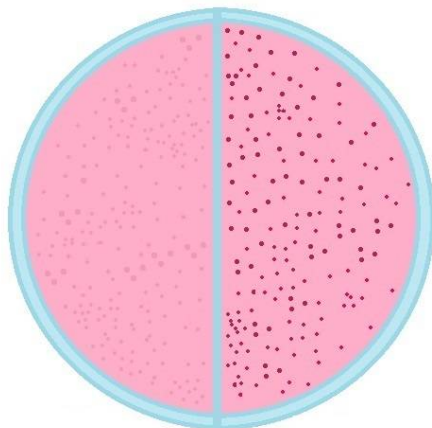
Рис. 18. Схема выделения чистой культуры анаэробов

## **Дифференциально-диагностические питательные среды**

Дифференциально-диагностические питательные среды предназначены для определения ферментативной активности микроорганизмов. Ферментативная активность микроорганизмов является основной характеристикой для их дифференциации.

### **Среда Эндо**

Состав: МПА, лактоза, индикатор фуксин (в нейтральной среде – розовый, при сдвиге рН в кислую сторону становится малиновым). Среда разливается в чашки Петри и используется для выделения чистой культуры энтеробактерий (рис. 19).

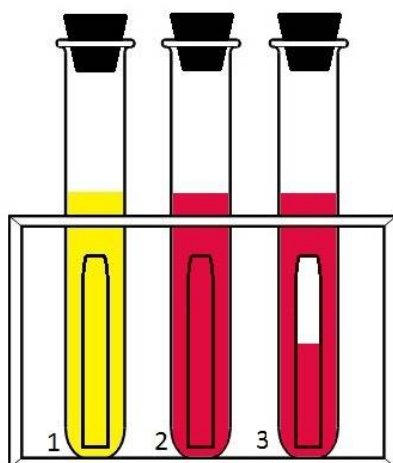


**Рис. 19.** Среда Эндо с посевом различных микроорганизмов. Слева – культура лактозонегативного микроорганизма, справа – лактозопозитивного

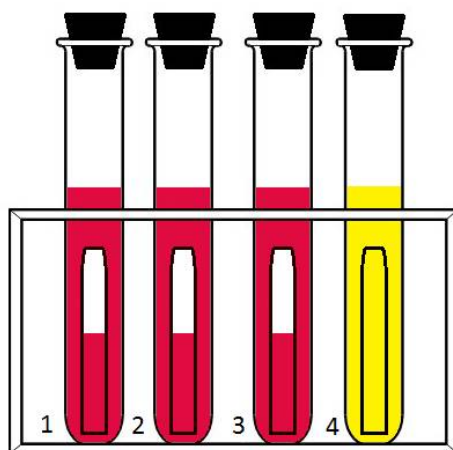
### **Среда Гисса**

#### Жидкая среда Гисса

Состав: МПБ, субстрат (углевод), индикатор Андреде (в нейтральной среде – желтый, при сдвиге рН в кислую сторону становится малиновым). Для определения газообразования в пробирку со средой помещают поплавки (рис. 20).



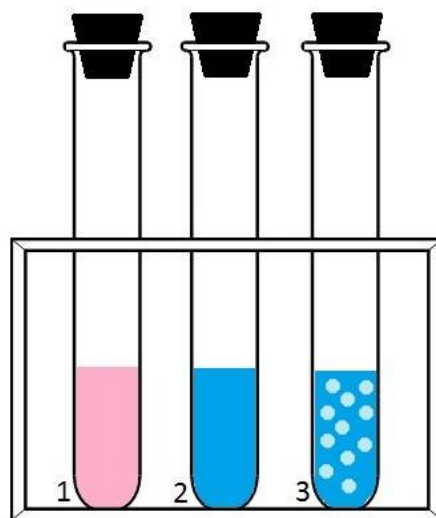
**Рис. 20.** Жидкая среда Гисса. 1 – интактная среда, углевод не расщепляется; 2 – микроорганизм, посеянный в среду, расщепляет углевод до кислоты; 3 – микроорганизм, посеянный в среду, расщепляет углевод до кислоты и газа



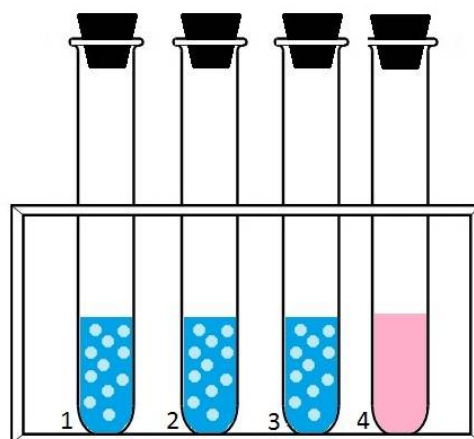
**Рис. 21.** Посев *E. coli* в жидкие среды Гисса с разными углеводами. 1 – среда с глюкозой (расщепление с образованием кислоты и газа); 2 – среда с лактозой (расщепление с образованием кислоты и газа); 3 – среда с маннитом (расщепление с образованием кислоты и газа); 4 – среда с сахарозой (нет расщепления)

### Полужидкая среда Гисса

Состав: 0,5% МПА, субстрат (углевод), индикатор ВР (водный голубой и розоловая кислота, в нейтральной среде цвет розовый, при сдвиге рН в кислую сторону становится синим). При газообразовании в среде появляются пузырьки газа (рис. 22).



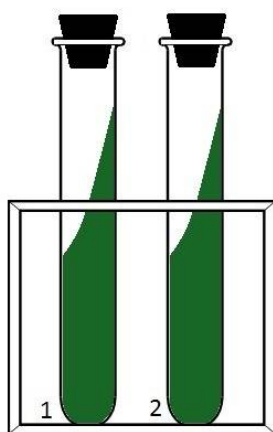
**Рис. 22.** Полужидкая среда Гисса. 1 – интактная среда, углевод не расщепляется; 2 – микроорганизм, посеянный в среду, расщепляет углевод до кислоты; 3 – микроорганизм, посеянный в среду, расщепляет углевод до кислоты и газа



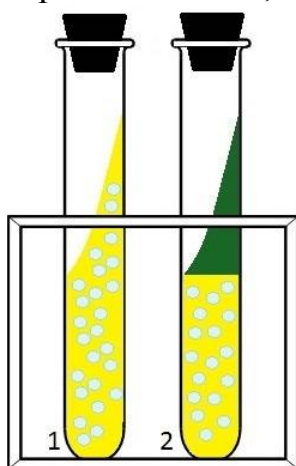
**Рис. 23.** Посев *E. coli* в полужидкие среды Гисса с разными углеводами. 1 – среда с глюкозой (расщепление с образованием кислоты и газа); 2 – среда с лактозой (расщепление с образованием кислоты и газа); 3 – среда с маннитом (расщепление с образованием кислоты и газа); 4 – среда с сахарозой (нет расщепления)

### Среды Ресселя

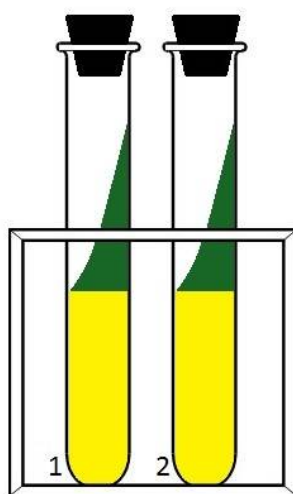
Состав: МПА, глюкоза, лактоза, манит, сахароза, индикатор бромтимоловый синий (в нейтральной среде – сине-зеленого цвета, при сдвиге pH в кислую сторону становится желтым). При газообразовании в среде появляются пузырьки газа. Состоит из 2-х пробирок со скошенной средой (рис. 24). Расщепление углеводов наблюдается в следующем порядке: глюкоза – в Ресселе I в столбике, лактоза – в Ресселе I в скосе, маннит – в Ресселе II в столбике, сахароза – в Ресселе II в скосе.



**Рис. 24.** Среда Ресселя интактные, без посева, углеводы не расщепляются. 1 – среда Ресселя I; 2 – среда Ресселя II



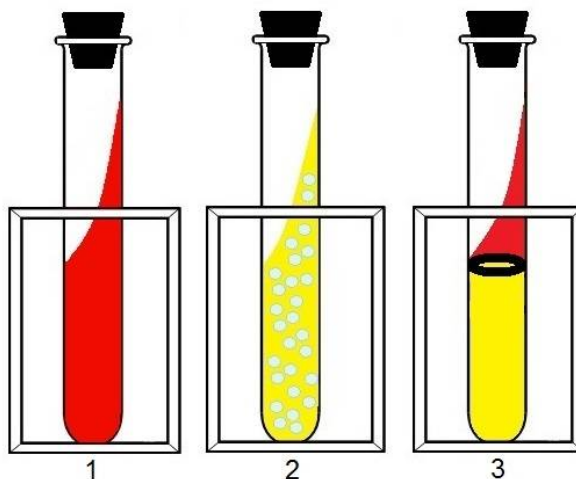
**Рис. 25.** Расщепление углеводов в средах Ресселя *E. coli*. 1 – в среде Ресселя I расщепляются оба углевода (и глюкоза, и лактоза) до кислоты и газа; 2 – в среде Ресселя II расщепляется только маннит в столбике до кислоты и газа, сахароза не расщепляется



**Рис. 26.** Расщепление углеводов в средах Ресселя *S. typhi*. 1 – в среде Ресселя I расщепляется глюкоза в столбике до кислоты, не расщепляется лактоза в скосе; 2 – в среде Ресселя II расщепляется маннит в столбике до кислоты, сахароза в скосе не расщепляется

## Среда Клиглера

Состав: МПА, глюкоза, лактоза, сульфат железа, индикатор феноловый красный (в нейтральной среде – красный, при сдвиге pH в кислую сторону становится желтым). При выделении сероводорода образуется черное кольцо. При газообразовании в среде появляются пузырьки газа (рис. 27). Расщепление углеводов наблюдается в следующем порядке: глюкоза – в столбике, лактоза – в скосе.



**Рис. 27.** Ферментативная активность различных микроорганизмов в среде Клиглера. 1 – интактная среда без посева; 2 – посев *E. coli* в среду Клиглера (глюкоза и лактоза расщепляются до кислоты и газа, сероводород не выделяется); 3 – посев *S. typhi* в среду Клиглера (глюкоза в столбике расщепляется до кислоты, лактоза в скосе не расщепляется, наличие черного кольца говорит о выделении сероводорода)

## Вопросы для самоподготовки к занятию

1. Типы дыхания бактерий в зависимости от акцептора электронов. Брожение.
2. Методы культивирования анаэробов.
3. Промышленное культивирование бактерий.
4. Классификация и характеристика ферментов микроорганизмов.
5. Роль ферментов в идентификации бактерий. Дифференциально-диагностические среды.

## Практический блок

1. Выполнение второго этапа выделения чистой культуры аэробных бактерий.
  - а) изучение свойств колоний бактерий, выросших при посеве смеси на МПА; приготовление мазка, окраска по Граму. Микроскопия.
  - б) посев материала из изолированных колоний на МПБ и МПА.
2. Изучение сред и аппаратуры для культивирования анаэробов.

3. Составление схемы выделения чистой культуры анаэробных бактерий.
4. Изучение методов определения ферментативной активности бактерий на моносубстратных и полисубстратных питательных средах.
5. Демонстрация микротестсистем для определения ферментативной активности микроорганизмов.

### Методика выделения чистой культуры

#### (II этап «Характеристика выросших колоний и пересев на скошенный агар для выделения чистой культуры»)

Внимательно изучить выросшие на чашке Петри с МПА колонии, выбрать изолированную колонию для дальнейшей работы. Охарактеризовать ее по следующим свойствам: размер, форма, цвет, характер края, характер поверхности, консистенция, прозрачность. Часть выбранной колонии стерильно петлей пересеять на поверхность скошенного агара, а из оставшейся части сделать мазок, зафиксировать его и окрасить по Граму. Мазок промикроскопировать и зарисовать. Использовать протокол занятия № 6.

### Протокол практической работы студентов

Определение ферментативной активности кишечной палочки на средах Гисса

| Вид микро-организма | Гликолитические ферменты (среды Гисса) |         |         |          |        | Протеолитич. ферменты |       |
|---------------------|----------------------------------------|---------|---------|----------|--------|-----------------------|-------|
|                     | сахароза                               | лактоза | глюкоза | мальтоза | маннит | H <sub>2</sub> S      | индол |
| <i>E. coli</i>      |                                        |         |         |          |        |                       |       |

Сравнение ферментативной активности кишечной палочки и стафилококка на средах Ресселя

| Вид микро-организма   | Гликолитические ферменты (среды Ресселя) |         |          |        | Протеолитические ферменты |       |
|-----------------------|------------------------------------------|---------|----------|--------|---------------------------|-------|
|                       | лактоза                                  | глюкоза | сахароза | маннит | H <sub>2</sub> S          | индол |
| <i>E. coli</i>        |                                          |         |          |        |                           |       |
| <i>S. epidermidis</i> |                                          |         |          |        |                           |       |

Сравнение ферментативной активности кишечной палочки и сальмонеллы брюшного тифа на среде Клиглера

| Вид микроорганизма      | Среда Клиглера |         |                  |
|-------------------------|----------------|---------|------------------|
|                         | лактоза        | глюкоза | H <sub>2</sub> S |
| <i>Escherichia coli</i> |                |         |                  |
| <i>Salmonella typhi</i> |                |         |                  |

## Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

### 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ ПРОИСХОДИТ В УСЛОВИЯХ

- 1) повышенного давления
- 2) повышенного содержания  $O_2$
- 3) повышенного содержания  $CO_2$
- 4) пониженной температуры

### 2. ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ ПРИМЕНЯЕТСЯ СРЕДА

- 1) Левенштейна-Йенсена
- 2) Китта-Тароцци
- 3) Эндо
- 4) Клиглера

### 3. ФАКУЛЬТАТИВНЫЕ АНАЭРОБЫ – ЭТО МИКРООРГАНИЗМЫ, КОТОРЫЕ

- 1) способны расти и размножаться как в присутствии кислорода, так и без него
- 2) погибают в присутствии молекулярного кислорода
- 3) растут и размножаются только в присутствии кислорода
- 4) используют для получения энергии только брожение

### 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРОВОДЯТ НА

- 1) среде Ру
- 2) среде Гисса
- 3) агаре Цейслера
- 4) МПБ

### 5. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ

- 1) синтеза витаминов
- 2) переноса наследственной информации
- 3) подвижности микробной клетки
- 4) идентификации бактерий

6. СРЕДИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮТСЯ
- 1) облигатные аэробы
  - 2) облигатные анаэробы
  - 3) факультативные анаэробы
  - 4) микроаэрофилы
7. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ НА СРЕДЕ ЭНДО ОСНОВАНА НА
- 1) расщеплении глюкозы
  - 2) расщеплении лактозы
  - 3) образовании кислых продуктов
  - 4) восстановлении основного фуксина
8. ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ – ЭТО
- 1) углеводы
  - 2) белки
  - 3) липиды
  - 4) нуклеиновые кислоты
9. ТРАНСФЕРАЗЫ – ЭТО
- 1) ферменты-переносчики
  - 2) ферменты сшивки
  - 3) ферменты, осуществляющие внутримолекулярные перестройки в субстрате
  - 4) ферменты патогенности
10. ОБЛИГАТНЫЕ АНАЭРОБЫ – ЭТО БАКТЕРИИ, КОТОРЫЕ
- 1) растут и размножаются только в присутствии кислорода
  - 2) используют кислород для получения энергии путем кислородного дыхания
  - 3) не используют кислород для получения энергии
  - 4) растут при пониженном парциальном давлении кислорода

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** Студент, занимающийся в кружке по микробиологии, получил задание культивировать облигатный анаэроб *Clostridium perfringens*. Он посеял микроорганизм в пробирку с МПБ и поставил

ее в термостат. Студент наблюдал за посевом в течение месяца, но роста микроорганизма не обнаружил.

- 1. Назвать ошибку, которую допустил студент.*
- 2. Посоветовать студенту методы культивирования для этого микроорганизма.*
- 3. Назвать причину гибели культивируемого микроорганизма.*

**Задача 2.** Студент, занимающийся в кружке по микробиологии, получил задание исследовать протеолитические свойства нового штамма кишечной палочки. Помогите ему выполнить задание.

- 1. Объяснить студенту, что такое протеолитические свойства микроорганизмов.*
- 2. Посоветовать студенту методы изучения протеолитической активности.*
- 3. Перечислить, что ему для этого понадобится.*

**Задача 3.** Студент, занимающийся в кружке по микробиологии, получил задание исследовать ферментативные свойства нового штамма кишечной палочки. Для этого он посеял исследуемый штамм на среды Ресселя, поставил в термостат при 37<sup>0</sup>С. Для контроля использовал среды Ресселя без посева. Через сутки культивирования студент достал пробирки из термостата и увидел следующую картину. Обе контрольные пробирки остались сине-зеленого цвета. Опытная среда Рессель 1 вся стала желтой с пузырьками газа. Опытная среда Рессель 2 пожелтела только в столбике (с пузырьками газа), а скошенная часть осталась сине-зеленой (без пузырьков).

- 1. Охарактеризовать ферментативные свойства исследуемого штамма кишечной палочки.*
- 2. Определить, к какой группе сред (по назначению) относятся среды Ресселя.*
- 3. Описать состав сред этой группы.*
- 4. Перечислить углеводы, которые входят в состав сред Ресселя.*
- 5. Назвать продукты, до которых расщепляет исследуемый микроорганизм данные углеводы.*

**Задача 4.** Студент, занимающийся на кафедре микробиологии, решил приготовить доклад на тему «Дыхание бактерий». Помогите ему составить план доклада.

- 1. Описать механизм дыхания бактерий.*

2. Назвать группы, на которые бактерии подразделяются по типам дыхания.
3. Описать механизм гибели строгих анаэробов в присутствии кислорода.

**Задача 5.** В бактериологическую лабораторию поступил материал (испражнения) от больного кишечной инфекцией. Врач-бактериолог составил план исследования: 1) выделить возбудитель заболевания; 2) определить его ферментативные (биохимические) свойства.

1. Перечислить типы сред, которые понадобятся бактериологу для каждого этапа исследования.
2. Перечислить все типы сред по составу, физическому состоянию и целевому назначению, которые Вы знаете.

## **ЗАНЯТИЕ № 8. Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы**

**Цель занятия:** изучить характер действия на микробные клетки физических, химических и биологических факторов.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение характера действия на микробные клетки физических факторов.
3. Изучение действия химических факторов на микробов. Определение понятий «химиотерапевтические вещества» и «химиотерапевтический индекс».
4. Изучение понятия «дезинфекция» и различных дезинфицирующих веществ.
5. Изучение понятий асептика и антисептика.
6. Изучение влияния биологических факторов на микроорганизмы. Виды взаимодействия между микроорганизмами.
7. Изучение понятия «антибиотики», классификации антибиотиков, методов их получения и механизмов действия.
8. Изучение понятия и механизмов антибиотикорезистентности.
9. Изучение методов определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
10. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок**

#### **Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам**

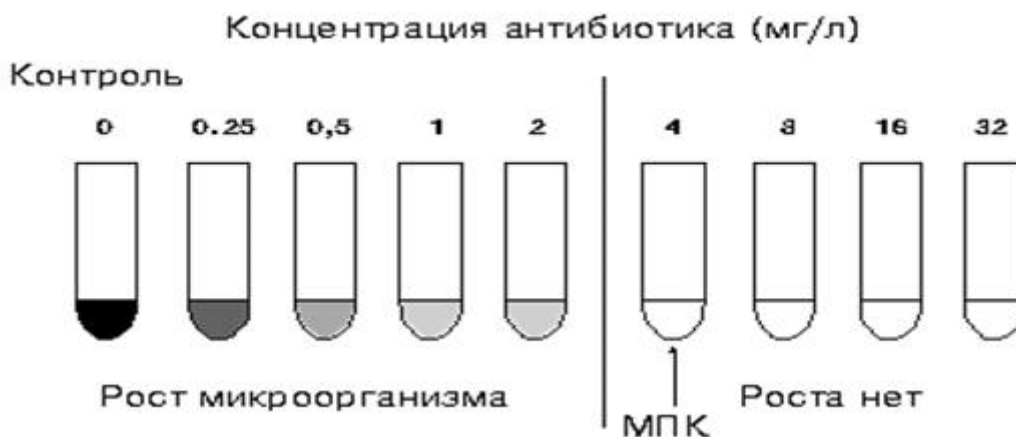
##### **Метод серийных разведений**

Метод основан на прямом определении величины *минимальной подавляющей концентрации* (МПК), определяемой как минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой

питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций антибиотиков, соответствующих пороговым (то есть концентрациям, отделяющим чувствительные микроорганизмы от промежуточных и промежуточные от резистентных).

Для проведения метода готовят последовательные разведения тестируемого антибиотика в стерильном прозрачном питательном бульоне, в каждую пробирку вносят определенное количество клеток тест-микроба (рис. 28). Пробирки помещают в термостат на 20–24 ч при температуре, оптимальной для тест-микроба. После этого в пробирках определяют наличие или отсутствие роста тест-культуры. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. Наименьшую концентрацию антибиотика, с которой визуально не определяется бактериальный рост, считают минимальной подавляющей концентрацией. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.



**Рис. 28.** Схема постановки метода серийных разведений для определения МПК антибиотика. МПК исследуемого антибиотика равно 4 мг/л

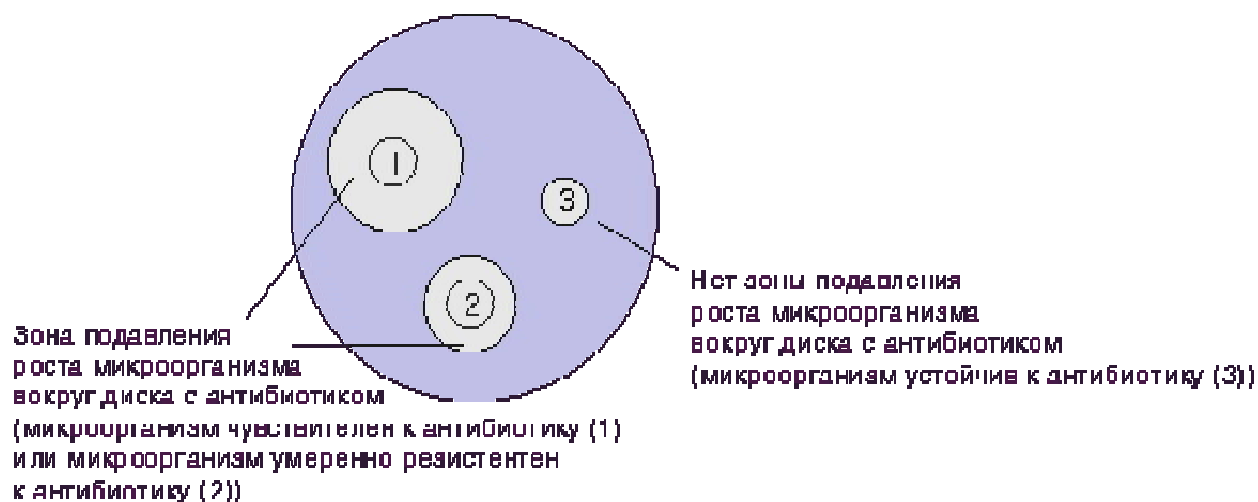
### **Диско-диффузионный метод (метод дисков)**

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом на поверхность агара в чашке Петри наносят суспензию исследуемого микроорганизма, затем помещают диски, пропитанные определенным количеством антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35–37<sup>0</sup>С в течение 20–24

часов учитывают результат путем измерения диаметра зоны задержки роста микроорганизма вокруг диска в миллиметрах (рис. 29).

В зависимости от диаметра зоны задержки роста определяется чувствительность микроорганизма к антибиотику:

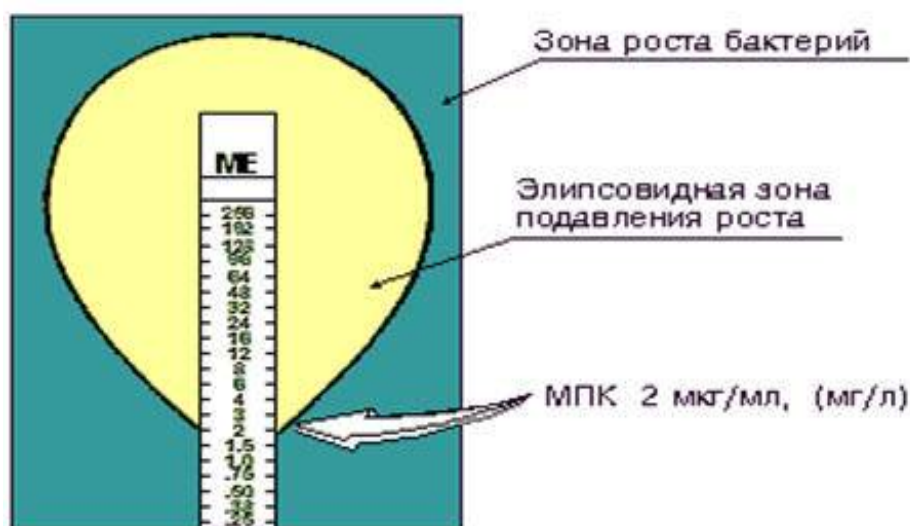
- до 10 мм – устойчивый
- 11–15 мм – мало чувствительный
- 16–25 мм – чувствительный
- более 25 мм – высокочувствительный



**Рис. 29.** Схема диско-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизма к антибиотику

### Е-тест

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (рис. 30). В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).



**Рис. 30.** Схема Е-теста

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Действие физических факторов на микроорганизмы (температура, высушивание, свет и др.). Механизм действия.
2. Методы стерилизации материала. Контроль режима стерилизации (микробиологический метод, физический метод).
3. Действие химических факторов на микробов. Химиотерапевтические вещества. Химиотерапевтический индекс.
4. Дезинфекция и дезинфицирующие вещества. Понятие об асептике и антисептике. Методы, средства.
5. Влияние биологических факторов на микроорганизмы. Виды взаимодействия между микроорганизмами.
6. Микробный антагонизм. Антибиотики. Классификация. Механизмы действия.
7. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
8. Механизмы антибиотикорезистентности бактерий и пути их преодоления.
9. Принципы рациональной антибиотикотерапии.

### **Практический блок**

1. Изучение в демонстрации аппаратуры для стерилизации (автоклав, сухожаровые шкафы, фильтры).
2. Определение действия некоторых химических факторов (карболовая кислота, хлорамин) на спорообразующие и неспорообразующие бактерии на демонстрационных посевах.
3. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом на демонстрационных посевах.

4. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений на демонстрационных посевах.

### **Протокол практической работы студентов**

#### **Определение действия 5% карболовой кислоты на спорообразующие и неспорообразующие бактерии**

| <b>Вид микроорганизма</b> | <b>Ход работы</b>                                                                                                                                           | <b>Результат</b> |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| E. coli                   | 1. Обработка культуры перед посевом 5% карболовой кислотой в течение 5 мин.<br>2. Обработка культуры перед посевом 5% карболовой кислотой в течение 30 мин. |                  |
| B. pseudoanthracis        | 1. Обработка культуры перед посевом 5% карболовой кислотой в течение 5 мин.<br>2. Обработка культуры перед посевом 5% карболовой кислотой в течение 30 мин. |                  |

Заключение:

#### **Определение действия 3% хлорамина на спорообразующие и неспорообразующие бактерии**

| <b>Вид микроорганизма</b> | <b>Ход работы</b>                                                                                                                         | <b>Результат</b> |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| E. coli                   | 1. Обработка культуры перед посевом 3% хлорамином в течение 5 мин.<br>2. Обработка культуры перед посевом 3% хлорамином в течение 30 мин. |                  |
| B. pseudoanthracis        | 1. Обработка культуры перед посевом 3% хлорамином в течение 5 мин.<br>2. Обработка культуры перед посевом 3% хлорамином в течение 30 мин. |                  |

Заключение:

### Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

| Вид микроорганизма    | Ход работы                                                                                              | Результат |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>S. epidermidis</i> | Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) пенициллина методом серийных разведений.         |           |
| <i>S. epidermidis</i> | Определение чувствительности <i>S. epidermidis</i> к различным антибиотикам диско-диффузионным методом. |           |

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. ПОЛНОЕ УНИЧТОЖЕНИЕ ВСЕХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МАТЕРИАЛЕ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) дезинфекция
- 2) стерилизация
- 3) антисептика
- 4) асептика

2. ХОЛОДНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ – ЭТО

- 1) тиндализация
- 2) автоклавирование
- 3) фильтрация
- 4) пастеризация

3. КОМПЛЕКС МЕР, НАПРАВЛЕННЫХ НА СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) стерилизация
- 2) асептика
- 3) дезинфекция
- 4) химиотерапия

4. ПРИ БАКТЕРИЦИДНОМ ЭФФЕКТЕ АНТИБИОТИКА БАКТЕРИЯ

- 1) прекращает расти
- 2) прекращает делиться
- 3) погибает

5. ПЕРВЫЙ АНТИБИОТИК – ПЕНИЦИЛЛИН ОТКРЫЛ

- 1) И.И. Мечников
- 2) Л. Пастер
- 3) А. Флеминг
- 4) Р. Кох

6. АНТИБИОТИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПУТЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА, НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) природные
- 2) синтетические
- 3) полусинтетические

7. ОСНОВНОЙ МИШЕНЬЮ ДЛЯ АНТИБИОТИКОВ, УГНЕТАЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) клеточная стенка
- 2) нуклеоид
- 3) рибосомы
- 4) цитоплазматическая мембрана

8. МИКОПЛАЗМЫ УСТОЙЧИВЫ К ПЕНИЦИЛЛИНУ ИЗ-ЗА ОТСУТСТВИЯ У НИХ

- 1) цитоплазматической мембраны
- 2) клеточной стенки
- 3) жгутиков
- 4) включений

9. ПЛАЗМИДА, КОНТРОЛИРУЮЩАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) R-фактор
- 2) S-фактор
- 3) J-фактор
- 4) A-фактор

10. К СЕЛЕКЦИИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ ПРИВОДИТ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1) цитостатиков
- 2) гормонов
- 3) антигистаминных
- 4) антибиотиков

## Ситуационные задачи

**Задача 1.** На кафедре микробиологии испортился автоклав. Лаборант решил воспользоваться сухожаровым шкафом и простерилизовать следующие предметы: стеклянные чашки Петри, резиновые пробки, металлические инструменты, питательные среды.

1. Назвать предметы, которые можно стерилизовать в сухожаровом шкафу.
2. Перечислить методы стерилизации.
3. Обосновать выбор метода для различных материалов.

**Задача 2.** На региональной олимпиаде по микробиологии студенту был задан вопрос: «А. Флеминг, Э. Чейн, Х. Флори, З. Ваксман, З. Ермольева – почему говоря о антибиотиках, мы вспоминаем этих ученых?».

1. Перечислить заслуги этих ученых.
2. Указать ученых, которые удостоились Нобелевской премии.

**Задача 3.** Ординатор обследовал пациента с урогенитальной инфекцией. В бактериологической лаборатории был выявлен возбудитель: *Ureaplasma urealyticum*. Молодой доктор назначил лечение β-лактамами антибиотиками, но лечение оказалось безрезультативно.

1. Указать причину неэффективности терапии, назначенной врачом.
2. Скорректировать антибиотикотерапию.

**Задача 4.** У ребенка, больного ангиной, из отделяемого зева был выделен патогенный стрептококк. При определении чувствительности к антибиотикам получили следующие результаты:

МПК (МИК): ампициллина – 128 мкг/мл,  
стрептомицина – 128 мкг/мл,  
тетрациклина – 128 мкг/мл,  
левомицетина – 64 мкг/мл,  
гентамицина – 2 мкг/мл.

1. Указать метод определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.
2. Перечислить антибиотики, которые целесообразно применить для лечения больного ребенка.
3. Посоветовать дополнительные лекарственные препараты для уменьшения побочных эффектов антибиотикотерапии.

**Задача 5.** После исследования пунктата, взятого от больного с эмпиемой плевры, была выделена синегнойная палочка ( $2 \times 10^5$  в 1 мл) в ассоциации с патогенным стафилококком ( $1,5 \times 10^3$  в 1 мл). При определении чувствительности к антибиотикам получены следующие результаты:

| Чувствительность к антибиотикам |         |              |        |
|---------------------------------|---------|--------------|--------|
| Синегнойная палочка             |         | Стафилококк  |        |
| Пенициллин                      | Уст.    | Пенициллин   | Уст.   |
| Стрептомицин                    | Уст.    | Стрептомицин | Уст.   |
| Канамицин                       | Уст.    | Канамицин    | Уст.   |
| Линкомицин                      | Уст.    | Линкомицин   | Чувст. |
| Мономицин                       | с/уст.  | Гентамицин   | в/уст. |
| Гентамицин                      | Чувств. | Ампициллин   | Уст.   |
| Тетрациклин                     | Уст.    |              |        |
| Ампициллин                      | Уст.    |              |        |

*1. Указать антибиотик, который необходимо назначить данному больному.*

## ЗАНЯТИЕ № 9. Морфология и биология вирусов. Бактериофаги

**Цель занятия:** изучить классификацию и особенности морфологии вирусов, стадии взаимодействия с клеткой, методы культивирования и индикации; изучить общую характеристику, классификацию и строение бактериофагов, стратегию умеренных и вирулентных бактериофагов, свойства лизогенных структур, применение бактериофагов в медицине.

### План занятия

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение общей характеристики и классификации вирусов.
3. Изучение химического состава вирусов, их строения и типов симметрии.
4. Определение типов и этапов взаимодействия вирусов с чувствительной клеткой.
5. Освоение методов культивирования вирусов.
6. Изучение типов клеточных культур и методов индикации вирусов в культуре клеток.
7. Разбор общей характеристики, классификации и строения бактериофагов.
8. Изучение вирулентных и умеренных бактериофагов, особенностей их взаимодействия с бактериальной клеткой.
9. Изучение практического применения фагов в диагностике, лечении и профилактике инфекционных заболеваний.
10. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### Информационный блок

Таблица 4

#### Основные вирусы, вызывающие заболевания человека

| Семейство                                | Тип симметрии  | Наличие супер-капсида | Размер ви-риона, нм | Представители                            |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------------|
| <b>Группа I: ДНК (двунитевые) вирусы</b> |                |                       |                     |                                          |
| <i>Parovaviridae</i>                     | Икосаэдральный | —                     | 45-55               | Папилломавирусы и полиомавирусы человека |

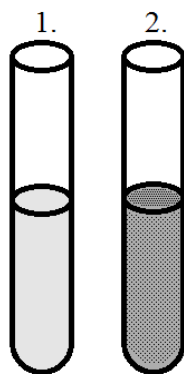
|                                                 |                |   |         |                                                                                                         |
|-------------------------------------------------|----------------|---|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Adenoviridae</i>                             | Икосаэдральный | – | 70-90   | Аденовирусы человека                                                                                    |
| <i>Herpesviridae</i>                            | Икосаэдральный | + | 200     | Вирусы простого герпеса, Эпштейна-Барр, опоясывающего лишая, цитомегаловирусы                           |
| <i>Poxviridae</i>                               | Смешанный      | – | 130-350 | Вirus оспы                                                                                              |
| <b>Группа II: ДНК (однонитевые) вирусы</b>      |                |   |         |                                                                                                         |
| <i>Parvoviridae</i>                             | Икосаэдральный | – | 18-26   | Аденоассоциированный вирус                                                                              |
| <i>Circinoviridae</i>                           | Икосаэдральный | – | 30-50   | Вirus гепатита ТТ                                                                                       |
| <b>Группа III: РНК (двунитевые) вирусы</b>      |                |   |         |                                                                                                         |
| <i>Reoviridae</i>                               | Икосаэдральный | – | 60-80   | Реовирусы, вирус Кемерово, ротавирусы                                                                   |
| <b>Группа IV: РНК (плюс-однонитевые) вирусы</b> |                |   |         |                                                                                                         |
| <i>Picornaviridae</i>                           | Икосаэдральный | – | 20-30   | Вирусы полиомиелита, ЕСНО, Коксаки, гепатита А.                                                         |
| <i>Togaviridae</i>                              | Икосаэдральный | + | 30-90   | Вirus краснухи                                                                                          |
| <i>Flaviviridae</i>                             | Икосаэдральный | + | 40-60   | Вирусы: желтой лихорадки, японского энцефалита, лихорадки денге, клещевого энцефалита, вирус гепатита С |
| <i>Caliciviridae</i>                            | Икосаэдральный | – | 20-30   | Вирусы гастроэнтерита                                                                                   |
| Гепатит Е-подобные вирусы                       | Икосаэдральный | – | 27-34   | Вirus гепатита Е                                                                                        |
| <i>Coronaviridae</i>                            | Спиральный     | + | 80-130  | Коронавирус человека, вирус SARS                                                                        |
| <b>Группа V: РНК (минус-однонитевые) вирусы</b> |                |   |         |                                                                                                         |
| <i>Bunyaviridae</i>                             | Спиральный     | + | 90-100  | Вirus геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки        |

|                                                          |                                                             |   |         |                                                   |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---|---------|---------------------------------------------------|
| <i>Arenaviridae</i>                                      | Спиральный                                                  | + | 50-300  | Вирусы Ласса, Ма-чупо                             |
| <i>Orthomyxo-<br/>viridae</i>                            | Спиральный                                                  | + | 80-120  | Вирусы гриппа                                     |
| <i>Paramyxo-<br/>viridae</i>                             | Спиральный                                                  | + | 150-300 | Вирусы кори, паротита, респираторно-синтициальный |
| <i>Rhabdoviri-<br/>dae</i>                               | Спиральный                                                  | + | 70-175  | Вирус бешенства                                   |
| <i>Filoviridae</i>                                       | Спиральный                                                  | + | 80-100  | Вирусы Марбург и Эбола                            |
| Неклассифицируемые вирусы                                |                                                             | — | 36      | Вирус гепатита D                                  |
| <b>Группа VI: РНК вирусы (обратно транскрибирующие)</b>  |                                                             |   |         |                                                   |
| <i>Retroviridae</i>                                      | Спиральный или икосаэдральный в зависимости от подсемейства | + | 80-100  | ВИЧ                                               |
| <b>Группа VII: ДНК вирусы (обратно транскрибирующие)</b> |                                                             |   |         |                                                   |
| <i>Hepadna-<br/>viridae</i>                              | Спиральный                                                  | + | 45-50   | Вирус гепатита В                                  |

### Качественные методы выявления бактериофага

#### Обнаружение бактериофага в жидкой питательной среде

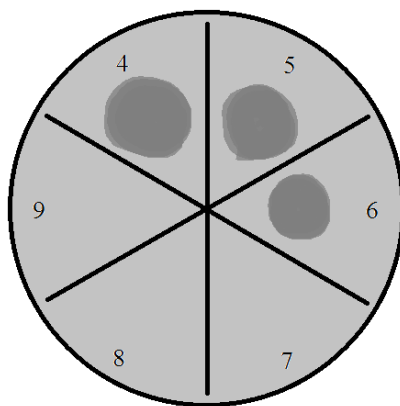
В две пробирки с питательным бульоном вносят культуру бактерий, соответствующую искомому фагу. Далее в одну пробирку (опыт) вносят фильтрат исследуемого материала, а вторая пробирка, содержащая питательный бульон и культуру микробов, служит контролем. Далее пробы инкубируют и через 24 ч учитывают результат. При наличии в фильтрате бактериофага содержимое опытной пробы будет прозрачным. В контрольной пробе будет наблюдаться рост культуры микроорганизмов в виде равномерного помутнения среды (рис. 31).



**Рис. 31.** Обнаружение бактериофага в жидкой питательной среде. Пробирка 1 – опытная: прозрачный бульон, лизис культуры фагом; пробирка 2 – контрольная: равномерное помутнение, рост культуры

### **Обнаружение бактериофага на плотной питательной среде (спот-тест)**

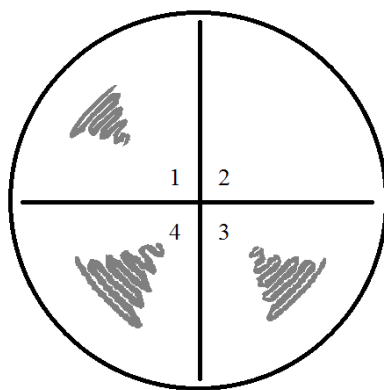
На плотную питательную среду засевают «газоном» чувствительную культуру микроорганизма, затем на поверхность посева наносят каплю исследуемого фильтрата. На одной чашке можно поставить несколько проб. О наличии бактериофага судят по отсутствию роста в месте нанесения фильтрата (рис. 32).



**Рис. 32.** Спот-тест. В пробах 4, 5 и 6 определяется бактериофаг

### **Обнаружение бактериофага на плотной питательной среде (метод Фюрта)**

Исследуемый фильтрат смешивают с расплавленным агаром и заливают в чашки Петри. После застывания агара дно чашки разделяют на сектора. На каждый сектор засевают соответствующую культуру. После инкубации наличие бактериофага определяют по образованию пятен (негативных колоний) в точках нанесения культуры или отсутствия ее роста (рис. 33).



**Рис. 33.** Метод Фюрта. В секторе 2 отсутствие роста культуры говорит о наличии бактериофага

### **Количественные методы обнаружения бактериофага**

После выявления бактериофага из исследуемого материала необходимо определить его количественное содержание или титр фага. Титр бактериофага выражается количеством активных частиц бактериофага в 1 мл исследуемого материала или величиной наибольшего разведения, при котором бактериофаг проявляет свое литическое действие. Полученную величину выражают отрицательным логарифмом 10, где степень указывает разведение фага.

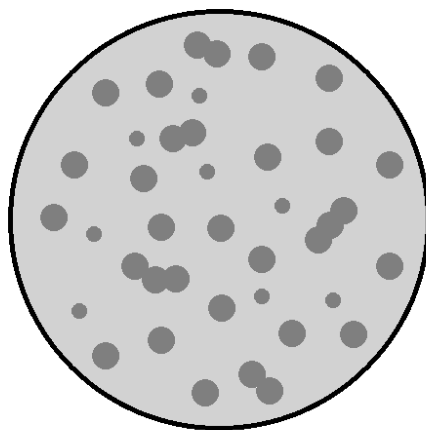
### **Титрование бактериофага в жидкой питательной среде по методу Аппельмана**

Метод основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в бульон, засеянный одной и той же дозой культуры микробов (чувствительной к данному фагу), с целью получения феномена бактериофагии.

Титром считают то максимальное разведение бактериофага, при котором наблюдается полный лизис чувствительной культуры.

### **Титрование бактериофага на плотной питательной среде по методу Грациа**

Метод основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий с последующим посевом смеси на плотную питательную среду для получения негативных колоний бактериофага. Титр фага определяют путем подсчета негативных колоний и умножением полученного числа на показатель разведения (рис. 34).



**Рис. 34.** Метод Грация

### **Применение бактериофагов для диагностики инфекционных заболеваний**

Благодаря своей специфичности действия бактериофаги используются для определения:

1. видовой принадлежности бактерий;
2. внутривидовой дифференциации бактерий;
3. индикации бактерий из объектов окружающей среды.

#### **Реакция фаголизиса**

В две пробирки с питательным бульоном вносят культуру идентифицируемого микроорганизма. Далее в одну пробирку (опыт) вносят диагностический бактериофаг, а вторая пробирка, содержащая питательный бульон и культуру микробов, служит контролем. Далее пробы инкубируют и через 24 часа учитывают результат. При отсутствии роста в опытной пробирке реакцию считают положительной. В контрольной пробе будет наблюдаться рост культуры микроорганизмов в виде равномерного помутнения среды.

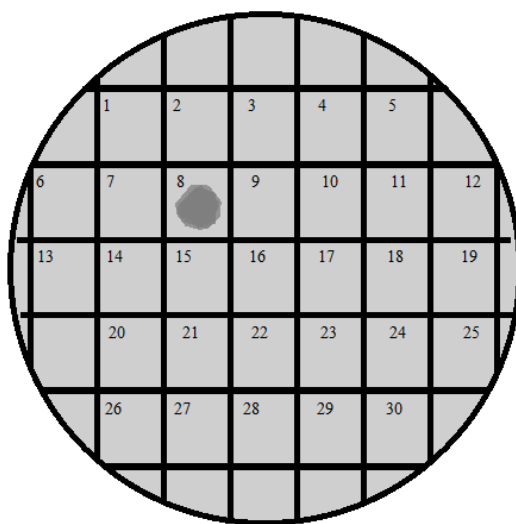
#### **Фаготипирование бактерий (метод Фишера)**

Фаготипирование позволяет проводить внутривидовую идентификацию бактерий. Помогает установить связи между отдельными случаями заболевания и выявлением источников инфекции, путей ее распространения.

Существуют различные схемы фагодиагностики для различных видов микроорганизмов.

Принцип метода: на питательную среду в чашке Петри «газоном» засеивается исследуемая культура микроорганизма. Затем чашку пере-

ворачивают и расчерчивают по секторам в соответствии с количеством используемых фагов. Каждый сектор подписывают номером фага. После чего на засеянную культуру в каждый сектор наносят каплю соответствующего типового фага. Инкубируют при температуре 37<sup>0</sup>С 5–6 часов. Фаготип культуры соответствует тому фагу, который вызывает ее лизис (рис. 35).



**Рис. 35.** Фаготипирование бактерий (метод Фишера). Фаготип исследуемой культуры – 8

### **Реакция нарастания титра фага**

Данный метод используется для определения патогенных бактерий непосредственно в исследуемом материале без выделения чистой культуры. В основе метода лежит способность бактериофага размножаться в гомологичной культуре бактерий. О наличии бактерий судят по нарастанию титра индикаторного фага.

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Общая характеристика и классификация вирусов.
2. Химический состав вирусов, их строение и типы симметрии.
3. Типы и этапы взаимодействия вирусов с чувствительной клеткой.
4. Методы культивирования вирусов. Типы клеточных культур. Методы индикации вирусов в культуре клеток.
5. Общая характеристика, классификация и строение бактериофагов.

6. Вирулентные и умеренные бактериофаги, особенности их взаимодействия с бактериальной клеткой. Лизогения и свойства лизогенных культур.
7. Практическое применение фагов в диагностике, лечении и профилактике инфекционных заболеваний.

### Практический блок

1. Изучение строения куриного эмбриона и основных способов заражения вирус-содержащим материалом.
2. Изучение основных принципов культивирования вирусов на клеточной культуре и ознакомление с демонстрационным набором питательных сред для культур клеток.
3. Микроскопия демонстрационных препаратов с целью изучения цитопатического действия вирусов.
4. Фаготипирование культуры стафилококка, выделенной от носителя. Демонстрация.
5. Изучение набора диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов.
6. Посев микрофлоры кожи пальцев рук на МПА методом отпечатков.

### Протокол практической работы студентов

#### Методы индикации вирусов в культуре ткани

| Препарат                                                                                                              | Метод окраски      | Рисунок |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------|
| 1. Интактная культура клеток куриного эмбриона.<br>2. Культура клеток куриного эмбриона, зараженного вирусом герпеса. |                    |         |
| Срез роговицы кролика, инфицированного вирусом оспы. Тельца Гварниери.                                                | Гематоксилин-эозин |         |
| Срез мозга собаки, инфицированной вирусом бешенства. Тельца Бабеша-Негри.                                             | По Муромцеву       |         |
| Образование симпластов при кори.                                                                                      | Азур-эозин         |         |

#### Фаготипирование культуры стафилококка

| Материал                                                  | Ход работы                                                                 | Результат |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Чистая культура <i>S. aureus</i> , выделенная от носителя | Определение фаготипа культуры при помощи стандартного набора типовых фагов |           |

## Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФОРМОЙ ВИРУСА НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) капсид
- 2) профаг
- 3) вирион
- 4) элементарное тельце

2. РАЗМЕР ВИРУСНОЙ ЧАСТИЦЫ ИЗМЕРЯЕТСЯ В

- 1) мкм
- 2) нм
- 3) кДа
- 4) см

3. ВИРУСЫ ОТНОСЯТСЯ К ЦАРСТВУ

- 1) Fungi
- 2) Animalia
- 3) Protista
- 4) Vira

4. БАКТЕРИОФАГИ – ЭТО

- 1) вирусы животных
- 2) вирусы человека
- 3) вирусы растений
- 4) вирусы бактерий

5. НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА ВИРУСА ВМЕСТЕ С КАПСИДОМ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) суперкапсид
- 2) пеплос
- 3) нуклеокапсид
- 4) капсомер

6. СКОЛЬКО СУЩЕСТВУЕТ ТИПОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА С ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ?

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

7. ЛУЧШЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЯВЛЯЕТСЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В
- 1) лабораторных животных
  - 2) куриных эмбрионах
  - 3) органах
  - 4) культуре клеток
8. СКОПЛЕНИЯ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ИЛИ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИРУСОВ В ЦИТОПЛАЗМЕ ИЛИ ЯДРЕ КЛЕТОК, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПОД МИКРОСКОПОМ ПРИ СПЕЦИАЛЬНОМ ОКРАШИВАНИИ, НАЗЫВАЮТСЯ
- 1) вирусные гранулы
  - 2) вирусные частицы
  - 3) вирусные включения
  - 4) вирусные бляшки
9. ТИП ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГА С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ, КОТОРЫЙ ЗАВЕРШАЕТСЯ ОБРАЗОВАНИЕМ ВИРИОНОВ И ГИБЕЛЬЮ КЛЕТКИ, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) интегративный
  - 2) абортивный
  - 3) продуктивный
  - 4) нет правильного ответа
10. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УМЕРЕННОГО ФАГА С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) фаговая конверсия
  - 2) лизогения
  - 3) адсорбция
  - 4) бактериофагия

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** В культуре клеток Нер – 2 на пятый день после введения вируса обнаружены морфологические изменения клеток и отторжение их от стекла.

1. Назвать данный феномен.
2. Охарактеризовать подобные изменения клеток.
3. Перечислить, какие способы индикации вирусов можно применить, используя культуру клеток.

**Задача 2.** Студенты в атласе по вирусологии увидели две модели строения вирусной частицы, которые отличались друг от друга характером расположения белковых субъединиц, защищающих нуклеиновую кислоту вируса.

- 1. Назвать такие белковые субъединицы.*
- 2. Перечислить, как они могут располагаться у вирусов.*
- 3. Описать, какую вирусную структуру они образуют.*

**Задача 3.** В результате проведенной электронной микроскопии были обнаружены вирусы, имеющие форму сперматозоида, достигающие длины до 200 нм, имеющие головку и хвостовой отросток.

- 1. Назвать такие вирусы.*
- 2. Определить, что говорит их присутствие в исследуемом материале.*
- 3. Назвать основные этапы их взаимодействия с бактериальной клеткой.*

**Задача 4.** Бактериологами была определена схема взаимодействия выделенного фага с бактериями, в результате которой происходила лизогенизация бактерий.

- 1. Назвать фаги, вызывающие лизогению бактерий.*
- 2. Перечислить свойства лизогенных культур.*
- 3. Охарактеризовать фаговую конверсию.*

**Задача 5.** В бактериологической лаборатории поставили опыт с целью определения фаготипа выделенной чистой культуры золотистого стафилококка.

- 1. Описать, как проводится фаготипирование культуры бактерий.*
- 2. Назвать, с какой целью определяют фаготип выделенной культуры.*
- 3. Назвать фаги, вызывающие лизис бактерий.*

## **ЗАНЯТИЕ № 10. Экологическая микробиология.**

### **Санитарно-бактериологическое исследование почвы, воды, воздуха. Микрофлора тела человека**

**Цель занятия:** выработать понятие о предмете и задачах санитарной микробиологии, изучить состав микрофлоры воды, воздуха, почвы и ее значение для медицинской микробиологии; изучить основные санитарно-бактериологические показатели почвы, воды и воздуха и методы их определения; изучить состав и значение нормальной микрофлоры организма человека, причины развития дисбактериоза и методы коррекции.

#### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры объектов окружающей среды.
3. Знакомство с методами исследования объектов окружающей среды, нормативными документами.
4. Изучение микрофлоры тела человека и ее значения.
5. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

#### **Информационный блок**

##### **САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ**

##### **Определение микробного числа почвы**

Пробы почвы берут на глубине 10–15 см и готовят навеску 30 г, которую вносят в колбу с 270 мл воды, встряхивают и готовят разведения почвенной суспензии от 1:10 до 1:1 000 000. Из двух последних разведений берут по 0,1 мл и смешивают с 40 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45<sup>0</sup>С агара, после чего выливают в чашку Петри. Через 72 ч подсчитывают количество колоний на 1 г почвы с учетом разведений.

### Определение коли-титра почвы

Различные разведения почвенной суспензии заливают по 1 мл в пробирки со средой Кесслера и инкубируют при 43<sup>0</sup>С в течение 48 ч, затем учитывают помутнение проб и наличие газа в поплавке.

### Определение перфрингенс-титра почвы

Различные разведения почвенной суспензии засевают по 1 мл в 9–10 мл расплавленной среды Вильсон-Блера, которую набирают в стеклянные трубочки, концы которых заливают парафином. Посевы инкубируют при 43<sup>0</sup>С 48 ч, после чего учитывают результат по образованию черных колоний.

Таблица 5

Оценка фекального загрязнения почвы

| Характеристика почвы  | Коли-титр    | Перфрингенс-титр |
|-----------------------|--------------|------------------|
| Чистая                | Выше 1       | Выше 0,1         |
| Слабо загрязненная    | 1 – 0,01     | 0,01 – 0,001     |
| Умеренно загрязненная | 0,01 – 0,001 | 0,001 – 0,0001   |
| Сильно загрязненная   | Ниже 0,001   | Ниже 0,0001      |

## САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА

### Посев воздуха седиментационным методом

Седиментационный метод основан на оседании бактерий под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытых чашек Петри. Чашки Петри с МПА открывают и ставят в разные точки отбора на горизонтальную поверхность. Для определения общей микробной обсемененности воздуха чашки оставляют открытыми на 5–10–15 минут в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Для выявления санитарно-показательных микроорганизмов экспозиция чашек с селективными средами увеличивается до 30–60 минут. Инкубацию посевов проводят при 37<sup>0</sup>С 24 ч, затем при комнатной температуре 48 ч для образования пигмента пигментобразующими бактериями.

Для определения микробного числа подсчитывают колонии, выросшие на чашках, и используют правило В.Л. Омелянского: на поверхность площадью 100 см<sup>2</sup> за 5 минут оседает такое количество микроорганизмов, которое содержится в 10 л воздуха. Расчет проводят по формуле:

$$X=(A \times 100 \times 100) \div 75,$$

где  $X$  – количество микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$ ;  $A$  – количество колоний на агаре в чашке;  $75 \text{ см}^2$  – площадь чашки Петри.

### Посев воздуха аспирационным методом

Аспирационный метод основан на принудительном осаждении микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды. Для этой цели используют специальные приборы: аппарат Кротова, бактериоуловитель Речменского, прибор ПОВ-1 и др.

Для определения общего микробного числа забирают две пробы по 100 л каждая. Посевы инкубируют в термостате 24 ч, а затем оставляют на 48 ч при комнатной температуре. Подсчитывают количество колоний на чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

Таблица 6

Критерии оценки воздуха жилых помещений

| Оценка воздуха | Общее количество бактерий в $1 \text{ м}^3$ воздуха | Количество стрептококков |
|----------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Лето:</b>   |                                                     |                          |
| Чистый         | До 1500                                             | До 16                    |
| Загрязненный   | До 2500                                             | До 36                    |
| <b>Зима:</b>   |                                                     |                          |
| Чистый         | До 4500                                             | До 36                    |
| Загрязненный   | До 7000                                             | До 124                   |

## САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ

### Определение общего микробного числа (ОМЧ)

Для определения ОМЧ вносят два объема воды по 1 мл в стерильные чашки Петри, в которые выливают по 6–8 мл расплавленного и остуженного до  $45^{\circ}\text{C}$  МПА. Содержимое чашки смешивают, оставляют до застывания агара и помещают в термостат на 24 ч. Подсчитывают количество колоний на чашках, вычисляют среднее арифметическое. Результат выражают числом КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1 мл воды.

### Определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, но они способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре  $44^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

Для выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий используют два метода: 1) метод мембранных фильтров, 2) титрационный метод.

Метод мембранных фильтров. Необходимый объем воды – 300 мл – фильтруют через мембранные фильтры по 100 мл. Фильтры переносят в чашки Петри со средой Эндо и инкубируют при 37<sup>0</sup>С 24 ч. Подсчитывают число красных и красных с металлическим блеском колоний.

Идентификацию бактерий проводят по оксидазному тесту и тесту образования кислоты и газа при ферментации лактозы (маннита), для чего исследуют не менее 10 колоний.

Так как микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантные колиформные бактерии не обладают оксидазной активностью, то оксидазоположительные культуры дальше не исследуются.

Все лактозоположительные колонии засевают в две пробирки с одной из лактозных сред и одну пробирку инкубируют при 37<sup>0</sup>С (для культивирования микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*), а другую – при 44<sup>0</sup>С (для культивирования термотолерантных колиформных бактерий).

Учитывают бактерии семейства *Enterobacteriaceae* – показатели давнего фекального загрязнения воды и термотолерантные колиформные бактерии – показатели свежего фекального загрязнения.

Результаты анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий в 100 мл воды.

Титрационный метод. Принцип метода заключается в посеве установленного объема воды (300 мл – 3 объема по 100 мл – качественный анализ и 333 мл – 3 объема по 100 мл, 3 объема по 10 мл, 3 объема по 1 мл – количественный анализ) в лактозо-пептонную (или глюкозо-пептонную) среду с последующим пересевом в среду Эндо и идентификацией культуры по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам для определения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Для выявления термотолерантных колиформных бактерий делают посев 2–3 изолированных колоний в пробирки с лактозной средой, нагретой на водяной бане или в термостате до 44<sup>0</sup>С.

При обнаружении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий хотя бы в одном из трех объемов делают заключение об обнаружении колиформных бактерий в 100 мл воды.

### **Определение спор сульфитредуцирующих бактерий**

Сульфитредуцирующие клостридии, преимущественно *C. perfringens*, – спорообразующие анаэробные палочки, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при 44<sup>0</sup>С в течение 24 ч.

Определение сульфитредуцирующих клостридий проводят двумя методами: 1) методом мембранных фильтров, 2) прямым посевом.

Метод мембранных фильтров. Метод основан на фильтровании воды через мембранные фильтры, выращивании посевов в железосульфитном агаре в анаэробных условиях и подсчете черных колоний. Результаты анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды.

Метод прямого посева. Производят посев 20 мл воды в пробирки с железо-сульфитным агаром (2 объема по 10 мл в 2 пробирки или 4 объема по 5 мл в 4 пробирки), инкубируют при 44<sup>0</sup>С 24 ч и подсчитывают черные колонии. Результаты выражают числом КОЕ в 20 мл воды.

### **Определение колифагов**

Колифаги – вирусы, лизирующие кишечную палочку и образующие зоны лизиса (бляшки) на бактериальном газоне. Определение колифагов проводят прямым и титрационным методами.

Прямой метод. Исследуемую воду вносят в 5 стерильных чашек по 20 мл. В 6-ю контрольную воду не берут. Затем во все чашки заливают расплавленный и остуженный до 45<sup>0</sup>С агар с добавлением суточной культуры *E. coli*, штамм К<sub>2</sub> (1,5 мл смыва *E. coli* в концентрации 10<sup>9</sup> на 150 мл агара). Перемешивают, оставляют для застывания и инкубируют при 37<sup>0</sup>С 24 ч.

Учитывают результат подсчетом бляшек в чашках Петри в БОЕ (бляшкообразующих единицах) в 100 мл воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

Титрационный метод. В основе метода – предварительное подращивание колифагов в среде обогащения в присутствии *E. coli* и последующее выявление бляшек колифага на газоне *E. coli*.

## Определение бактерий родов сальмонелла и шигелла

Для выявления патогенных энтеробактерий исследуемый объем воды (не менее 2–3 мл) засевают в среды обогащения (Мюллера-Кауфмана, магниевая среда) с последующим высевом на плотные селективные и дифференциально-диагностические среды – Плоскирева, Эндо, Левина, висмут-сульфитный агар. Выделенные культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, биохимическим и серологическим свойствам.

Таблица 7

### Определение коли-титра и коли-индекса воды титрационным методом

| 3 флакона или 3 пробирки |       |      | Коли-индекс | Коли-титр |
|--------------------------|-------|------|-------------|-----------|
| 100 мл                   | 10 мл | 1 мл |             |           |
| 0                        | 0     | 0    | Менее 3     | Более 333 |
| 0                        | 0     | 1    | 3           | 333       |
| 0                        | 1     | 0    | 3           | 333       |
| 1                        | 0     | 0    | 4           | 250       |
| 1                        | 0     | 1    | 7           | 143       |
| 1                        | 1     | 0    | 7           | 143       |
| 1                        | 1     | 1    | 11          | 91        |
| 1                        | 2     | 0    | 11          | 91        |
| 2                        | 0     | 0    | 9           | 111       |
| 2                        | 0     | 1    | 14          | 72        |
| 2                        | 1     | 0    | 15          | 67        |
| 2                        | 1     | 1    | 20          | 50        |
| 2                        | 2     | 0    | 21          | 48        |
| 2                        | 2     | 1    | 23          | 43        |
| 3                        | 0     | 0    | 23          | 43        |
| 3                        | 0     | 1    | 39          | 26        |
| 3                        | 0     | 2    | 64          | 16        |
| 3                        | 1     | 0    | 43          | 23        |
| 3                        | 1     | 1    | 75          | 13        |
| 3                        | 1     | 2    | 120         | 8         |
| 3                        | 2     | 0    | 93          | 11        |
| 3                        | 2     | 1    | 150         | 7         |
| 3                        | 2     | 2    | 210         | 5         |
| 3                        | 3     | 0    | 240         | 4         |
| 3                        | 3     | 1    | 460         | 2         |
| 3                        | 3     | 2    | 1100        | 0,9       |
| 3                        | 3     | 3    | Более 1100  | Менее 0,9 |

**Нормативы качества питьевой воды**

| Показатели                                      | Единицы измерения                     | Нормативы   |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| 1. Общее микробное число                        | КОЕ в 1 мл воды                       | Не более 50 |
| 2. Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> | Число кишечных бактерий в 300 мл воды | Отсутствие  |
| 3. Термотолерантные колиформные бактерии        | Число кишечных бактерий в 300 мл воды | Отсутствие  |
| 4. Споры сульфитредуцирующих клостридий         | Число спор в 20 мл воды               | Отсутствие  |
| 5. Колифаги                                     | Число БОЕ в 100 мл воды               | Отсутствие  |

Примечание: КОЕ – колониеобразующая единица; БОЕ – бляшкообразующая единица

**Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Санитарная микробиология. Предмет, задачи. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.
2. Микрофлора воды. Методы санитарно-бактериологического исследования воды. Требования, предъявляемые к питьевой воде по ГОСТ.
3. Микрофлора почвы. Методы санитарно-бактериологического контроля.
4. Микрофлора воздуха. Методы санитарно-бактериологического исследования воздуха.
5. Микрофлора тела человека и ее значение для организма. Дисбактериоз.
6. Особенности микрофлоры организма новорожденных и детей раннего возраста.

**Практический блок**

1. Учет результатов посева водопроводной и сточной воды для определения общего микробного числа, бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий (титрационный метод и метод мембранных фильтров).
2. Учет результатов посева воздуха для определения общей бактериальной загрязненности седиментационным и аспирационным методами.
3. Учет результатов посева проб почвы для определения общей бактериальной загрязненности, коли-титра и перфрингенс-титра.

4. Изучение микрофлоры кожи пальцев рук. Приготовление мазков из выросших колоний и их окраска по Граму.
5. Изучить набор препаратов для коррекции дисбактериоза.

### **Методика учета результатов посева водопроводной и сточной воды**

Учет результатов посева водопроводной и сточной воды с целью определения общей микробной обсемененности, бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий (титрационный метод и метод мембранных фильтров).

Общее микробное число определяют путем подсчета колоний, выросших на чашке, учитывая объем засеянной воды.

Наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом определяют по наличию газа в поплавках в каждом засеянном объеме воды (333 мл – 3 объема по 100 мл, 3 объема по 10 мл, 3 объема по 1 мл). Количество флаконов, где обнаружен газ, находят по таблице 7 и находят соответствующее значение коли-титра и коли-индекса.

Наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранных фильтров оценивают по наличию малиновых колоний с металлическим блеском.

### **Методика учета результатов посева воздуха**

Учет результатов посева воздуха седиментационным и аспирационным методами с целью определения микробной обсемененности.

В чашках с посевами воздуха по Коху (седиментационный метод) подсчитывают количество выросших колоний, получившееся значение подставляют в формулу:

$$X = (A \times 100 \times 100) \div 75,$$

где X – количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup>; A – количество колоний на агаре в чашке; 75 см<sup>2</sup> – площадь чашки Петри.

В чашках с посевом 100 л воздуха по Кротову (аспирационный метод) подсчитывают количество выросших колоний и получившееся число умножают на 10, пересчитывая таким образом количество микроорганизмов на 1000 л воздуха.

### **Методика учета результатов посева проб почвы**

Учет результатов посева проб почвы с целью определения общей микробной обсемененности и фекального загрязнения (коли-титра, перфрингенс-титра).

Коли-титр определяют по последнему разведению почвы, при котором на среде Кесслера обнаруживаются пузырьки газа в поплавках. Перфрингенс-титр определяют по последнему разведению почвы, при котором обнаруживаются черные колонии на среде с железосульфитным агаром. Используя таблицу 5, оценивают степень загрязнения почвы.

### **Методика приготовления мазков из зубного налета**

Стерильной зубочисткой собирают зубной налет и, смешивая его с каплей колларгола, на предметном стекле готовят мазок как мазок крови, высушивают, микроскопируют. Результат оформляют в виде рисунка.

### **Методика изучения микрофлоры кожи пальцев рук**

Из колоний, выросших при посеве отпечатков кожи пальцев рук на МПА, готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, зарисовывают.

### **Протокол практической работы студентов**

#### **Санитарно-бактериологическое исследование водопроводной воды**

| Материал           | Ход работы                                                                                                                                                                                                         | Результат |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Водопроводная вода | Определение общего микробного числа водопроводной воды.<br>Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae методом мембранных фильтров.<br>Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae бродильным методом. |           |

Заключение:

#### **Санитарно-бактериологическое исследование сточной воды**

| Материал         | Ход работы                                                                                                                                                                                                   | Результат |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Вода реки Ушайки | Определение общего микробного числа сточной воды.<br>Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae методом мембранных фильтров.<br>Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae бродильным методом. |           |

Заключение:

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха

| Материал               | Ход работы                                                                                                                                                                   | Результат |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Воздух учебной комнаты | Определение общего микробного числа воздуха седиментационным методом Коха.<br>Определение общего микробного числа воздуха аспирационным методом при помощи аппарата Кротова. |           |

Заключение:

Санитарно-бактериологическое исследование почвы

| Материал | Ход работы                                                                                                                                                                          | Результат |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Почва    | Определение общего микробного числа почвы.<br>Определение коли-титра почвы на среде Кесслера.<br>Определение перфрингенс-титра почвы методом Виньяля-Вейона на среде Вильсон-Блера. |           |

Заключение:

Изучение микрофлоры кожи пальцев рук и полости рта

| Материал                                                                  | Ход работы                                                                                                              | Результат |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Колонии, выросшие при посеве кожи пальцев рук на МПА.<br>Зубной налет. | Приготовление мазков и их окраска по Граму, микроскопия.<br><br>Приготовление мазка и окраска колларголом, микроскопия. |           |

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. ОБЩЕЕ МИКРОБНОЕ ЧИСЛО ПОЧВЫ – ЭТО

- 1) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 2) минимальное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 3) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 кг почвы
- 4) количество жизнеспособных кишечных палочек в 1 г почвы

2. КОЛИ-ИНДЕКС – ЭТО

- 1) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 2) минимальное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 3) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 кг почвы

4) количество жизнеспособных кишечных палочек в 1 г почвы

3. ПЕРФРИНГЕНС-ТИТР – ЭТО

- 1) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 2) минимальное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
- 3) наименьшее количество почвы (г), в котором обнаруживается жизнеспособная клетка *C. perfringens*
- 4) количество жизнеспособных *C. perfringens* в 1 г почвы

4. МИКРОФЛОРА, ПРЕДСТАВЛЕННАЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ПОСТОЯННО ЖИВУЩИМИ И РАЗМНОЖАЮЩИМИСЯ В ВОДЕ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) аллохтонная
- 2) патогенная
- 3) автохтонная
- 4) условно-патогенная

5. ДЛЯ ОЦЕНКИ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

- 1) ОМЧ
- 2) коли-титр
- 3) перфрингенс-титр
- 4) все вышеперечисленные показатели

6. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ ВОЗДУХА, ОСНОВАННЫЙ НА ОСЕДАНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ И КАПЕЛЬ ПОД ВЛИЯНИЕМ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) аспирационный
- 2) седиментационный
- 3) титрационный
- 4) метод мембранных фильтров

7. МИКРОФЛОРА, МАКСИМАЛЬНО ПРИСПОСОБИВШАЯСЯ К СУЩЕСТВОВАНИЮ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) облигатная
- 2) транзиторная
- 3) факультативная
- 4) нет верного ответа

8. МИКРОФЛОРА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРЕДСТАВЛЕНА

- 1) сарцинами, стафилококками
- 2) кишечной палочкой, стафилококками
- 3) грибами, кишечной палочкой
- 4) стрептококками, кишечной палочкой

9. ОСНОВНАЯ МАССА МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЛОСТИ РТА  
ЛОКАЛИЗУЕТСЯ

- 1) у шейки зуба
- 2) в промежутках между зубами
- 3) в зубном налете
- 4) в слюне

10. НАРУШЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА НАЗЫ-  
ВАЕТСЯ

- 1) биоценоз
- 2) дисбиоз
- 3) анабиоз
- 4) энтеробиоз

**Ситуационные задачи**

**Задача 1.** При строительстве спортивной площадки были взяты пробы почвы, в которых было обнаружено большое количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

1. *Предположить, на что указывает высокий титр БГКП в почве.*
2. *Объяснить, на какой площади и глубине отбираются образцы почвы.*

**Задача 2.** На дачном участке была пробурена скважина для за-  
бора воды для хозяйственно-питьевого водоснабжения.

1. *Перечислить показатели, которые необходимо определить для оценки качества воды.*
2. *Назвать методы, применяемые для исследования питьевой воды.*
3. *Перечислить нормативные документы.*

**Задача 3.** В операционном отделении до начала работы были взя-  
ты пробы воздуха, и было обнаружено в 1 м<sup>3</sup> присутствие стафи-

лококков в количестве 16, стрептококков – 24, микробное число составляло 1500.

- 1. Определить, допустимо ли нахождение такой концентрации микроорганизмов в операционном блоке.*
- 2. Назвать, какие существуют критерии оценки воздуха в лечебно-профилактическом учреждении.*

**Задача 4.** В процессе длительного лечения больного антибиотиками была нарушена нормальная микрофлора кишечника, что вызвало ряд болезненных симптомов. При бактериологическом анализе испражнений больного было подтверждено нарушение нормальной микрофлоры кишечника и было назначено лечение.

- 1. Назвать состояние больного.*
- 2. Перечислить возможные причины его возникновения.*
- 3. Назвать препараты, применяемые для восстановления нормальной микрофлоры кишечника.*

**Задача 5.** При бактериологическом анализе крови больного человека был обнаружен стафилококк.

- 1. Предположить, может ли у здорового человека в крови циркулировать этот микроорганизм.*
- 2. Назвать, какие органы и ткани в организме человека являются стерильными.*

## **ЗАНЯТИЕ № 11. Итоговое занятие по разделу «Физиология микроорганизмов»**

**Цель занятия:** промежуточный контроль знаний студентов по теме «Физиология микроорганизмов».

### **Вопросы для итогового контроля:**

1. Механизмы питания и классификация бактерий по типам питания.
2. Транспорт метаболитов у бактерий: пассивная и облегченная диффузия, активный транспорт. Вещества и условия, необходимые для роста микробной популяции. Понятие о прототрофах и ауксотрофах.
3. Дыхание бактерий. Типы дыхания в зависимости от донора и акцептора электрона. Защита микроорганизмов от токсических производных молекулярного кислорода.
4. Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Простые, сложные, элективные, дифференциально-диагностические, синтетические, консервирующие среды. Требования к питательным средам.
5. Техники посева бактерий на жидкие и плотные питательные среды. Условия культивирования бактерий. Аппаратура для культивирования микроорганизмов.
6. Культуральные свойства бактерий. Характеристика колоний. Пигменты бактерий.
7. Рост и размножение бактерий. Фазы размножения бактерий в замкнутой среде (периодическая культура). Непрерывное культивирование.
8. Методы выделения чистой культуры и идентификация аэробных бактерий.
9. Методы культивирования и идентификация анаэробов. Выделение чистой культуры анаэробных бактерий.
10. Методы промышленного культивирования бактерий.
11. Международная классификация и характеристика ферментов микроорганизмов.
12. Роль ферментов в идентификации бактерий. Методы определения гликолитических и протеолитических ферментов бактерий. Дифференциально-диагностические среды (моносубстратные и полисубстратные).
13. Механизмы действия физических факторов на микроорганизмы (температура, давление, высушивание, свет, ультразвук, радиация).

14. Методы стерилизации материала. Аппаратуры для стерилизации материалов (сухожаровые шкафы, автоклавы, стерилизаторы, фильтры). Контроль режима стерилизации (микробиологический метод, физический метод).
15. Механизмы действия химических факторов на микробов. Дезинфекция и дезинфицирующие вещества.
16. Химиотерапевтические вещества. Химиотерапевтический индекс.
17. Влияние биологических факторов на микроорганизмы. Виды взаимодействия между микроорганизмами. Бактериоциногения.
18. Микробный антагонизм. Антибиотики, единицы действия и способы получения.
19. Классификации антибиотиков по биологическому происхождению, по спектру биологического действия, по химическому строению.
20. Механизмы действия различных групп антибиотиков.
21. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам методами разведений и дисков.
22. Механизмы возникновения антибиотикорезистентности бактерий и пути их преодоления. Принципы рационального применения антибиотиков.
23. Классификация, морфология, химический состав и ультраструктура вирусов.
24. Типы вирусных нуклеиновых кислот и их репликация.
25. Продуктивная вирусная инфекция. Этапы взаимодействия вирусов с чувствительной клеткой.
26. Интегративная вирусная инфекция. Вирогения. Вирусная трансформация.
27. Виды лабораторных животных, способы их заражения. Этика экспериментальных исследований. Культивирование и индикация вирусов в организме лабораторных животных.
28. Строение куриного эмбриона и методы его заражения. Культивирование и индикация вирусов в курином эмбрионе.
29. Тканевые культуры: методы получения, классификация. Культивирование и индикация вирусов в тканевых культурах.
30. Классификация, строение и химический состав бактериофагов.
31. Процесс взаимодействия вирулентных фагов и чувствительной к ним бактериальной клетки.

32. Понятие об умеренных бактериофагах. Лизогения и фаговая конверсия.
33. Методы обнаружения бактериофагов: метод Аппельмана, метод Грациа. Фаготипирование бактерий.
34. Практическое применение фагов для диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Принцип получения препаратов-бактериофагов.
35. Санитарная микробиология. Методы и задачи. Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах.
36. Микрофлора воды. Методы санитарно-бактериологического контроля. Кишечная палочка как показатель фекального загрязнения воды. Нормативы питьевой воды.
37. Микрофлора воздуха. Методы санитарно-бактериологического контроля. Нормативы.
38. Микрофлора почвы. Методы санитарно-бактериологического контроля. Нормативы.
39. Микробиология пищевых продуктов. Санитарно-бактериологические требования к пищевым продуктам.
40. Микрофлора человека и ее значение для организма. Биотопы. Понятие об аутохтонных, аллохтонных, резидентных и транзиторных микроорганизмах. Методы определения микрофлоры кожи пальцев рук, зубного налета, зева.
41. Особенности микрофлоры организма новорожденных и детей раннего возраста.
42. Дисбактериоз, причины его возникновения, диагностика и методы коррекции.
43. Генетическая система бактерий. Генофор, плазмиды, транспозоны.
44. Понятие об опероне. Позитивная и негативная регуляция генетической информации у бактерий.
45. Перенос генетического материала бактерий. Конъюгация, трансдукция и трансформация. Механизм и практическое значение.
46. Генетическая изменчивость бактерий. Мутации, их значение. Репарация ДНК.
47. Фенотипическая изменчивость бактерий. Значение для практической микробиологии.
48. Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний. ПЦР, ДНК и РНК зондирование.

## РАЗДЕЛ 3. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

### ЗАНЯТИЕ № 12. Взаимоотношение паразита и хозяина. Инфекция. Механизмы врожденного иммунитета

**Цель занятия:** изучить инфекционный процесс, его формы и стадии. Определить понятия «патогенность и вирулентность микроорганизмов». Изучить факторы патогенности микроорганизмов, механизмы врожденного иммунитета организма.

#### План занятия

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучить формы и стадии инфекционного процесса.
3. Определить понятия «патогенность» и «вирулентность», изучить факторы патогенности.
4. Познакомиться с экспериментальным инфекционным процессом и этикой его проведения.
5. Изучить гуморальные и клеточные факторы врожденного иммунитета.
6. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

#### Информационный блок

#### Инфекционный процесс

**Инфекция** – процесс взаимодействия между микроорганизмом и макроорганизмом, протекающий в конкретных условиях внешней и социальной среды.

**Инфекционный процесс** – совокупность физиологических и патологических реакций, развивающихся в макроорганизме в процессе инфекции.

**Инфекционное заболевание** – одна из форм инфекционного процесса.

Развитие инфекции обусловлено несколькими факторами: состоянием защитных сил организма, свойствами возбудителя заболевания и его инфицирующей дозой, условиями внешней среды, механизмами, путями передачи и входными воротами инфекции.

В зависимости от свойств возбудителя, его локализации в макроорганизме, путей распространения различают **формы инфекции**: эн-

догенные и экзогенные, очаговые и генерализованные, вторичные и смешанные (микст), типичные и атипичные, персистирующие и медленные, реинфекции, суперинфекции, аутоинфекции, рецидивы, бактерионосительство и др.

Основными **источниками инфекции** могут быть:

- 1) больной человек, реконвалесцент, бактерионоситель;
- 2) животные.

**Входные ворота инфекции** – это место проникновения возбудителя в макроорганизм. Заражение человека происходит через поврежденную кожу, слизистые оболочки пищеварительного и дыхательного путей, мочеполовую систему.

Таблица 9

**Механизмы и пути передачи возбудителя восприимчивому организму**

| Механизмы внедрения патогена            | Пути передачи                          | Входные ворота                                                                                |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Аспирационный                           | Воздушно-капельный<br>Воздушно-пылевой | Слизистая дыхательных путей                                                                   |
| Алиментарный                            | Водный<br>Пищевой                      | Вода<br>Продукты питания                                                                      |
| Фекально-оральный<br>(для антропонозов) | Контактно-бытовой                      | Предметы обихода                                                                              |
| Контактный                              | Прямой контакт<br>Половой              | Слизистые и кожа любой локализации                                                            |
|                                         | Непрямой контакт                       |                                                                                               |
| Трансмиссивный                          | Инокуляционный<br>Контаминационный     | Кровяное русло<br>Кожа                                                                        |
| Трансплацентарный                       | Вертикальный                           | Кровяное русло плода                                                                          |
| Искусственный                           | Парентеральный                         | Кровяное русло<br>Слизистые<br>Кожа любой локализации<br>Подкожная клетчатка<br>Ткань органов |

В зависимости от вида возбудителя и его свойств дальнейшее распространение по организму будет происходить лимфогенным, гематогенным или нейрогенным путем.

Отличительной особенностью инфекционного заболевания является циклическое течение со сменой периодов: инкубация, продрома, развитие, разгар, спад болезни, выздоровление (реконвалесценция).

**Патогенность** – это потенциальная способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс. Для патогенности характерна специфичность, то есть способность вызывать патоморфологические и патофизиологические изменения в определенных тканях и органах.

Количественным показателем патогенности является **вирулентность**, которая измеряется в условно принятых единицах – DLM (Dosis letalis minima) – минимальная смертельная доза микроорганизмов, которая вызывает гибель 95% восприимчивых лабораторных животных,  $DL_{50}$  вызывает гибель 50% зараженных животных, DcL – смертельная доза, вызывающая гибель всех животных.

По степени патогенности различают **патогенные и условно-патогенные** микроорганизмы. Патогенные микроорганизмы способны в большинстве случаев вызывать инфекционный процесс, а условно-патогенные – часто являются естественными обитателями организма человека, вызывают заболевания только при снижении иммунитета и достаточно большой инфицирующей дозе.

**К факторам патогенности** относят способность микроорганизмов прикрепляться к клеткам (адгезия), размещаться на их поверхности (колонизация), проникать в клетки (инвазия) и противостоять факторам защиты организма (агрессия).

Важную роль в развитии инфекционного процесса играют токсины. По биологическим свойствам бактериальные токсины делятся на **экзотоксины** и **эндотоксины**. Экзотоксины продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. По своей химической структуре это белки. Являются сильными антигенами, которые продуцируют образование в организме антитоксинов. Эндотоксины по химической природе являются липополисахаридами, содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Эндотоксины не обладают специфичностью, термостабильны, менее токсичны, обладают слабой иммуногенностью.

### **Врожденный иммунитет организма**

Попадание в макроорганизм возбудителя заболевания включает цепь защитно-приспособительных реакций, направленных в конечном итоге на устранение микроорганизма и восстановление структуры органов и систем организма.

Сопrotивляемость организма зависит от непроницаемости нормальных кожных и слизистых покровов для большинства микроорганизмов, наличия бактерицидных субстанций в кожных секретах, кислотности содержимого желудка, присутствия в крови и других жидкостях организма (слюна, слеза и др.) таких ферментных систем, как лизоцим, пропердин и др., от количества и активности фагоцитов крови и тканей.

Все эти факторы являются неспецифическими, генетически детерминированными и делятся на клеточные (кожа, слизистые, лимфатические узлы, воспаление, фагоцитоз) и гуморальные ( $\beta$ -лизины, лизоцим, комплемент, пропердин).

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Формы инфекционного процесса и их характеристика.
2. Понятие о патогенности микроорганизмов. Вирулентность. Факторы патогенности.
3. Экспериментальная инфекция. Цели и способы заражения животных. Этика экспериментальных исследований.
4. Понятие о резистентности организма. Клеточные и гуморальные факторы.
5. Фагоцитоз. Кислородзависимые и кислороднезависимые механизмы бактерицидности. Методы изучения фагоцитарной активности клеток.
6. Гуморальные факторы неспецифической резистентности. Лизоцим, комплемент, интерферон, острофазные белки сыворотки крови. Пути активации комплемента.

### **Практическая работа студентов**

1. Изучение методов определения ферментов и факторов патогенности золотистого стафилококка.
2. Микроскопия мазков с картиной заверщенного и незаверщенного фагоцитоза.
3. Учет реакции определения лизоцима в слюне.
4. Изучение схемы путей активации комплемента.
- 5.

### **Протокол практической работы студентов**

Изучение факторов патогенности золотистого стафилококка

| Фактор патогенности | Ход работы                       | Результат |
|---------------------|----------------------------------|-----------|
| Лецитиназа          | Учет проявления действия лецити- |           |

|                 |                                                                       |                    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|
|                 | назы при посеве <i>S. aureus</i> на желточно-солевой агар.            |                    |
| Гиалуронидаза   | Учет действия гиалуронидазы <i>S. aureus</i> на гиалуроновую кислоту. | Контроль:<br>Опыт: |
| Плазмокоагулаза | Учет действия плазмокоагулазы <i>S. aureus</i> на плазму.             | Контроль:<br>Опыт: |

#### Изучение фагоцитоза в демонстрационных препаратах

| Исследуемый материал                             | Ход работы                                                                                                            | Рисунок |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Мазок из крови больного стафилококковым сепсисом | Микроскопия демонстрационного препарата, окрашенного по Романовскому-Гимзе, с целью изучения заверщенного фагоцитоза. |         |
| Мазок из гноя уретры больного гонореей           | Микроскопия демонстрационного препарата, окрашенного метиленовым синим, с целью изучения незавершенного фагоцитоза.   |         |

#### Определение лизоцима в слюне

| Исследуемый материал | Ход работы                                                                                   | Результат |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Слюна                | Учет реакции с культурой микроба с целью определения титра лизоцима в исследуемом материале. |           |

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

- ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ВЫЗЫВАТЬ ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС НАЗЫВАЕТСЯ
  - инфекционное заболевание
  - патогенность
  - вирулентность
  - экзоинфекция
- МИНИМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО МИКРОБНЫХ КЛЕТОК, СПОСОБНЫХ ВЫЗВАТЬ ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС, НАЗЫВАЕТСЯ
  - инфекционная доза
  - инфицирующая доза
  - минимальная инфицирующая доза
  - максимальная инфицирующая доза

3. ФОРМА ИНФЕКЦИИ, ПРИ КОТОРОЙ ВОЗБУДИТЕЛЬ НАХОДИТСЯ В МАКРООРГАНИЗМЕ И ВЫДЕЛЯЕТСЯ ПРИ ОТСУТСТВИИ КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ У ПАЦИЕНТА, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) носительство
  - 2) микст-инфекция
  - 3) сепсис
  - 4) локализованная
4. ФЕРМЕНТОМ ПАТОГЕННОСТИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМ БАКТЕРИЯМ ИНВАЗИЮ В ПОДЛЕЖАЩИЕ ТКАНИ, ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) гиалуронидаза
  - 2) гемолизин
  - 3) интерферон
  - 4) ДНКаза
5. ЭКЗОТОКСИНЫ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) белками
  - 2) углеводами
  - 3) липидами
  - 4) полисахаридами
6. ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЭНДОТОКСИНЫ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) белками
  - 2) липополисахаридами
  - 3) липидами
  - 4) полисахаридами
7. К КЛЕТОЧНЫМ ФАКТОРАМ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ОТНОСИТСЯ
- 1) лизоцим
  - 2) комплемент
  - 3) фагоцитоз
  - 4) интерферон

8. К ГУМОРАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ОТНОСИТСЯ

- 1) комплемент
- 2) фагоцитоз
- 3) воспалительная реакция
- 4) NK

9. В АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССОВ

- 1) A и E
- 2) M и G
- 3) G и E
- 4) D и G

10. АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА ПО КЛАССИЧЕСКОМУ ПУТИ ИНДУЦИРУЕТ

- 1) антиген
- 2) антитело
- 3) микроорганизм
- 4) комплекс антиген-антитело

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** Резервуаром туляремии в природе наряду с мышевидными грызунами, ондатрами, зайцами, насекомоядными являются и кровососущие насекомые (клещи, особенно иксодовые; комары, слепни). Человек инфицируется при непосредственном контакте с больными животными, их выделениями, через зараженную воду, пищевые продукты и через укусы инфицированных кровососущих насекомых или при вдыхании контаминированного воздушно-пылевого аэрозоля.

*1. Назвать все возможные пути передачи туляремии.*

**Задача 2.** При Императорском Томском университете в начале прошлого века Павлом Васильевичем Бутягиным было налажено производство противодифтерийной сыворотки. С этой целью лошадям вводили обезвреженный дифтерийный экзотоксин.

*1. Перечислить свойства экзотоксинов: какова их химическая природа, на какие группы по степени связи с бактериальной клеткой они делятся, как классифицируются по механизму действия.*

2. *Обосновать использование экзотоксинов для профилактики инфекционных заболеваний.*

**Задача 3.** В эпидемическом очаге сибирской язвы, в мазках, приготовленных из клинического материала от пациента, обнаружены крупные грамположительные палочки, вокруг которых оставалась неокрашенная зона. В мазках, изготовленных из культур с искусственных питательных сред, в центре палочки можно было увидеть неокрашенный участок овальной формы. Кроме того, исследователи установили, что микроорганизмы продуцируют экзотоксин, вызывающий отек и некроз тканей.

1. *Назвать факторы вирулентности этого микроорганизма, их биологическое назначение.*
2. *Перечислить факторы вирулентности, которые Вам известны.*

**Задача 4.** Студент, пропускавший занятия по микробиологии, вынужден был просидеть всю ночь перед зачетом над учебником. Под утро он уснул, и ему приснились микробы, которые обсуждали между собой различные способы выживания внутри фагоцитов. Проснувшись, он не мог вспомнить, что это за микроорганизмы, сохраняющие жизнеспособность внутри фагоцитов, и какими механизмами они обладают для выживания.

1. *Назвать механизмы, обеспечивающие бактерицидность фагоцитов.*
2. *Перечислить функции, которые выполняют макрофаги.*

**Задача 5.** Профессор кафедры гигиены Томского университета Павел Николаевич Лащенко на основании экспериментальных исследований установил бактерицидное действие куриного белка, обусловленное наличием в последнем особого вещества животного происхождения – лизоцима (многие авторы считают, что именно П.Н. Лащенко, а не английскому ученому А. Флемингу, принадлежит приоритет этого открытия). Некоторое время спустя лизоцим был обнаружен в тканях различных животных.

1. *Описать данное вещество, его химическую природу, и в чем заключается механизм действия.*
2. *Перечислить ткани и среды организма, в которых содержится наибольшее количество этого вещества.*

## **ЗАНЯТИЕ № 13. Иммуитет и его проявления. Серологические реакции**

**Цель занятия:** изучить пути формирования естественного и искусственного иммунитета, строение, классификацию и функции иммуноглобулинов, строение и свойства антигенов, антигенную структуру бактерий.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение пути формирования естественного и искусственного иммунитета.
3. Изучение строения и свойств антигенов, антигенной структуры бактерий, классификации и функций иммуноглобулинов.
4. Формирование понятия о серологических реакциях.
5. Изучение принципа постановки реакций агглютинации, преципитации и непрямой гемагглютинации.
6. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### **Информационный блок**

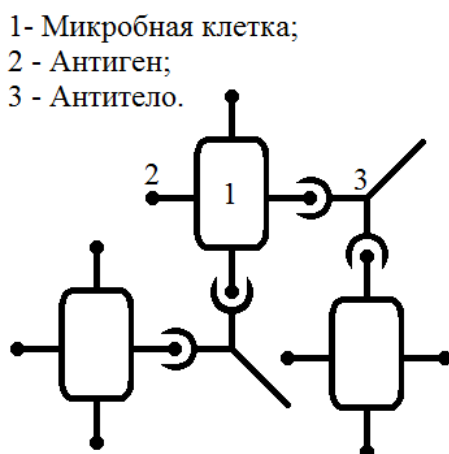
Серологические реакции – это реакции, протекающие между антигеном и антителом «*in vitro*» в электролитной среде. Серологические реакции используют в диагностике инфекционных заболеваний, так как они позволяют обнаружить наличие антител (в сыворотке крови пациента) к антигенам возбудителя, антигенов возбудителя в исследуемом материале, а также определить антигенную структуру микроорганизма (то есть идентифицировать возбудителя).

Для постановки серологических реакций, направленных на выявление антител к возбудителю, необходимы диагностические препараты «диагностикумы» – препараты, содержащие антигены определенного микроорганизма. Если серологическую реакцию проводят с целью обнаружения антигенов возбудителя, то необходимо иметь препараты, содержащие антитела к этим антигенам – «диагностические сыворотки».

Все серологические реакции условно можно разделить на три группы:

1. Прямые, при которых образующиеся комплексы антиген-антитело видны невооруженным глазом. К ним относят реакции агглютинации (РА) и реакции преципитации (РП).
2. Опосредованные (не прямые), в таких реакциях образование комплексов антиген-антитело определяют с помощью эритроцитов. Примером такой реакции является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).
3. Реакции, в которых для обнаружения комплексов антиген-антитело используют меченые антитела (антигены). В качестве метки могут выступать флуоресцентные красители, ферменты или радиоактивный изотоп.

**Реакция агглютинации (РА)** протекает, когда антиген находится в *корпускулярном* состоянии. Реакция протекает в две фазы. В первую фазу (специфическую) образуется комплекс антиген-антитело, во вторую фазу (неспецифическую) этот комплекс выпадает в осадок – агглютинат (рис. 36). В зависимости от антигена, участвующего в реакции, характер агглютината различается, так, О-антигены обуславливают образование мелкозернистого осадка, Н-антигены – хлопьевидного, а К-антигены – тяжистого.



**Рис. 36.** Схема образования агглютината (склеивание микроорганизмов под действием специфических антител)

Существуют два варианта постановки РА:

1. Пластинчатый (на предметном стекле), носит качественный характер, используют для определения антигенов исследуемого микроорганизма (рис. 37). Результат реакции оценивают по интенсивности агглютинации в «+».

2. Пробирочный (развернутый), применяют для определения количества антител в сыворотке больного (рис. 38). Сыворотку больного последовательно разводят в ряде пробирок. Последнее разведение сыворотки, при котором определяется четкая агглютинация, соответствует титру антител.



Рис. 37. Схема пластинчатой РА

**Реакция преципитации (РП)** протекает, когда антиген находится в *мелкодисперсном* состоянии. Механизм РП заключается в формировании и осаждении комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом* (от лат. *praecipito* – осаждать). Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. (рис. 39).

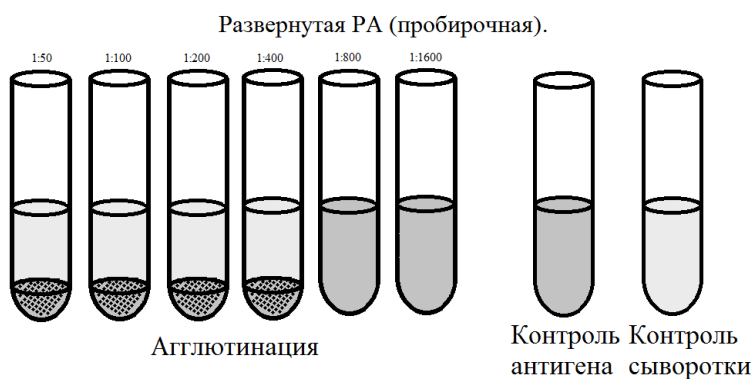
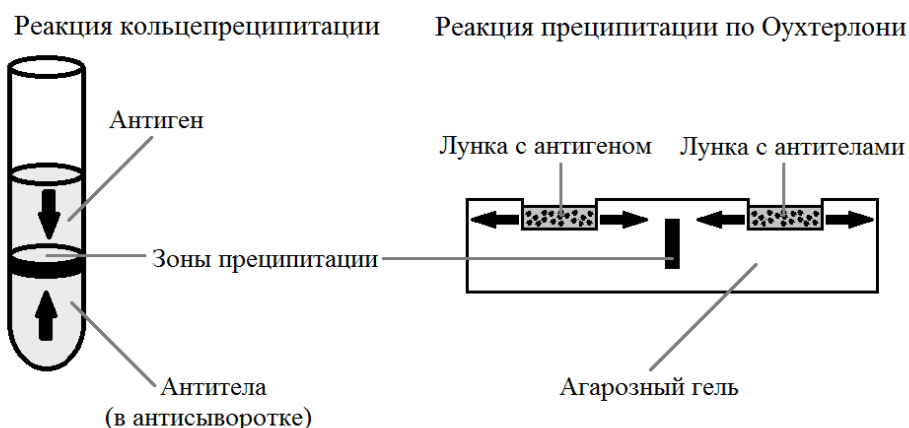


Рис. 38. Схема пробирочной (развернутой) РА

**Реакция кольцепреципитации.** Реакцию проводят в узких преципитационных пробирках: на иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное *кольцо преципитата*.

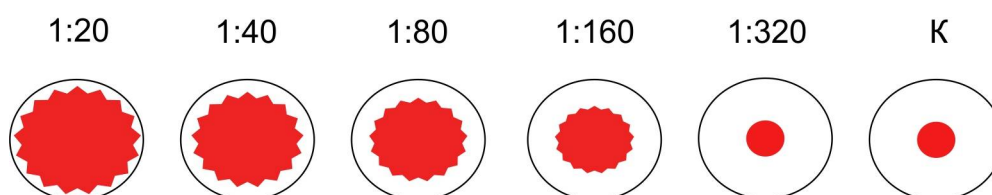
## Реакция преципитации:



**Рис. 39.** Схема реакции преципитации

**Реакция преципитации в геле:** 1% осветленный агар разливают в чашки Петри или на предметные стекла. В разные лунки, сделанные в агаре, наливают растворы антигена и антитела, которые диффундируют навстречу друг другу, образуя линии преципитации.

**Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)** – реакция, позволяющая обнаружить антитела (антигены) с помощью антигенов (антител), адсорбированных на поверхности эритроцитов (такие препараты называют эритроцитарными диагностикумами). При наличии специфичных антител происходит их связывание с антигенами, адсорбированными на поверхности эритроцитов (рис. 40). Результатом такого взаимодействия является агглютинация эритроцитов, она хорошо визуализируется в виде осадка с неровными фестончатыми краями («зонтик»), об отсутствии агглютинации говорит наличие осадка с четким ровным краем («диск» или «пуговка»).



**Рис. 40.** Схема РНГА. Цифрами обозначены разведения сыворотки больного, К – контроль эритроцитарного диагностикума. В каждую лунку добавили соответствующее разведение сыворотки больного и эритроцитарный диагностикум. В контрольную – только эритроцитарный диагностикум. В разведениях 1:20 – 1:160 – осадок «зонтик», реакция положительная. Титр антител в сыворотке больного 1:160 (последнее разведение сыворотки, в котором обнаружен положительный результат)

## **Получение диагностических препаратов**

**Диагностические сыворотки** получают путем иммунизации животных антигенами известных возбудителей. Для идентификации микроорганизмов по антигенной структуре используют адсорбированные диагностические сыворотки, которые изготавливают по **методу Кастеллани**.

Животных (кроликов, ослов и др.) иммунизируют микроорганизмом с определенной антигенной структурой и получают от них нативную сыворотку, которая содержит антитела ко всем антигенам возбудителя. Для того чтобы избавиться от перекрестнореагирующих антител, к этой сыворотке добавляют взвесь родственного микроба, который отличается от исходного по типовому антигену. Перекрестнореагирующие антитела связываются с соответственными антигенами микроорганизма, и комплексы оседают на дно. В надосадочной жидкости остаются только антитела к типовому антигену искомого микроорганизма.

Сыворотки, содержащие антитела только к одному антигену, принято называть моновалентными или монорецепторными, их используют для идентификации вида или типа микроба. Смешивая несколько монорецепторных сывороток, получают поливалентные, которые применяют для определения принадлежности возбудителя к роду или виду.

**Диагностикумы** представляют собой взвесь цельных убитых микроорганизмов или их антигенных фракций, которые получают путем дезинтеграции (разрушения) микробной клетки. Дезинтеграцию осуществляют разными способами (ультразвуковым, механическим, с помощью детергентов и др.), после чего выделяют капсульные, жгутиковые или соматические антигенные фракции.

**Эритроцитарные диагностикумы** получают путем адсорбции на поверхности отмытых эритроцитов барана антигенов микроорганизмов или вирусов.

## **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Виды иммунитета.
2. Пути формирования активного и пассивного искусственного иммунитета.
3. Антигены: структура, классификация, основные свойства. Антигены бактерий и вирусов.
4. Антитела (иммуноглобулины): строение, классы, функции.

5. Серологические реакции, их назначение и свойства, разновидности.
6. Реакции агглютинации и преципитации.
7. Реакция непрямой гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом.
8. Получение диагностических сывороток и диагностикумов.

### **Практический блок**

1. Постановка реакции агглютинации на стекле с целью идентификации неизвестной культуры.
2. Учет пробирочной реакции агглютинации с целью определения антител в сыворотке больного методом парных сывороток.
3. Постановка реакции преципитации с целью определения видовой принадлежности крови.
4. Учет реакции преципитации с целью определения токсигенности штамма возбудителя дифтерии.
5. Учет реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом методом парных сывороток.

### **Методика постановки реакции агглютинации на стекле**

На предметное стекло наносят каплю физиологического раствора и помещают в нее неизвестную культуру, размешивают, затем добавляют каплю поливалентной ОВ-коли сыворотки. О наличии агглютинации свидетельствует появление зерен или хлопьев. Интенсивность реакции оценивают в «+» и дают заключение о принадлежности возбудителя к виду *E. coli*. По той же схеме проводят реакцию с типовыми сыворотками и определяют принадлежность к серотипу.

### **Методика учета пробирочной реакции агглютинации**

Сначала определяют титр антител на первой неделе заболевания. Для этого каждую пробирку с разведениями сыворотки пациента сравнивают с контролем диагностикума (жидкость в пробирке должна быть мутной) и контролем сыворотки (жидкость в пробирке должна быть прозрачной). Агглютинацию учитывают по наличию осадка. Титром антител считают последнее разведение сыворотки, где обнаружена агглютинация. Затем определяют титр антител на второй неделе заболевания и сравнивают титры. Увеличение титра не менее чем в четыре раза указывает на наличие заболевания у пациента.

### Методика постановки реакции преципитации

В пробирку с марлей, пропитанной кровью, добавляют физиологический раствор, встряхивают и пипеткой аккуратно наслаивают на преципитирующую сыворотку против белка человека. О преципитации свидетельствует появление беловатого кольца на границе раздела двух жидкостей.

### Методика учета реакции преципитации в геле

Определить наличие линий преципитации между кружком фильтровальной бумаги, пропитанной антитоксической сывороткой, и колониями возбудителей дифтерии (контрольным, токсигенным и исследуемыми).

### Методика учета реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом

Определяют титр антител на первой и второй неделях заболевания по последнему разведению сыворотки, в котором имеется осадок эритроцитов «зонтик». Сравнивают титры между собой, отмечая увеличение, делают заключение о наличии заболевания, если титр увеличился не менее чем в четыре раза.

### Протокол практической работы студентов

| Материал                                      | Ход работы                                                                                                                           | Результат             |              |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------|
|                                               |                                                                                                                                      | время исследования    | титр антител |
| Сыворотка больного с подозрением на бруцеллез | Учет пробирочной реакции агглютинации Райта с бруцеллезным диагностикумом                                                            | I неделя              |              |
|                                               |                                                                                                                                      | II неделя             |              |
|                                               |                                                                                                                                      | Заключение:           |              |
|                                               |                                                                                                                                      |                       |              |
| Неизвестный микроорганизм                     | Постановка реакции агглютинации на стекле с целью идентификации микроорганизма с поливалентной и типовыми сыворотками <i>E. coli</i> | сыворотка             | агглютинация |
|                                               |                                                                                                                                      | поливалентная ОВ-коли |              |
|                                               |                                                                                                                                      | O-111                 |              |
|                                               |                                                                                                                                      | O-55                  |              |
|                                               |                                                                                                                                      | O-6                   |              |
|                                               |                                                                                                                                      | Заключение:           |              |

|                                               |                                                                                                                        |                           |                     |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Салфетка, смоченная кровью                    | Постановка реакции преципитации для установления видовой принадлежности крови с сывороткой против белка крови человека | Заключение:               |                     |
| Сыворотка больного с подозрением на туляремию | Учет реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным сыпнотифозным диагностикумом                                    | <b>время исследования</b> | <b>титр антител</b> |
|                                               |                                                                                                                        | I неделя                  |                     |
|                                               |                                                                                                                        | II неделя                 |                     |
|                                               |                                                                                                                        | Заключение:               |                     |
| Чистая культура возбудителя дифтерии          | Учет реакции преципитации с целью определения токсигенности возбудителя                                                | Заключение:               |                     |

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

#### 1. К СЕРОЛОГИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТКИ ОТНОСЯТСЯ

- 1) ИФА, РИФ
- 2) РНГА, РЛА
- 3) РИФ, РА
- 4) РП

#### 2. К ОПОСРЕДОВАННЫМ СЕРОЛОГИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) РА
- 2) РНГА, РЛА
- 3) РЛА, РА
- 4) РП

#### 3. К ПРЯМЫМ СЕРОЛОГИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ ОТНОСЯТСЯ

- 1) РА, РП
- 2) РНГА
- 3) РЛА, РА
- 4) РТГА

#### 4. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ НА СТЕКЛЕ С АДСОРБИРОВАННЫМИ СЫВОРОТКАМИ СТАВИТСЯ С ЦЕЛЬЮ

- 1) определения антител

- 2) идентификации культуры
- 3) определения титра
- 4) нет верного ответа

5. РАЗВЕРНУТАЯ РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ СТАВИТСЯ С ЦЕЛЬЮ

- 1) определения антител
- 2) идентификации культуры
- 3) определения титра антител
- 4) нет верного ответа

6. РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ СТАВИТСЯ С ЦЕЛЬЮ

- 1) выявления антигенов
- 2) идентификации культуры
- 3) определения титра антител
- 4) нет верного ответа

7. АНТИГЕН В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ НАХОДИТСЯ В СОСТОЯНИИ

- 1) антитела
- 2) свободном
- 3) корпускулярном
- 4) нет верного ответа

8. ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ ПРИ ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ НА ЭРИТРОЦИТАХ АДСОРБИРУЮТ

- 1) антитела
- 2) антигены
- 3) эритроциты
- 4) нет верного ответа

9. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РНГА НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) антигены
- 2) агглютинирующие сыворотки
- 3) эритроцитарные диагностикумы
- 4) иммуноглобулины

10. ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ АДСОРБИРОВАННЫХ СЫВОРОТОК ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) метод Ожешко
- 2) метод Кумбса
- 3) метод Безредко
- 4) метод Кастеллани

**Ситуационные задачи**

**Задача 1.** В лабораторию судебно-медицинской экспертизы доставлена одежда гражданина М., на которой имеются пятна бурого цвета.

1. *Указать реакцию, позволяющую определить принадлежность крови человеку*
2. *Указать критерий, свидетельствующий о принадлежности пятен крови человеку.*

**Задача 2.** Из крови больного в бактериологической лаборатории выделена чистая культура грамотрицательных палочек. Для изучения серологических свойств поставлена реакция агглютинации.

1. *Назвать необходимый компонент для постановки реакции.*
2. *Указать метод получения этого компонента.*
3. *Перечислить виды реакции агглютинации.*

**Задача 3.** В лаборатории при экспертизе шкур овец использована реакция кольцепреципитации. При учете реакции на границе жидкостей появилось матовое кольцо.

1. *Оценить полученный результат.*
2. *Указать цель постановки реакции преципитации.*

**Задача 4.** Из материала от больного Н. с подозрением на «дизентерию» выделена чистая культура микроорганизма.

1. *Назвать серологическую реакцию, которая позволит идентифицировать микроб.*
2. *Указать феномен положительной реакции.*

**Задача 5.** У больного с предполагаемым диагнозом «бруцеллез» были взяты сыворотки на 7 и 14 день заболевания. С ними поставлена РНГА.

1. *Назвать диагностический препарат, необходимый для постановки РНГА.*
2. *Указать феномен положительной реакции.*

## ЗАНЯТИЕ № 14. Серологические реакции (продолжение)

**Цель занятия:** изучить методы определения «парных сывороток» и отдельных классов иммуноглобулинов для серологической диагностики заболеваний. Изучить серологические реакции с использованием метки (ИФА, РИФ, РИА), принцип постановки иммуноблоттинга. Освоить учет ИФА.

### План занятия

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение метода парных сывороток и методов определения отдельных классов иммуноглобулинов.
3. Изучение серологических реакций с использованием метки: прямая и непрямая реакции иммунофлюоресценции, иммуноферментный и радиоиммунный анализы.
4. Изучение этапов постановки иммуноблоттинга.
5. Изучение реакции Кумбса для выявления неполных антител.
6. Учет демонстрационной реакции иммуноферментного анализа с целью диагностики клещевого энцефалита.
7. Выполнение практической работы, оформление протоколов занятия.

### Информационный блок

Для серологической диагностики инфекционных заболеваний просто определения наличия специфических антител к возбудителю в крови больного недостаточно. Для количественной диагностики определяют титр антител в крови больного. Титром антител называют последнее разведение сыворотки больного, с которым обнаружена положительная реакция.

Наличие антител в крови человека может говорить не только о протекающем у него заболевании, но и о перенесенной инфекции. Чтобы дифференцировать эти состояния используют метод парных сывороток или определение класса иммуноглобулинов.

*Метод парных сывороток* заключается в повторном заборе крови у пациента с интервалом в 7–14 дней и определение титра специфических антител в двух сыворотках одновременно. Увеличение титра антител в 4 и более раз подтверждает у пациента инфекционное заболевание.

С этой же целью проводят определение *класса иммуноглобулинов*. Если специфические антитела относятся к классу IgM, то это подтверждает острый инфекционный процесс у пациента. В случае определения IgG для подтверждения необходимо проведение метода парных сывороток.

### Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

РИФ основана на соединении антигенов бактерий, риккетсий и вирусов со специфическими антителами, мечеными флуоресцирующими красителями (флуоресцеинизотиоцианат, родамин, В-изотиоцианит, лиссатинродамин В-200, сульфохлорид и др.), имеющими реакционно способные группы (сульфохлорид, изотиоцианит и др.). Эти группы соединяются со свободными аминокеттами молекул антител, которые не теряют при обработке флуорохромом специфического сродства к соответствующему антигену. Образовавшиеся комплексы АГ–АТ становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами под люминесцентным микроскопом (рис. 41). Метод РИФ используют в двух вариантах: прямой и непрямой.

1 - прямой метод  
2 - непрямой метод

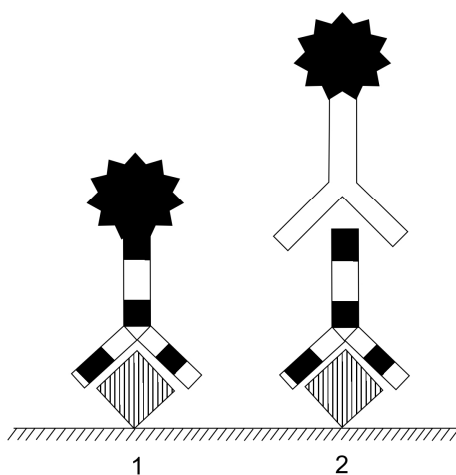


Рис. 41. Схема РИФ

Прямой метод основан на непосредственном соединении антигена с меченым антителом. Непрямой метод (НРИФ) – на поэтапном выявлении комплекса АГ–АТ. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена со специфическими антителами. Второй этап – в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым антигаммаглобулином.

Преимущество РИФ – простота, высокая чувствительность, скорость получения результата. РИФ применяется как метод ранней экспресс-диагностики гриппа, дизентерии, малярии, чумы, туляремии, сифилиса и др. Для проведения такого исследования необходим люминесцентный микроскоп.

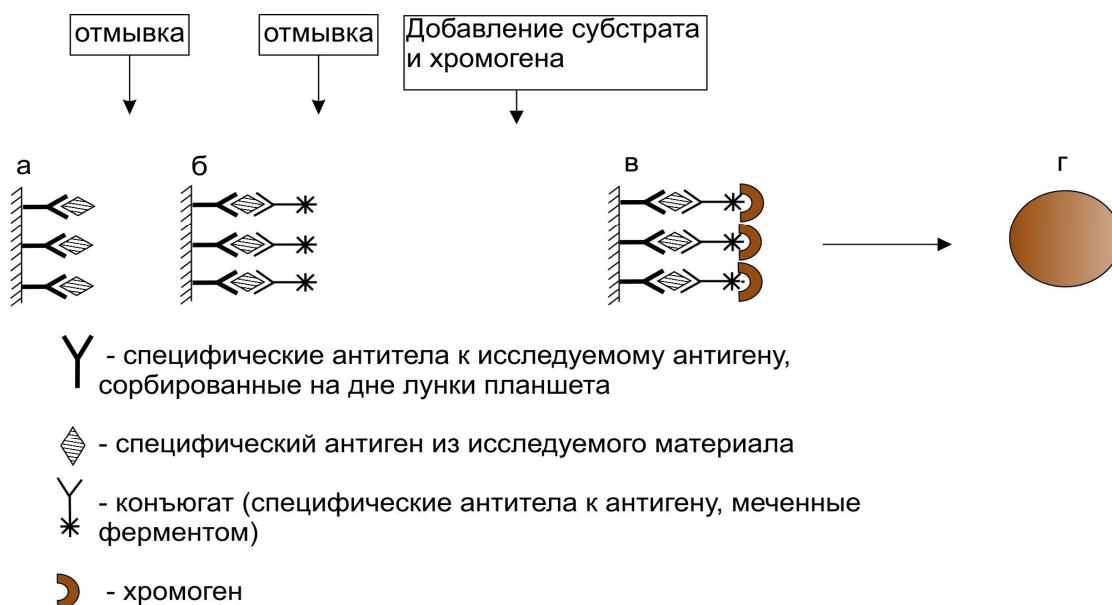
### **Иммуноферментный метод (ИФА)**

ИФА используется для выявления комплекса АГ–АТ с помощью антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена,  $\beta$ -галактозой или щелочной фосфатазой). После соединения меченных антител (конъюгата) с комплексом в смесь добавляют субстрат и хромоген (например, ортофенилендиамин). Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Наиболее распространен в практической лабораторной диагностике твердофазный ИФА, при котором один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) адсорбирован на твердом носителе. В качестве твердого носителя используются микропанели из полистирола. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания.

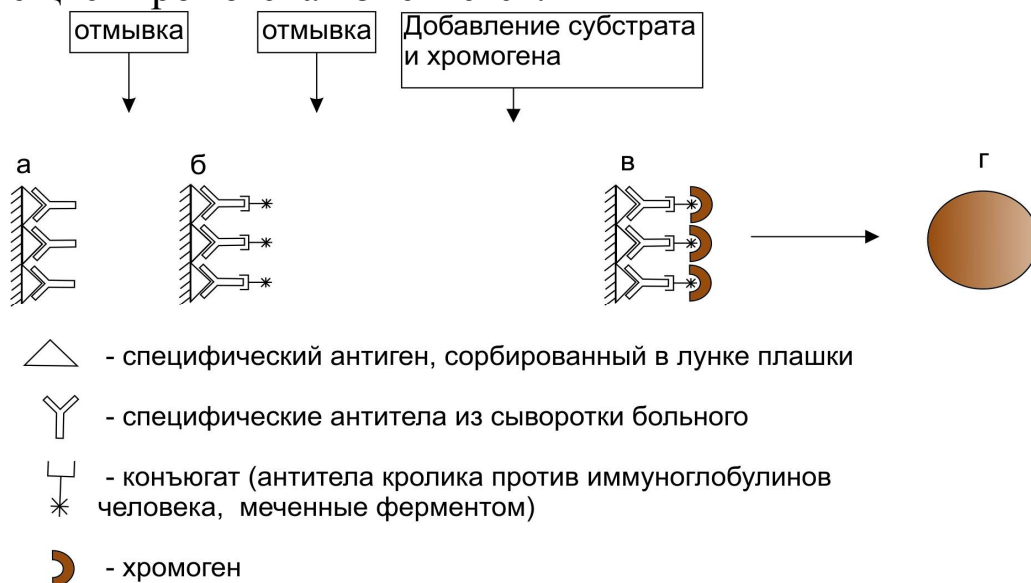
ИФА используется как для определения специфических антигенов возбудителя, так и специфических антител в сыворотке больных. Для определения антигенов дно лунок полистеролового планшета сорбируют специфическими антителами против данного антигена (рис. 42). Затем в лунки заливают исследуемый на наличие антигена материал. Если антиген действительно присутствует в данном материале, то он присоединяется к специфическим антителам. Неприсоединившиеся компоненты вымывают буферным раствором.

Для выявления полученного комплекса АГ-АТ используют конъюгат, который представляет собой специфические антитела против антигена, меченные ферментом. В случае наличия в лунках антигена конъюгированные с ферментом антитела присоединяются к нему. Неприсоединившиеся компоненты также промывают. Для выявления фермента добавляют субстрат с хромогеном. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена.



**Рис. 42.** Схема ИФА для определения специфического антигена: а – добавление в лунки, предварительно сорбированные антителами, материала, содержащего антиген; б – выявление полученного комплекса АГ-АТ при помощи антител, конъюгированных с ферментом; в – добавление субстрата с хромогеном; г – цвет раствора в лунке говорит о положительной реакции

При определении антител дно лунок полистеролового планшета сорбируют антигеном (рис. 43). Затем последовательно добавляют исследуемую на наличие специфических антител сыворотку больного, конъюгат (антитела против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом) и субстрат с хромогеном. При положительном результате цвет хромогена изменяется.



**Рис. 43.** Схема ИФА для определения специфических антител. а – добавление в лунки, предварительно сорбированные антигеном антител; б – выявление полученного комплекса АГ-АТ при помощи антител против

иммуноглобулинов человека, конъюгированных с ферментом; в – добавление субстрата с хромогеном; г – цвет раствора в лунке говорит о положительной реакции

### **Радиоиммунный анализ (РИА)**

РИА также относится к реакциям с использованием метки. В качестве метки используются радиоактивные изотопы, например  $^{125}\text{J}$ . Определение проводят в полистеровых планшетах. Механизм и последовательность реакции соответствуют ИФА, только результат учитывается по наличию и числу импульсов в лунках планшета, зарегистрированных счетчиком радиации.

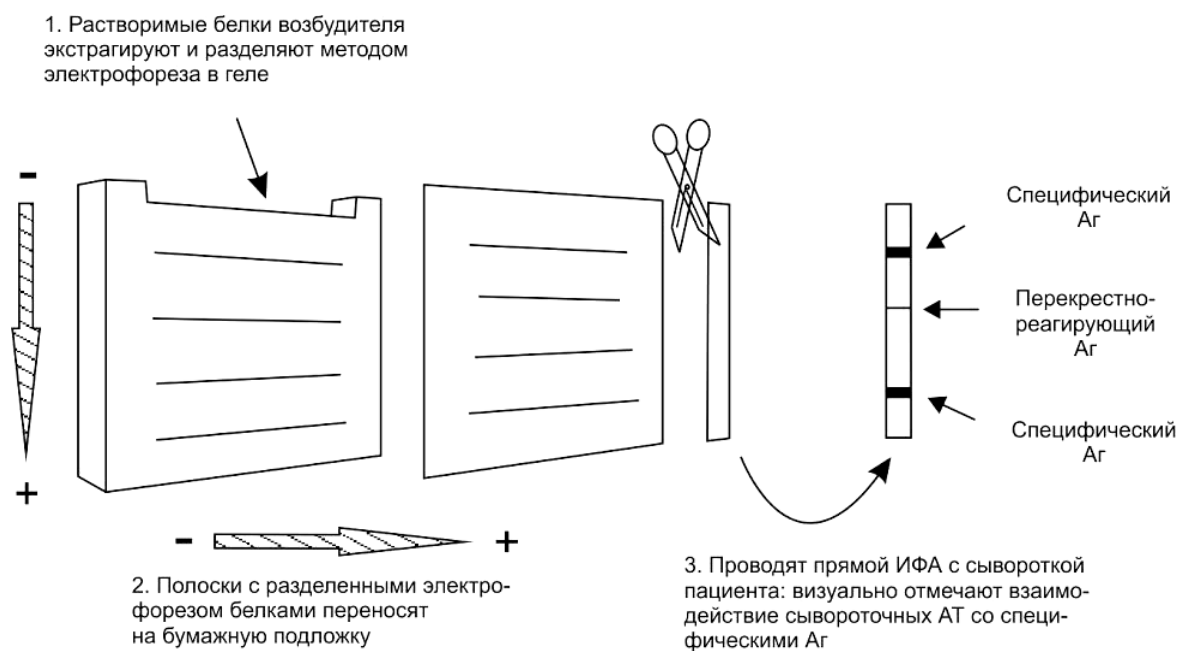
### **Имунноблоттинг**

Имунноблоттинг – современный высокочувствительный метод, основанный на комбинации гель-электрофореза и серологической реакции «антиген-антитело». Метод можно использовать как для определения белков, так и специфических антител к ним. Имунноблоттинг используется в молекулярной биологии, биохимии, генетике, микробиологии и иммунологии.

В практическом здравоохранении чаще всего используется имунноблоттинг для определения антител к антигенам ВИЧ. На примере этой реакции и разберем принцип этого метода. Имунноблоттинг проводится в несколько этапов (рис. 44):

- 1) разделение белков методом гель-электрофореза;
- 2) перенос белков на нитроцеллюлозную пластину;
- 3) нарезание пластины на отдельные стрипы;
- 4) детекция антител к полученным антигенам в сыворотке больного.

Дезинтегрированный вирус иммунодефицита человека подвергаются электрофорезу в полиакриламидном геле для разделения антигенов на фракции по молекулярной массе. Затем при помощи электрофореза переносят полученные антигены вируса на нитроцеллюлозную пластину. Пластины разрезают на отдельные полоски (стрипы). Стрип с нанесенными на него антигенами ВИЧ погружают в сыворотку пациента и выявляют антитела к различным антигенам ВИЧ в ИФА.

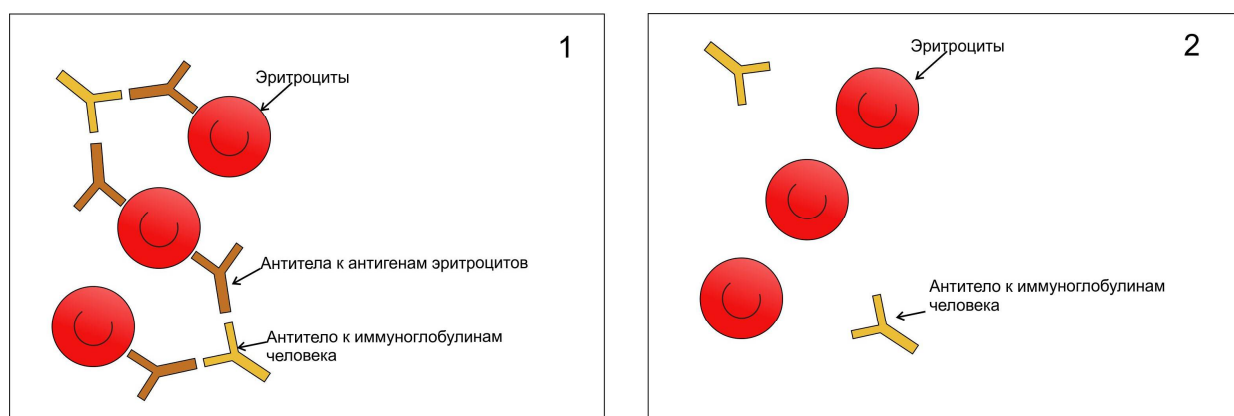


**Рис. 44.** Схема постановки имунноблоттинга

### Реакция Кумбса

Реакция Кумбса или антиглобулиновый тест предназначен для выявления неполных антиэритроцитарных антител. Суть данного метода заключается в том, что антиглобулиновая сыворотка, содержащая антитела к иммуноглобулинам человека, при реакции с эритроцитами, сенсibilизированными неполными антителами, приводит к их агглютинации (рис. 45).

Тест Кумбса используется для выявления антител к резус-фактору у беременных женщин и определения гемолитической анемии у новорождённых детей с резус-несовместимостью, влекущей разрушение эритроцитов.



**Рис. 45.** Схема реакции Кумбса для выявления неполных антител к резус-фактору. 1 – агглютинация эритроцитов, реакция положительная; 2 – отсутствие агглютинации эритроцитов, реакция отрицательная

### Вопросы для самоподготовки к занятию

1. Метод парных сывороток и методы определения отдельных классов иммуноглобулинов. Значение для серологической диагностики инфекционных заболеваний.
2. Серологические реакции с использованием метки: РИФ, ИФА, РИА.
3. Принцип постановки иммуноблоттинга.
4. Реакция Кумбса. Цель и принцип постановки.

### Практический блок

1. Изучение техники постановки РИФ, ИФА, РИА.
2. Учет ИФА с целью диагностики клещевого энцефалита.

### Протокол самостоятельной работы студентов

#### Диагностика клещевого энцефалита в ИФА

| №  | Материал                                               | Ход исследования                                                                     | Результат |               |               |               |
|----|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|
|    |                                                        |                                                                                      | Клещ      | Титр АГ       |               |               |
| 1. | Клещи, снятые с пострадавших.                          | Определение содержания антигена вируса клещевого энцефалита в клеще в ИФА            | №1        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      | №2        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      | №3        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      | №4        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      |           |               |               |               |
| 2. | Сыворотка больных с подозрением на клещевой энцефалит. | Определение иммуноглобулинов разных классов против вируса клещевого энцефалита в ИФА | Пациент   | IgM<br>1 нед. | IgG<br>1 нед. | IgG<br>2 нед. |
|    |                                                        |                                                                                      | А.        |               |               | не<br>иссл.   |
|    |                                                        |                                                                                      | Б.        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      | В.        |               |               |               |
|    |                                                        |                                                                                      | Г.        |               |               | не<br>иссл.   |

Заключение:

### Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ МИКРОСКОП
  - 1) световой

- 2) темнопольный
- 3) фазовоконтрастный
- 4) люминесцентный

2. ФЛЮОРЕСЦЕИНИЗОТИОЦЕОНАТ ПРИМЕНЯЕТСЯ ДЛЯ ОКРАШИВАНИЯ АНТИТЕЛ В РЕАКЦИИ

- 1) флюоресценции
- 2) имунноблоттинга
- 3) агглютинации
- 4) преципитации

3. ПРИ ПОСТАНОВКЕ ПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КРАСИТЕЛЕМ МЕТЯТ

- 1) антиген
- 2) специфические антитела
- 3) антиглобулиновые антитела
- 4) антигены и антитела

4. ПРИ ПОСТАНОВКЕ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КРАСИТЕЛЕМ МЕТЯТ

- 1) антиген
- 2) специфические антитела
- 3) антиглобулиновые антитела
- 4) антигены и антитела

5. НА СТРИПАХ ПЕРЕД ПОСТАНОВКОЙ ИМУННОБЛОТТИНГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ НАХОДЯТСЯ

- 1) антигены возбудителя
- 2) специфические антитела
- 3) антиглобулины
- 4) иммуноглобулины класса М

6. В РЕАКЦИИ ИМУННОБЛОТТИНГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ ОПРЕДЕЛЯЮТ

- 1) антигены возбудителя
- 2) специфические антитела
- 3) антиглобулины
- 4) секреторные иммуноглобулины класса А

7. ДИАГНОСТИЧЕСКУЮ ДОСТОВЕРНОСТЬ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ПАРНЫХ СЫВОРОТОК ИМЕЕТ НАРАСТАНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В
- 1) 2 раза
  - 2) 3 раза
  - 3) 4 раза
  - 4) 5 раз
8. НА ДНЕ ЛУНКИ ПЛАСТИКОВОЙ МИКРОПЛАНШЕТЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА СОРБИРУЮТ
- 1) антиген
  - 2) атителя
  - 3) иммуноглобулины класса А
  - 4) антиглобулины
9. НА ДНЕ ЛУНКИ ПЛАСТИКОВОЙ МИКРОПЛАНШЕТЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИГЕНА В ИССЛЕДУЕМОМ МАТЕРИАЛЕ СОРБИРУЮТ
- 1) антиген
  - 2) атителя
  - 3) иммуноглобулины класса А
  - 4) антиглобулины
10. ПРИ ПОСТАНОВКЕ РАДИОИММУННОГО АНАЛИЗА ЧАЩЕ ИСПОЛЬЗУЮТ ИЗОТОП
- 1)  $J^{125}$
  - 2)  $F^{125}$
  - 3)  $R^{119}$
  - 4)  $F^{115}$

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** Студентка Сидорова Е. проходила практику в инфекционной больнице, работала в процедурном кабинете. Через 4 месяца после прохождения практики она почувствовала недомогание, а через 3 дня стала темнеть моча (напоминать цвет пива), что характерно для больных инфекционным гепатитом. Диагноз гепатита В был подтвержден путем постановки ИФА.

*1. Назвать класс иммуноглобулинов к вирусу гепатита В, появление которого свидетельствует о первичном иммунном ответе.*

2. Назвать метод двойного определения титра антител с интервалом в 7-10 дней.
3. Назвать, что сорбируют на стенке лунки пластиковой микропланшеты при определении антител в сыворотке крови пациента методом иммуноферментного анализа.

**Задача 2.** В анонимный кабинет обратился гражданин К. с просьбой проверить его на инфицирование ВИЧ. Проведено определение специфических антител с применением ИФА.

1. Назвать фермент, наиболее часто используемый в качестве метки антител для иммуноферментного анализа.
2. Назвать компоненты и механизм реакции ИФА, поставленной с целью определения наличия антител.
3. Назвать, с какой целью в реакции используют ортофенилендиамин.

**Задача 3.** При исследовании сыворотки крови в РИА обнаружен HBsAg вируса гепатита В.

1. Перечислить ингредиенты и описать механизм реакции РИА.
2. Назвать изотоп, который чаще всего используют в РИА в качестве метки.
3. Определить, в каком случае реакция будет положительной.

**Задача 4.** В клинику поступил больной с предварительным диагнозом «Урогенитальный хламидиоз». Для подтверждения диагноза проведена серологическая диагностика с помощью непрямой РИФ.

1. Назвать компоненты и механизм данной реакции.
2. Назвать люминесцирующий краситель, чаще всего используемый в качестве метки для антител в РИФ.

**Задача 5.** В СПИД-центр на исследование поступили сыворотки крови добровольных доноров из числа студентов вузов города. При исследовании были выявлены антитела к ВИЧ в двух образцах. Добровольцам с положительной реакцией рекомендовали уточнить диагноз в иммуноблоттинге.

1. Представить схему постановки иммуноблоттинга для диагностики ВИЧ.
2. Назвать, что находится на стрипах перед детекцией антител.
3. Назвать, что определяют постановкой иммуноблоттинга.

## **ЗАНЯТИЕ № 15. СЕМИНАР: Механизмы иммунного ответа. Аллергия и аллергические реакции. Механизмы гиперчувствительности**

**Цель занятия:** изучить механизмы иммунного ответа при инфекционных процессах, вызванных различными возбудителями; изучить виды и механизмы аллергических реакций.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Заслушивание и обсуждение реферативных докладов по темам занятия.
3. Изучение схем различных типов иммунного ответа.
4. Изучение схем различных типов аллергических реакций.
5. Изучение диагностических препаратов – аллергенов.

### **Информационный блок**

**Клеточный и гуморальный иммунный ответ.** Полностью разделить иммунитет на клеточный и гуморальный невозможно: в инициации образования антител (АТ) участвуют клетки, а в некоторых реакциях клеточного иммунитета важную связующую функцию выполняют АТ. АТ способны различными путями модифицировать опосредованный клетками иммунный ответ. Так, комплексы АГ-АТ вызывают высвобождение хемотаксических фрагментов комплемента, усиленно привлекающих лейкоциты в очаг воспаления. Благодаря Fc-рецепторам АТ могут принимать участие в связывании антигенов (АГ) с клетками и тем самым влиять на реакции клеточного иммунитета, в частности обеспечивать прикрепление фагоцитов и цитотоксических Т-клеток к клеткам мишеням.

**Межклеточная кооперация.** Межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется путем непосредственного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, или с помощью цитокинов, называемых «белками связи». Эти белки действуют как растворимые медиаторы межклеточных взаимодействий.

В осуществлении иммунной защиты участвует три вида клеток: фагоциты, Т- и В-лимфоциты. Деятельность этих клеток направлена на распознавание и уничтожение генетически чужеродных веществ,

регуляцию функционирования компонентов иммунной системы и поддержание гомеостаза. Такая работа осуществляется в постоянном взаимодействии всех типов иммунокомпетентных клеток, то есть в условиях межклеточной кооперации. Связующим звеном между клетками иммунной системы служат рецепторы, цитокины и другие медиаторы.

**Клеточный (Тх1) иммунный ответ.** Клеточный иммунный ответ развивается на попадание в организм внутриклеточных возбудителей (рис. 46). АГ сорбируется на поверхности макрофага (антиген, представляющей клетки – АПК), затем подвергается эндоцитозу, в результате чего фрагментируется и формирует комплекс с антигеном гистосовместимости HLA II. Комплекс антиген–белок HLA экспрессируется на поверхности АПК и становится доступным к контакту с рецептором Т-хелпера.

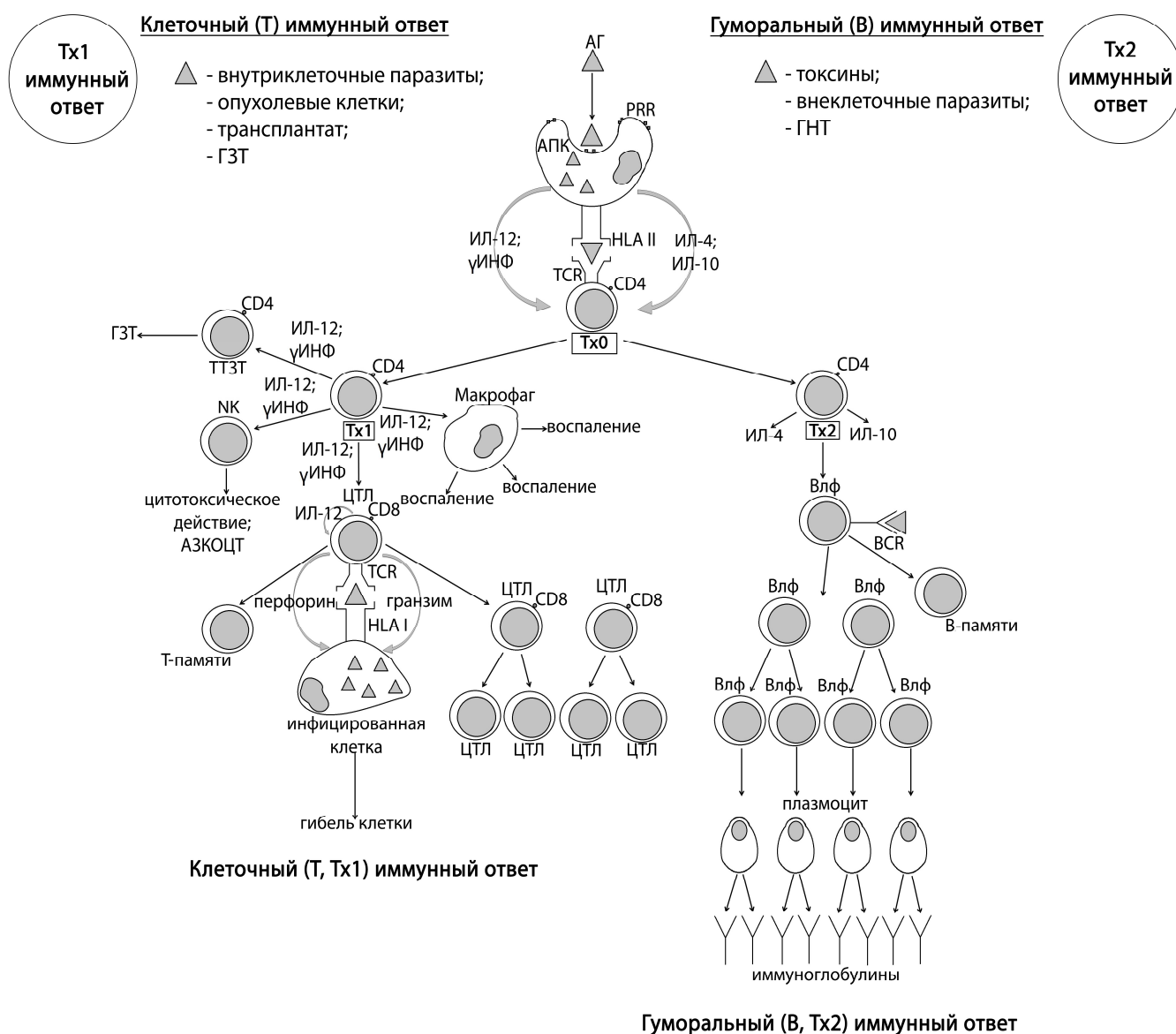
Макрофаг, распознав АГ, активируется и выделяет цитокины – активаторы клеточного иммунного ответа (ИЛ-12,  $\gamma$ ИНФ). Под действием рецепторного взаимодействия и действия интерлейкинов Тх0 дифференцируется в Тх1. Тх1 способен выделять ИЛ-12 и  $\gamma$ ИНФ и призывать цитотоксические Т лимфоциты (ЦТЛ или Т-киллеры).

Мишенью для Т-киллера служит цельная клетка, инфицированная возбудителем. АГ возбудитель представляется на инфицированной клетке в комплексе с HLA I. Рецептор Т-киллера построен так, что воспринимает одновременно оба компонента комплекса. Воздействие на Т-киллер антигенного комплекса служит сигналом активации внутриклеточных процессов, продукции клеткой цитокинов и цитотоксинов (перфорин и гранзим). Перфорин приводит к образованию пор в мембране атакуемой клетки, а гранзим приводит к ее лизису.

Т-киллеры, клеточный рецептор которых оказался специфичен для антигена, активно пролиферируют. При этом образуется клон долгоживущих клеток Т-памяти, которые длительно сохраняясь в организме, осуществляют функцию иммунологической памяти. Эти клетки уже прошли ранние стадии созревания и дифференцировки и готовы к быстрому формированию эффекторных цитотоксических клеток.

**Гуморальный (Тх2) иммунный ответ.** Гуморальный иммунный ответ развивается на попадание в организм антигена в молекулярной форме (рис. 46).

## Схема иммунного ответа



**Рис. 46.** Схема иммунного ответа. АГ – антиген, PRR – паттерн-распознающий рецептор, АПК – антигенраспознающая клетка, ИЛ – интерлейкин, HLA – антигены гистосовместимости (человеческие лейкоцитарные антигены), γИНФ – γ интерферон, ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа, ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа, TCR – Т-клеточный рецептор, Тх – Т лимфоцит хелпер, ЦТЛ – Т цитотоксический лимфоцит (Т-киллер), Влф – В лимфоцит, BCR – В-клеточный рецептор

Антиген захватывается макрофагом, переваривается; его фрагмент в комплексе с HLA-II представляется Т-хелперу для определения «свой – чужой». При контакте с АГ макрофаг активируется и начинает вырабатывать иммуоцитокнины, в том числе ИЛ-4 и ИЛ-10. Т-хелпер,

привлеченный реакцией фагоцита, прикрепляется к нему, распознает при помощи особого Т-клеточного рецептора АГ в комплексе с HLA-II.

Под действием рецепторного взаимодействия и действия интерлейкинов Т-хелпер (Тх0) дифференцируется в Тх2. Тх2 способен выделять ИЛ-4 и ИЛ-10 (цитокины гуморального иммунного ответа) и призывать В-лимфоциты. Оказавшийся рядом В-лимфоцит, специфичный к данному антигену, связывается с ним при помощи соответствующего В-клеточного рецептора. В-клеточным рецептором является мембранная молекула иммуноглобулина точно такой специфичности, как те, которые может вырабатывать данный В-лимфоцит в результате дифференцировки. Сигнал, полученный от антигенсвязывающего рецептора, и стимуляция интерлейкинами «включают» в В-лимфоцитах пролиферативные и дифференцировочные процессы. Клетка созревает, размножается и дифференцируется, в результате чего образуется клон высокоактивных лимфоцитов, синтезирующих антитела, специфичные к данному антигену. В процессе активной пролиферации В-лимфоцитов образуется клон долгоживущих клеток В-памяти, которые длительно сохраняясь в организме, осуществляют функцию иммунологической памяти.

Таким образом, для активации В-клеточного иммунного ответа необходим тройной сигнал: от антигенспецифичного рецептора, макрофага и Т-хелпера. Отсутствие хотя бы одного из стимулов (нарушение межклеточной кооперации, неспецифичность рецептора В-лимфоцита или элиминация антигена) блокирует развитие иммунного ответа.

**Иммунологическая память.** При повторной встрече с одним и тем же антигеном организм реагирует более активным и более быстрым формированием иммунитета (вторичный иммунный ответ). Этот феномен получил название *иммунологической памяти*.

Иммунологическая память распространяется как на гуморальный, так и на клеточный иммунитет, имеет высокую специфичность к конкретному антигену и обусловлена В-лимфоцитами и Т-киллерами. Иммунологическая память формируется практически всегда и сохраняется годами и даже десятилетиями. Благодаря ей организм надежно защищен от повторных попаданий антигенов.

В процессе развития первичной иммунной реакции в организме часть лимфоцитов размножается без дифференцировки и превращается в малые покоящиеся клетки (В- и Т-клетки иммунологической памяти). Эти клетки отличаются высокой специфичностью к кон-

кретной антигенной детерминанте и большой продолжительностью жизни (до 10 лет и более), что обеспечивает постоянную готовность иммунной системы реагировать на повторный контакт с антигеном по вторичному типу.

Феномен иммунологической памяти широко используется в практике вакцинации людей для создания напряженного иммунитета и поддержания его длительное время на защитном уровне. Осуществляют это 2–3-кратными иммунизациями при первичной вакцинации и периодическими повторными прививками – ревакцинациями.

### **Понятие об аллергии, гиперчувствительности, сенсibilизации**

*Гиперчувствительностью* называют чрезмерное или неадекватное проявление реакций приобретенного иммунитета. В основе гиперчувствительности лежит полезный в норме для организма иммунный ответ, но в данном случае действующий неадекватно, иногда с развитием воспаления и повреждением тканей. Эта необычная форма реагирования, основу которой составляют естественные физиологические механизмы, получила название *аллергии* (от греч. *allos* — иной и *ergon* — действие). Соответственно, антигены, вызывающие аллергические реакции, названы *аллергенами*. Изучает аллергию самостоятельная наука — *аллергология*.

Современный термин понимает *аллергию* как *повышенную извращенную реакцию макроорганизма на повторный контакт организма с антигеном (аллергеном)*.

Для формирования аллергии необходима предварительная сенсibilизация макроорганизма аллергеном. *Сенсibilизация* — это процесс приобретения организмом повышенной чувствительности к аллергену. Клиника развивается на последующие контакты с аллергеном. Сенсibilизацию можно вызвать введением очень малых субиммунизирующих доз антигена (например, введением морской свинке 0,000001 мл лошадиной сыворотки). Доза антигена, вызывающая сенсibilизацию, называется *сенсibilизирующей*. Повторное введение того же антигена через определенный промежуток времени вызывает *аллергическую реакцию*. Дозу антигена, вызывающую аллергическую реакцию, называют *разрешающей*.

В генезе аллергической реакции выделяют 3 стадии: иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую. В течение *иммунологической стадии* в ответ на антиген (аллерген) образуются антиген-чувствительные клетки, специфические антитела и иммунные

комплексы. *Патохимическая стадия* характеризуется образованием медиаторов воспаления и биологически активных аминов, которые играют основную роль в механизме аллергических реакций. В течение *патофизиологической стадии* проявляется клиническая картина аллергической реакции. Как правило, клинические проявления аллергии полиморфны.

Первая классификация аллергий была предложена Р. Куком в 1947 г. (табл. 10). В ее основу положено время развития аллергической реакции. Выделена *гиперчувствительность немедленного типа* (ГНТ) и *замедленного типа* (ГЗТ).

Таблица 10

Свойства ГНТ и ГЗТ (по Р. Куку, 1947)

| Показатель                                  | ГНТ                                                                | ГЗТ                                            |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Время развития реакции</b>               | Менее 20-30 мин                                                    | Более 6-8 ч                                    |
| <b>Фактор</b>                               | Антитела (опосредована В-звеном иммунитета)                        | Т-лимфоциты (опосредована Т-звеном иммунитета) |
| <b>Фактор переноса в интактный организм</b> | Пассивный (антителами) и адоптивный (иммунокомпетентными клетками) | Адоптивный (иммунокомпетентными клетками)      |
| <b>Десенсибилизация</b>                     | Возможна                                                           | Невозможна                                     |

Изучение молекулярно-генетических механизмов аллергий привело к созданию П. Джеллом и Р. Кумбсом в 1968 г. (табл. 11) новой классификации аллергий в зависимости от вовлечения в генез аллергии тех или иных механизмов. В соответствии с этой классификацией различают 4 основных типа аллергий: анафилактический (I тип), цитотоксический (II тип), иммунокомплексный (III тип) и клеточно-опосредованный (IV тип). Первые 3 типа относят к ГНТ, 4-й – к ГЗТ.

**Инфекционные аллергены.** Способностью вызывать аллергию обладают все виды бактерий, вирусы, грибы, простейшие, гельминты. Неразрушенные возбудители (живые или убитые) вызывают более выраженную сенсibilизацию по сравнению с растворимыми микробными аллергенами. Среди микробных фракций особое место занимают белковые аллергены, хотя аллергию вызывают также полисахариды, липополисахариды и вещества, обладающие свойствами гаптенa. Из микробных клеток можно выделить фракции, которые не обладают протективной активностью, но вызывают сенсibilизацию той или иной степени.

**Классификация аллергических реакций по патогенезу**  
**(Джелл П., Кумбс Р., 1968)**

| <b>Тип реакции</b>         | <b>Форма реагирования</b> | <b>Фактор патогенеза</b> | <b>Механизм патогенеза</b>                                                                                                                                                                                                                            | <b>Клинические примеры</b>                                                                          |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I анафилактический         | ГНТ                       | IgE, IgG4                | Выработка IgE цитотропных АТ, их фиксация на тучных клетках и базофилах; образование иммунного комплекса IgE (G4) – аллерген; активация тучных клеток и базофилов, высвобождение из них медиаторов воспаления и других БАВ                            | Поллинозы, атопическая бронхиальная астма, анафилактический шок                                     |
| II цитотоксический         | ГНТ                       | IgM, IgG                 | Выработка цитотоксических АТ; активация антителозависимого цитолиза с участием комплемента и фагоцитов                                                                                                                                                | Лекарственная аллергия                                                                              |
| III иммунно-комплексный    | ГНТ                       | IgM, IgG                 | Образование избытка иммунных комплексов (ИК); отложение ИК на базальных мембранах, в эндотелии и в соединительнотканной строме; активация антителозависимого цитолиза с участием комплемента или фагоцитов и повреждение соединительно-тканной стромы | Сывороточная болезнь, системные заболевания соединительной ткани, феномен Артюса                    |
| IV клеточно-опосредованный | ГЗТ                       | Т-лимфоциты              | Сенсибилизация Т-лимфоцитов, активация клеточно-опосредованного цитолиза с участием Т-киллеров и фагоцитов                                                                                                                                            | Кожно-аллергические пробы; контактная аллергия; аллергические явления при инфекционных заболеваниях |

Для диагностики инфекционной аллергии применяют аллергены, источником для получения которых являются одноклеточные и многоклеточные организмы и продукты их метаболизма. В качестве коммерческих бактериальных аллергенов используются инактивированные корпускулярные взвеси возбудителя, лизаты культур, термостабильные фракции культур микроорганизмов, а также отдельные фракции, выделенные из бактерий (белки, полисахариды, белковополисахаридные, полисахаридолипидные и другие комплексы). Например, тулярин, лепромин содержат взвесь убитых бактерий, бруцеллин и дизентерин представляют собой белковые фракции возбудителей, меллеин является фильтратом культуры палочки сапа, пестин – белковополисахаридным комплексом, а антраксин – белковонуклеосахаридным комплексом

Аллергены могут быть использованы для диагностики заболевания, выявления поствакцинальной сенсibilизации, для отбора контингента лиц, подлежащих вакцинации, и для проведения специфической гипосенсibilизации.

### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Клеточная кооперация в иммунном ответе. Схемы Th1 и Th2 иммунного ответа.
2. Иммунный ответ при бактериальных инфекциях.
3. Особенности иммунного ответа при токсических инфекциях.
4. Особенности иммунного ответа против внутриклеточных паразитов.
5. Антивирусный иммунитет и его особенности.
6. Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма.
7. Понятие об аллергии, гиперчувствительности, сенсibilизации, ГНТ и ГЗТ.
8. Классификация и патогенез различных типов аллергических реакций.
9. Роль аллергических реакций разных типов в развитии побочных эффектов серотерапии инфекционных заболеваний.
10. Роль ГЗТ в инфекционном процессе и нестерильном иммунитете.
11. Механизмы кожных аллергических реакций на инфекционные аллергены.

## Тестовые задания

Выберите один правильный ответ.

1. К ЦЕНТРАЛЬНЫМ ОРГАНАМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОТНОСИТСЯ
  - 1) лимфатические узлы
  - 2) селезенка
  - 3) тимус
  - 4) миндалины
  
2. CD-МАРКЕРЫ ЯВЛЯЮТСЯ
  - 1) цитотоксическими ферментами
  - 2) маркерные молекулы иммунных клеток
  - 3) маркерами опухолевых клеток
  - 4) маркерами антител
  
3. АНТИГЕНЫ HLA I КЛАССА НАХОДЯТСЯ НА ПОВЕРХНОСТИ
  - 1) только эритроцитов
  - 2) всех клеток организма
  - 3) только антигенпредставляющих клеток
  - 4) всех клеток организма кроме эритроцитов
  
4. АНТИГЕНЫ HLA II КЛАССА НАХОДЯТСЯ НА ПОВЕРХНОСТИ
  - 1) только эритроцитов
  - 2) всех клеток организма
  - 3) только антигенпредставляющих клеток
  - 4) всех клеток организма кроме эритроцитов
  
5. СИНТЕЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЯВЛЯЕТСЯ ФУНКЦИЕЙ
  - 1) нейтрофилов
  - 2) В-лимфоцитов
  - 3) Т-лимфоцитов
  - 4) Макрофагов
  
6. ОСНОВНОЙ КЛЕТКОЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЯВЛЯЕТСЯ
  - 1) нейтрофил
  - 2) В-лимфоцит
  - 3) Т-лимфоцит

4) Макрофаг

7. ОСНОВНОЙ КЛЕТКОЙ, РЕГУЛИРУЮЩЕЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) В-лимфоцит
- 2) Т хелпер
- 3) Т киллер
- 4) Макрофаг

8. ОСНОВНЫМИ ЦИТОКИНАМИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) С3а, С3b
- 2) гистамин, серотонин
- 3) ИЛ-4, ИЛ-6
- 4) ИЛ-12, ИНФ $\gamma$

9. ОСНОВНЫМИ ЦИТОКИНАМИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) С3а, С3b
- 2) гистамин, серотонин
- 3) ИЛ-4, ИЛ-6
- 4) ИЛ-12, ИНФ $\gamma$

10. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е ИГРАЮТ ОСНОВНУЮ РОЛЬ В

- 1) анафилактических аллергических реакциях
- 2) цитотоксических аллергических реакциях
- 3) иммунокомплексных аллергических реакциях
- 4) Т-клеточных аллергических реакциях

### Ситуационные задачи

**Задача 1.** В лечебно-профилактическое учреждение поступил пациент с симптомами столбнячной инфекции. С терапевтической целью было решено вводить пациенту противостолбнячную лошадиную сыворотку.

- 1. Перечислить правила введения гетерологических сывороточных препаратов.*
- 2. Назвать типы аллергических реакций, которые можно ожидать при введении гетерологичных сывороток.*

**Задача 2.** В комплексной диагностике туберкулеза широкое применение получила внутрикожная проба Манту, основанная на ГЗТ.

- 1. Объяснить механизм аллергических реакций замедленного типа.*
- 2. Привести примеры инфекционных аллергенов, которые вызывают развитие ГЗТ.*

**Задача 3.** На зачете преподаватель попросил студента рассказать о том, чем отличаются ГЗТ и ГНТ. Студент вспомнил, что существуют реакции немедленного и замедленного типа, но не смог назвать факторы, определяющие развитие и механизм этих реакций, а также проявление этих реакций на введение антигена *in vivo*.

- 1. Помогите студенту ответить на вопросы.*

**Задача 4.** Согласно классификации, предложенной в 1968 г. П. Джеллом и Р. Кумбсом, к аллергическим реакциям немедленного типа относятся анафилактические, иммуннокомплексные и цитотоксические.

- 1. Назвать класс антител, необходимых для развития каждой из этих реакций.*
- 2. Привести клинические примеры для каждой реакции.*

**Задача 5.** На экзамене студенту достался вопрос «противовирусный иммунитет». Студент рассказал об участии антител в нейтрализации вирусных частиц и упомянул комплементзависимый цитолиз.

- 1. Рассказать, о чем еще не вспомнил студент.*

## **ЗАНЯТИЕ № 16. Иммунобиологические препараты**

**Цель занятия:** изучить основные группы иммунобиологических препаратов, применяемых для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний.

### **План занятия**

1. Проведение тест-контроля.
2. Изучение иммунобиологических препаратов, применяемых для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний.
3. Реферативные доклады по темам занятия.

### **Информационный блок**

#### **Схема-характеристика лечебно-профилактического иммунобиологического препарата**

1. Название препарата.
2. Состав.
3. Получение.
4. Применение.
5. Способ введения.
6. Механизм действия, тип иммунитета.

#### **Схема-характеристика диагностического иммунобиологического препарата**

1. Название препарата.
2. Состав.
3. Получение.
4. Применение (что определяют и в какой реакции).

Таблица 12

**Классификация вакцин**

| <b>Тип вакцины</b>         | <b>Бактериальные вакцины</b>                                                                                                                                                                                                                  | <b>Вирусные вакцины</b>                                                                             |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Живые                      | Туберкулезная (BCG), чумная, сибире-язвенная, туляремиальная, бруцеллезная, сыпнотифозная (ЖКСВ-Е)                                                                                                                                            | Коревая, оспенная, паротитная, полиомиелитная, против желтой лихорадки, гриппозная, против краснухи |
| Убитые (инактивированные)  | Лептоспирозная, коклюшная, гонококковая, бруцеллезная, холерная, брюшнотифозная                                                                                                                                                               | Гриппозная, против клещевого энцефалита, антирабическая, гепатита А                                 |
| Анатоксины                 | Стафилококковый, дифтерийный (АД), столбнячный (АС), комбинированные: дифтерийно-столбнячный (АДС); трианатоксин (ботулинические анатоксины типов А, В и Е); тетраанатоксин (ботулинические анатоксины типов А, В, Е и столбнячный анатоксин) |                                                                                                     |
| Химические (субъединичные) | Сыпнотифозная, холерная (холероген + О-антиген), менингококковая, брюшнотифозная, пневмококковая                                                                                                                                              | Гриппозная и др.                                                                                    |
| Рекомбинантная             |                                                                                                                                                                                                                                               | Против гепатита В                                                                                   |

Таблица 13

**Календарь профилактической вакцинации в России**

| <b>Наименование вакцины</b>              | <b>Сроки вакцинации</b>                                                                                                                  |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Рекомбинантная вакцина против гепатита В | Новорожденные в первые 24 часа жизни; 1 мес. жизни; 6 мес. В 13 лет – ранее непривитые.                                                  |
| Живая противотуберкулезная вакцина (БЦЖ) | 3-7 день жизни; в 7 и 14 лет при «отрицательной» реакции Манту                                                                           |
| АКДС                                     | 3 мес.; 4,5 мес.; 6 мес.; 18 мес.; 7 лет – АДС-М; 14 лет – АДС-М; каждые 10 лет – АДС-М или АД-М.                                        |
| Оральная живая полиомиелитная вакцина    | 3 мес.; 4,5 мес.; 6 мес.; 18 мес.; 20 мес.; 14 лет. Первая и вторая вакцинация проводятся инактивированной вакциной против полиомиелита. |
| Живая коревая вакцина                    | 12 мес.; 6 лет.                                                                                                                          |
| Живая паротитная вакцина                 | 12 мес.; 6 лет.                                                                                                                          |
| Живая вакцина против краснухи            | 12 мес.; 6 лет, 13 лет (девочки).                                                                                                        |
| Пневмококковая вакцина                   | Ставится группам риска в 2 мес., 4,5 мес., 15 мес.,                                                                                      |
| Вакцина против гемофильной инфекции      | Ставится группам риска в 3 мес., 4,5 мес., 6 мес., 18 мес.,                                                                              |

Прививки по эпидемическим (экстренным) показаниям проводят в случае возникновения неблагоприятной эпидемиологической ситуации, а также в случае контакта восприимчивого (непривитого) лица с источником инфекции. К первой группе могут быть отнесены прививки против гриппа, менингококковой инфекции, особо опасных инфекций. Ко второй – прививки в очагах, а также экстренная профилактика столбняка, антирабические прививки.

Таблица 14

#### Пассивная иммунизация

| Заболевания                                                                       | Видовая принадлежность АТ          | Назначение                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| Дифтерия                                                                          | Человек, лошадь                    | Для профилактики и лечения                     |
| Столбняк                                                                          | Человек, лошадь                    | Для профилактики и лечения                     |
| Газовая гангрена                                                                  | Лошадь                             | Экстренная профилактика                        |
| Ботулизм                                                                          | Лошадь, человек                    | Экстренная профилактика и лечение              |
| Стафилококковая инфекция                                                          | Человек                            | Лечение                                        |
| Лептоспироз                                                                       | Вол                                | Лечение тяжелых форм                           |
| Сибирская язва                                                                    | Лошадь                             | Экстренная профилактика и лечение              |
| Укус ядовитой змеи или скорпиона                                                  | Лошадь                             | Экстренная профилактика и лечение              |
| Бешенство                                                                         | Человек, лошадь                    | Экстренная профилактика                        |
| Грипп                                                                             | Человек                            | Экстренная профилактика и лечение тяжелых форм |
| Корь, коклюш, полиомиелит, грипп, генерализованные формы менингококковой инфекции | Нормальный иммуноглобулин человека | Экстренная профилактика и лечение              |
| Гепатит А                                                                         |                                    | Профилактика (путешествие)                     |
| Гепатит В                                                                         | Человек                            | Экстренная профилактика                        |
| Клещевой энцефалит                                                                | Человек                            | Экстренная профилактика и лечение              |
| Ветряная оспа (опоясывающий лишай)                                                | Человек                            | Лечение при иммунологической недостаточности   |

#### Правила введения гетерологических сывороточных препаратов

Для выявления чувствительности пациента к лошадиному белку ставят внутрикожную пробу с разведенной 1:100 лошадиной сывороткой, которую специально изготавливают с этой целью (разведен-

ная 1:100 лошадиная сыворотка для внутрикожной пробы). Внутрикожно в сгибательную поверхность предплечья вводят 0,1 мл разведенной сыворотки и наблюдают за реакцией в течение 20 минут.

Проба считается отрицательной, если диаметр папулы не более 0,9 см и краснота вокруг нее ограничена. В этом случае неразведенный сывороточный препарат вводят подкожно в объеме 0,1 мл и при отсутствии реакции пациента через 30 мин внутримышечно вводят всю остальную дозу. Если диаметр папулы 1 см и более, а вокруг нее отмечается выраженная зона покраснения, с целью десенсибилизации вначале вводят подкожно разведенную сыворотку в дозах 0,5; 2,0 и 5,0 мл с 20-минутными перерывами, затем при отсутствии реакции – подкожно 0,1 мл неразведенной сыворотки и через 30 мин – всю дозу сыворотки.

Одновременно с началом десенсибилизации больному вводят средства противошоковой терапии. В случае появления симптомов анафилактического шока на одну из вышеуказанных доз последующие введения сыворотки проводят под наркозом. При введении гетерологичных сывороток всегда необходимо иметь наготове раствор адреналина 1:1000 или эфедрина.

При использовании сывороточных препаратов другого видового происхождения (волов, быков и др.) соответственно определяется чувствительность к белкам этого вида животного (например, разведенная 1:100 воловья сыворотка для внутрикожной пробы).

Максимальный объем препарата, вводимого в одно место, не должен превышать 10 мл. Больной, получивший сыворотку, должен находиться под наблюдением врача в течение часа.

### **Вопросы для самоподготовки к занятию**

1. Типы вакцин. Получение живых, убитых, субъединичных и рекомбинантных вакцин. Контроль их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
2. Получение и контроль анатоксинов. Понятие об адьювантах.
3. Понятие о серотерапии и серопротекции инфекционных заболеваний
4. Иммуноглобулины и лечебные сыворотки: классификация, состав, принципы получения и применения, методы контроля.
5. Меры профилактики анафилактического шока при лечении больных антитоксическими сыворотками или гетерологичными иммуноглобулинами.

6. Диагностические препараты, содержащие антигены (диагностикумы, эритроцитарные диагностикумы, антигены). Получение и применение.
7. Диагностические сыворотки: виды и способы получения. Способ получения адсорбированных агглютинирующих сывороток по Кастеллани.

### **Практический блок**

1. Реферативные доклады по темам занятия.
2. Изучение календаря прививок.
3. Изучение наборов иммунобиологических препаратов.

### **Тестовые задания**

Выберите один правильный ответ.

#### **1. АНАТОКСИНЫ ПРИМЕНЯЮТ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ**

- 1) вирусных инфекций
- 2) токсинемических (токсических, токсигенных) инфекций
- 3) бактериальных инфекций
- 4) смешанных инфекций

#### **2. ШТАММ МИКРООРГАНИЗМА СО СНИЖЕННОЙ ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ, КОТОРЫЙ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ, НАЗЫВАЕТСЯ**

- 1) аттенуированный
- 2) девергентный
- 3) рекомбинантный
- 4) инактивированный

#### **3. ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРИОБРЕТЕННОГО ИСКУССТВЕННОГО АКТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЧЕЛОВЕКА ИСПОЛЬЗУЮТСЯ**

- 1) иммуноглобулины
- 2) вакцины
- 3) аллергены
- 4) бактериофаги

#### **4. ВАКЦИНУ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ПЕРВЫМ РАЗРАБОТАЛ**

- 1) И.И. Мечников
- 2) Р. Кох
- 3) Э. Дженнер

4) Л. Пастер

5. АДЬЮВАНТЫ ВКЛЮЧАЮТ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ ДЛЯ

- 1) увеличения срока годности
- 2) повышения иммуногенности
- 3) снижения реактогенности
- 4) консервации

6. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СЫВОРОТКА, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) люминесцирующая
- 2) агглютинирующая
- 3) преципитирующая
- 4) гетерогенная

7. ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ ДИАГНОСТИКУМ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ

- 1) РНГА
- 2) ИФА
- 3) РИФ
- 4) РИА

8. ИНФЕКЦИОННЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ ПРИМЕНЯЮТСЯ ДЛЯ

- 1) лечения инфекционных заболеваний
- 2) профилактики инфекционных заболеваний
- 3) диагностики инфекционных заболеваний
- 4) выявления атопических аллергий

9. ДИАГНОСТИКУМ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ

- 1) выявления антител в сыворотке крови
- 2) обнаружения возбудителя
- 3) идентификации возбудителя
- 4) выявления нуклеиновых кислот возбудителя

10. ПРОБИОТИКИ ПРИМЕНЯЮТСЯ ДЛЯ

- 1) лечения вирусных инфекций
- 2) коррекции дисбактериоза
- 3) диагностики инфекционных заболеваний
- 4) профилактики инфекционных заболеваний

## Ситуационные задачи

**Задача 1.** В лечебное учреждение поступили следующие препараты: чумная вакцина, холерная вакцина, адсорбированный столбнячный анатоксин, противостолбнячная сыворотка, противосибиреязвенный иммуноглобулин.

1. *Дать полное название иммунитета, который создают эти препараты.*
2. *Указать цель их применения.*
3. *Выбрать из этих препаратов живые и убитые вакцины.*

**Задача 2.** Врач-педиатр для проведения вакцинации детей получил вакцину БЦЖ.

1. *Указать тип вакцин, к которому относится БЦЖ.*
2. *Перечислить способы введения и цель применения вакцины.*
3. *Дать полное название иммунитета, который создается после введения этой вакцины.*

**Задача 3.** В хирургическое отделение поступил больной с открытым переломом. Лечащий врач счел необходимым ввести ему противостолбнячную сыворотку.

1. *Указать цель введения сыворотки больному.*
2. *Указать метод получения данного препарата.*
3. *Перечислить правила введения противостолбнячной сыворотки.*
4. *Перечислить вид иммунитета, который будет сформирован и его длительность.*

**Задача 4.** Для работы в медицинское учреждение поступили следующие препараты: АДС, АД, АС.

1. *Указать цель применения этих препаратов.*
2. *Описать метод получения этих препаратов.*
3. *Перечислить инфекции, против которых применяются данные препараты.*
4. *Указать способы введения этих препаратов.*

**Задача 5.** В хирургическом отделении городской больницы в комплекс лечения больных с хирургическими ранами, инфицированными стафилококком, включили стафилококковый бактериофаг.

1. *Перечислить возможные способы введения бактериофага при лечении гнойных ран.*
2. *Указать методы получения бактериофагов.*

## **ЗАНЯТИЕ № 17. Итоговое по разделу «Инфекция и иммунитет»**

**Цель занятия:** промежуточный контроль знаний студентов по теме «Инфекция и иммунитет».

### **Вопросы для итогового контроля:**

1. Понятие об инфекционном процессе. Механизмы, пути и факторы передачи инфекции. Входные ворота инфекции.
2. Формы инфекционного процесса и стадии инфекционного заболевания.
3. Понятие о патогенности микробов. Вирулентность. Факторы патогенности. Адгезия, колонизация и инвазия. Определение ферментов патогенности (лецитиназы, плазмокоагулазы, гиалуронидазы и гемолизина).
4. Экзотоксины бактерий, их свойства, классификация, механизм действия, получение и применение.
5. Эндотоксины, химический состав, свойства, механизм действия. Отличия экзо- и эндотоксинов.
6. Экспериментальная инфекция. Цели и способы заражения животных. Этика экспериментальных исследований.
7. Понятие о факторах неспецифической резистентности организма. Внешние и внутренние барьеры, клеточные и гуморальные факторы.
8. Фагоцитоз. Клетки, участвующие в фагоцитозе. Стадии и виды фагоцитоза. Кислород-зависимые и кислород-независимые механизмы бактерицидности. Опсонины. Методы изучения фагоцитарной активности клеток.
9. Гуморальные факторы резистентности. Лизоцим, нормальные антитела, белки острой фазы.
10. Комплемент, понятие, роль в реакциях неспецифической резистентности, механизм действия. Классический и альтернативный пути активации комплемента.
11. Интерфероны, природа, механизм действия, способы получения, применение. Понятие об интерфероногенах.
12. Понятие об иммунитете, его виды. Пути формирования естественного и искусственного иммунитета.

13. Функции иммунной системы. Центральные и периферические органы иммунной системы.
14. Генез иммунокомпетентных клеток (макрофаги, В-, Т-лимфоциты). Клеточная кооперация в иммунном ответе.
15. Понятие об антигенах, их строение и свойства. Антигены бактерий и вирусов.
16. Антитела (иммуноглобулины), структура, классы, функции. Понятие о моноклональных антителах. Гибридомы, получение, применение.
17. Антителообразование: первичный и вторичный иммунный ответ. Иммунологическая память.
18. Типы иммунного ответа при инфекционных заболеваниях.
19. Схема Th1 ответа. Эффекторы клеточного ответа.
20. Схема Th2 ответа. Эффекторы гуморального ответа.
21. Антитоксический иммунитет и его особенности.
22. Антивирусный иммунитет и его особенности.
23. Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма.
24. Реакция агглютинации, ее разновидности, механизм и техника постановки.
25. Реакции пассивной агглютинации. Реакции ко-агглютинации, латекс-агглютинации и непрямой гемагглютинации. Механизм и применение.
26. Реакция преципитации, ее разновидности, механизм и применение.
27. Серологические реакции с использованием метки. Реакция иммунофлюоресценции (прямая и непрямая РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА). Механизм реакций.
28. Имунноблоттинг. Механизм и применение.
29. Типы вакцин. Получение живых, убитых, субъединичных и рекомбинантных вакцин. Проверка их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
30. Анатоксины. Получение анатоксинов. Адъюванты, механизм их действия.
31. Получение лечебных иммуноглобулинов и антитоксических сывороток. Проверка их реактогенности и иммуногенности.
32. Диагностические препараты. Антигенные препараты (диагностикумы, эритроцитарные диагностикумы, антигены).

33. Диагностические сыворотки. Получение и применение. Способ получения адсорбированных агглютинирующих сывороток по Ка-стеллани.
34. Аллергия. Классификация гиперчувствительности по Желлу и Кумбсу.
35. IV тип гиперчувствительности (клеточноопосредованный), его роль в инфекционном процессе. Реализация механизмов клеточного типа аллергии в нестерильном иммунитете.
36. Механизм кожно-аллергических реакций. Инфекционные аллергены как диагностические препараты.
37. Роль I типа (анафилактического) и III типа (иммунокомплексного) аллергических реакций в развитии побочных эффектов серотерапии. Правила введения гетерологических сывороток и иммуноглобулинов.

## ЗАНЯТИЕ № 18. СЕМИНАР: Организация и регуляция генетической системы прокариот

**Цель занятия:** изучить организацию и регуляцию генетической системы прокариот. Разобрать схему постановки генетических методов, применяемых для диагностики инфекционных заболеваний.

### План занятия

1. Проведение тест-контроля.
2. Студенческие доклады по теме занятия.
3. Обсуждение студенческих докладов и актуальных вопросов генетики прокариот.

### Информационный блок

#### Генетическая система бактерий

Генетическая система бактерий состоит из ядерных и внеядерных структур. Аналог ядра прокариотов значительно отличается от ядра эукариотических клеток. Он представлен *нуклеоидом*, лишенным оболочки и включающем в себя почти всю ДНК бактерии. Бактериальная хромосома состоит из одной *двунитевой молекулы ДНК кольцевой формы*. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый *нуклеотид* состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы. Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин., цитозин). Каждый нуклеотид обладает полярностью. У него имеются дезоксирибозный 3'-конец и фосфатный 5'-конец. Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку фосфодиэфирными связями между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого. Соединение между двумя цепочками обеспечивается водородными связями комплементарных азотистых оснований: аденина с тимином, гуанина с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом конце линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка.

Каждому белку соответствует свой *ген*, то есть дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов. Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов. Совокупность всех генов называется *геномом*. Внешнее проявление генома называется *фенотипом*. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей царства *Procaryotae* варьируют от  $3 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^9$  Д. Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы всегда сопровождается ее делением. Генетическая информация в бактериях может содержаться во *внеядерных* (внехромосомных) молекулах ДНК, представленных плазмидами, транспозонами и инсерционными (вставочными) последовательностями. Они не являются жизненно необходимыми, так как не кодируют информацию о синтезе ферментов, участвующих в метаболизме бактериальной клетки.

*Плазмиды бактерий* представляют собой двунитевые молекулы ДНК размером от  $10^6$  до  $10^8$  Д, несущие от 40 до 50 генов. Количество плазмид в бактериальной клетке может быть от 1 до 200. Выделяют плазмиды, находящиеся в виде отдельной замкнутой молекулы ДНК (*эписомы*) и встроенные в хромосому бактерии (*интегрированные плазмиды*). Плазмиды выполняют регуляторные и кодирующие функции. Первые направлены на компенсацию метаболических дефектов, вторые вносят в бактерию информацию о новых признаках. Как составляющая часть генетического материала бактерии плазмиды играют важную роль в ее жизнедеятельности, детерминируя такие характеристики, как способность продуцировать экзотоксины, ферменты или бактериоцины, устойчивость к лекарственным препаратам и т. д.

Удвоение ДНК некоторых плазмид индуцирует деление бактерий, то есть увеличивает их «плодовитость». Такие плазмиды обозначают как *F-плазмиды* или F-факторы (от англ. *fertility* – плодовитость). Интегрированные F-плазмиды называют *Hfr-плазмиды* или Hfr-факторы (от англ. *high frequency of recombinations* – высокая частота рекомбинаций). Hfr-факторы осуществляют перенос части генетической информации данной хромосомы в другую клетку.

Плазмиды, детерминирующие устойчивость к лекарственным препаратам, называются *R-плазмидами* или R-факторами (от англ. *resistance* – устойчивость). R-плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, которые разрушают антибактериальные препараты. В результате бактериальная клетка

становится устойчивой к действию целой группы лекарственных веществ. Многие R-плазмиды являются трансмиссивными и, распространяясь в популяции бактерий, переносят резистентность к воздействию антибактериальных препаратов.

*Плазмиды патогенности* контролируют вирулентные свойства микроорганизмов, детерминируя синтез факторов патогенности. Так, например, Ent-плазида определяет синтез энтеротоксина. Развитие инфекционного процесса, вызванного возбудителями чумы, сибирской язвы, кишечного иерсиниоза, клещевого иксодового боррелиоза связано с функционированием плазмид патогенности.

*Конъюгативные плазмиды* переносятся от бактерии к бактерии внутри вида или между представителями близкородственных видов в процессе конъюгации. Чаще всего конъюгативными плазмидами являются F- или R-плазмиды. Подобные плазмиды относительно крупные (25-150 млн Д) и часто выявляются у грамотрицательных палочек. Большие плазмиды обычно присутствуют в количестве 1-2 копий на клетку и их репликация тесно связана с репликацией бактериальной хромосомы.

*Неконъюгативные плазмиды* обычно имеют небольшие размеры и характерны для грамположительных кокков, но встречаются также у некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, у *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Мелкие плазмиды могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку), так как только наличие такого количества обеспечивает их распределение в потомстве во время клеточного деления. При наличии в бактерии одновременно конъюгативных и неконъюгативных плазмид донор может передавать и неконъюгативные плазмиды за счет связывания генетического материала последних с факторами, обеспечивающими их перенос в процессе конъюгации.

*Подвижные генетические элементы* входят в состав бактериального генома, бактериальной хромосомы и плазмид. К ним относятся *вставочные последовательности* в ДНК и *транспозоны*. Вставочные или инсерционные последовательности (Is-элементы) представляют собой участки ДНК, способные перемещаться из одного места локализации в другое, и содержат только гены, необходимые для перемещения. Is-последовательности осуществляют координацию взаимодействий плазмид, умеренных фагов, транспозонов и нуклеоида для обеспечения репродукции; регулируют

активность генов бактериальной клетки. Они могут инактивировать гены, в которые включились («выключение» гена) или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего или выключающего транскрипцию соответствующих генов.

*Транспозоны* (Tn) – это сегменты ДНК, состоящие из вставочных последовательностей и структурных генов, обеспечивающих синтез молекул со специфическими биологическими свойствами (токсичность, устойчивость к антибиотикам и др.). Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и размножаются только в составе бактериальной хромосомы.

### **Репликация бактериальной ДНК**

Воспроизведение генетического материала бактерий осуществляется в процессе *репликации*, которая у бактерий протекает по полуконсервативному механизму. Это означает, что каждая из двух цепочек ДНК хромосомы или плазмиды служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепочки ДНК. В процессе репликации участвует комплекс ферментов. Репликация начинается с момента расплетения двунитевой структуры ДНК, которое осуществляется ферментом *ДНК-гидролазой*. При этом формируются две репликативные вилки, которые двигаются в противоположных направлениях, пока не встретятся. Формирование новой дочерней цепи осуществляется ферментом *ДНК-полимеразой*. Особенностью функционирования ДНК-полимеразы является ее способность присоединять комплементарные матрице нуклеотиды к свободному 3'-концу растущей цепочки. Поэтому для осуществления реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепочки ДНК-полимеразе требуется затравка, которая называется *праймером* (от англ. *primer*- запал). Праймер представляет собой короткую нуклеотидную цепочку, комплементарную матричной цепочке со свободным 3'-концом. На этом свойстве ДНК-полимеразы основана полимеразная цепная реакция (ПЦР), широко используемая в диагностике инфекционных заболеваний. Две цепи двойной спирали ДНК комплементарны друг другу. На каждой цепи из структурных элементов ДНК – дезоксирибонуклеозидтрифосфатов – синтезируется новая цепь; при этом с каждым из оснований спаривается комплементарное ему основание, так что каждая из двух новых цепей будет комплементарна родительской цепи. Обе новые двойные цепи состоят из одной родительской и одной вновь

синтезированной цепи. Такая точная репликация ДНК гарантирует сохранение генетической информации.

ДНК бактерий, будучи носителем наследственной информации, сама не служит матрицей для синтеза полипептидов. Биосинтез белков происходит на *рибосомах*, которые непосредственно с ДНК не соприкасаются. Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет *матричная* или *информационная* РНК (мРНК). Она состоит из одной цепи и отличается от одиночной цепи ДНК тем, что тимин (Т) в РНК заменен урацилом (U). мРНК синтезируется на одной из цепей ДНК, причем механизм этого процесса сходен с механизмом репликации ДНК. Образование мРНК начинается на 5'-конце, и по последовательности оснований ее цепь комплементарна цепи ДНК. Этот процесс называется *транскрипцией*, а перевод нуклеотидной последовательности в последовательность аминокислот – *трансляцией*.

Каждый ген представлен определенным участком молекулы ДНК. Специфическая информация, содержащаяся в гене, определяется последовательностью оснований в цепи ДНК. Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, определяются последовательностью аминокислот в полипептидных цепях.

Эта же последовательность определяет и пространственную структуру белка – *конформацию*.

Так растет полипептидная цепь по мере продвижения рибосомы вдоль мРНК. Одновременно происходит закручивание этой цепи и свертывание ее в клубок, определяемое последовательностью аминокислот и природой их боковых цепей (гидрофобные и гидрофильные группы), и в результате возникает структура, обуславливающая специфические свойства и функцию данного белка. К мРНК обычно прикрепляется несколько рибосом, так что на одной и той же матрице одновременно синтезируются несколько полипептидных цепей. На конце мРНК находится кодон, от которого зависит отделение сформированной полипептидной цепи от рибосомы.

Таким образом, нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой закодированную «инструкцию», определяющую структуру специфического белка. Этот универсальный процесс передачи информации при репликации ДНК, транскрипции и трансляции применим как к эукариотам, так и к прокариотам.

## Регуляция выражения генетической информации у бактерий

Бактериальная клетка способна запустить или прекратить синтез того или иного фермента в зависимости от присутствия соответствующего субстрата. Для этого бактериальные гены объединены в группы (*кластеры*) таким образом, что все ферменты, необходимые для осуществления определенного пути биосинтеза, детерминируются генами, сцепленными друг с другом. Вся группа генов может транскрибироваться в одну полицистронную мРНК, которая последовательно транслируется рибосомами с образованием каждого из белков. Такая форма организации позволяет координировано регулировать выражение всех генов одной единицы транскрипции.

Экспрессия генов у прокариот регулируется главным образом на уровне транскрипции. Роль сигнальных веществ для запуска транскрипции играют *молекулы-эфффекторы*, представляющие собой низкомолекулярные соединения, которые являются либо субстратом для фермента, либо продуктом ферментативной деятельности соответственно. Индукция и репрессия представляют собой разные стороны одного и того же явления. Малые молекулы, индуцирующие образование ферментов, способных метаболизировать их, называются *индукторами*. Те же, которые предотвращают образование ферментов, способных синтезировать их, – *корепрессорами*.

Молекулы-эфффекторы не могут вступать в прямое взаимодействие с ДНК, посредником для них служит специальный *регуляторный белок*. Регуляторный белок, который связывается с ДНК в отсутствии индуктора, называется *репрессором*.

За синтез регуляторных белков ответственны *регуляторные гены*. В присутствии белка-репрессора транскрипция блокирована; его удаление обуславливает доступ РНК-полимеразы к генам и запуск транскрипции. Прекращение синтеза фермента при помощи белка-репрессора получило название *репрессии*. Репрессия позволяет бактериальной клетке избежать перевода своих ресурсов на ненужную в данный момент синтетическую активность. Если индуктор присутствует в клетке в высокой концентрации, то в результате специфического присоединения к регуляторному белку он изменяет его конформацию и тем самым – его способность связываться с ДНК.

Контроль транскрипции достигается взаимодействием регуляторного белка с регуляторным сайтом, называемым

*оператором*, который расположен между структурными генами и *промотором* (участком, распознаваемым ДНК-зависимой РНК-полимеразой). Промотор служит местом связывания РНК-полимеразы, и от него начинается транскрипция. Совокупность промотора, оператора и структурных генов образует *оперон*. Оперон является функциональной генетической единицей, регулирующей экспрессию одного или группы генов.

### **Перенос генетического материала бактерий**

Обмен генетическим материалом у бактерий осуществляется путем генетических рекомбинаций. Под *генетической рекомбинацией* подразумевают взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинаций ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей. Особенности рекомбинаций у бактерий определяются отсутствием истинного полового процесса и мейоза у прокариот и гаплоидным набором генов. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые этот материал воспринимают. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, то есть один или несколько генов. Образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включением фрагментов хромосомы донора.

Рекомбинация может быть *гомологичной*, при которой в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Встречается также *сайт-специфическая* рекомбинация, которая происходит только в определенных участках (сайтах) генома и не требует высокой степени гомологии ДНК, например, включение плазмиды в хромосому бактерии. Передача генетического материала между бактериями осуществляется 3-мя механизмами: конъюгацией, трансдукцией и трансформацией.

*Конъюгация* – это перенос генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками. Необходимым условием конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается из клетки-донора в клетку-реципиент. В результате такого переноса

клетка-реципиент получает донорские свойства. Интегративной трансмиссивной плазмидой является F-фактор. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как  $F^+$ -клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора –  $F^-$  -клетки. Если F-фактор встраивается в хромосому клетки-донора и начинает функционировать в виде единого с хромосомой трансмиссивного репликона, то хромосома донора приобретает способность передаваться в клетку-реципиент. Донорские клетки, имеющие встроенный в хромосому F-фактор, называются *Hfr-клетками*. Хромосомная ДНК реплицируется, одна цепь копии хромосомы переносится в реципиентную  $F^-$ -клетку, тогда как другая остается в  $Hfr^+$ -клетке, то есть донор сохраняет свое генетическое постоянство.

Передача генетического материала при конъюгации начинается с расщепления ДНК в районе локализации F-фактора. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в клетку-реципиент. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры нить ДНК рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Биологическая значимость конъюгации хорошо видна на примере распространения резистентности бактерий к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам бактерия может получить в результате мутации, что происходит 1 раз на каждые  $10^6$  клеточных делений. Однако, однажды изменившись, генетическая информация может быстро распространяться среди сходных бактерий посредством конъюгации, поскольку каждая третья из близкородственных бактерий способна именно к этому типу генетического переноса.

*Трансформация* – передача генетической информации через выделенную из клетки-донора ДНК. Процесс трансформации может произвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще грамположительных, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется рестрикционными эндонуклеазами; но при некоторых условиях такая ДНК может быть интегрирована в геном бактерии. По происхождению ДНК может быть плазмидной либо хромосомной и нести гены, трансформирующие реципиента. Подобным путем процессы трансформации могут распространять гены, кодирующие

факторы вирулентности, среди бактериальных популяций; однако в обмене генетической информацией трансформация играет незначительную роль.

Трансформация служит хорошим инструментом для картирования хромосом, поскольку трансформированные клетки включают различные фрагменты ДНК. Определение частоты одновременного приобретения двух заданных характеристик (чем ближе расположены гены, тем более вероятно, что они оба включатся в один и тот же участок ДНК) дает информацию о взаиморасположении соответствующих генов в хромосоме. Перенос экстрагированной ДНК является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

*Трансдукция* – передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. В процессе репликации фага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится вместе с ней в бактерию-реципиент. При этом фаговые частицы, как правило, дефектны, они теряют способность к репродукции. Так как трансдуцируются лишь небольшие фрагменты ДНК, вероятность рекомбинации, затрагивающей какой-то определенный признак, очень мала: она составляет от  $10^{-6}$  до  $10^{-8}$ . Существуют три типа трансдукции: неспецифическая (общая), специфическая и abortивная.

*Общая (неспецифическая) трансдукция* – перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. В клетке, инфицированной бактериофагом, в ходе сборки дочерней популяции в головки некоторых фагов может проникнуть фрагмент бактериальной ДНК или плазмиды либо вместе с вирусной ДНК, либо вместо нее. Этот процесс происходит вследствие того, что бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инфекции, и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц. При такой форме трансдукции в клетки-реципиенты могут быть внесены практически любые гены. Феномен неспецифической трансдукции может быть использован для картирования бактериальной хромосомы.

*Специфическая трансдукция* наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактерию с образованием профага. При исключении ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате

случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы. Так как большинство умеренных фагов интегрируют в бактериальную ДНК в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК донора. Специфическая трансдукция может служить механизмом переноса вирулентных генов среди бактерий при условии, что эти гены локализованы в непосредственной близости от мест интеграции профага.

Наиболее характерным примером служит трансдукция, осуществляемая фагом  $\lambda$ . Обычно он трансдуцирует определенные гены: *gal* (кодирует синтез галактозы) и *bio* (кодирует синтез биотина). При переходе в состояние профага фаг  $\lambda$  включается в определенный участок хромосомы бактерии-хозяина – между генами *gal* и *bio*. Отделение фаговой ДНК от бактериальной хромосомы может происходить неточно и какой-то фрагмент ее останется в хромосоме, а близко расположенные гены будут захвачены фаговой ДНК. В случае заражения трансдуцирующим фагом клеток, дефектных по определенному гену, например, *gal<sup>-</sup>*, может произойти рекомбинация с заменой собственного дефектного гена бактерии интактным трансдуцированным геном с образованием рекомбинанта (трансдуктанта) *gal<sup>+</sup>*.

**Абортивная трансдукция.** При абортивной трансдукции внесенный фрагмент ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует. Впоследствии он передается одной из дочерних клеток (то есть наследуется однолинейно) и затем теряется в потомстве.

### **Генетическая изменчивость бактерий**

Изменения бактериального генома могут происходить в результате мутаций. **Мутации** – это изменения в последовательности нуклеотидов ДНК, проявляющиеся наследственно закрепленной утратой или изменением какого-либо признака или группы признаков. В их основе лежат ошибки копирования наследственной информации, возникающие при репликации. Фенотипическим проявлением мутации могут быть: изменение морфологии бактериальной клетки, возникновение потребности в факторах роста (например, в аминокислотах, витаминах), то есть ауксотрофность;

появление устойчивости к антибиотикам; изменение чувствительности к температуре; снижение вирулентности (*аттенуация*). Мутации у бактерий носят ненаправленный характер.

Мутации могут быть спонтанными, то есть возникающими самопроизвольно, без воздействия извне, и индуцированными. *Спонтанные* мутации появляются в результате ошибок репликации ДНК, неправильного формирования комплементарных пар оснований, структурных искажений ДНК и вследствие перемещения подвижных генетических элементов в процессе роста и размножения популяции бактерий. Спонтанные мутации могут обуславливать благоприятные и неблагоприятные генетические изменения. Вероятность возникновения определенных мутаций в расчете на одну клетку и на одну генерацию называют частотой мутирования. При высоких скоростях роста она постоянна, и ее обычно определяют для клеток в экспоненциальной фазе роста при оптимальных условиях среды. В фенотипе проявляются не все мутации. Непроявленные мутации называются *молчащими*. У мутанта может произойти *обратная* мутация или *реверсия*, в результате которой восстановятся свойства дикого штамма. Об истинной обратной мутации говорят лишь в тех случаях, когда вторая мутация точно восстанавливает исходный генотип, если же восстанавливается только фенотип, то говорят о *вторичной реверсии* или *супрессорной* мутации. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интрагенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

*Индукцированные* мутации возникают под влиянием внешних факторов, которые называют *мутагенами*. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи,  $\gamma$ -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например, 2-аминопурин, азотистая кислота и ее аналоги, алкилирующие агенты и др.) и биологическими (транспозоны).

По протяженности повреждений мутации бывают *точечными*, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и *протяженными (аберрациями)*. Мутации разделяют на *хромосомные*, обуславливающие появление нового признака при изменении двух и более участков хромосомы, и *генные*, обусловленные появлением нового признака при изменении гена. В этом случае может наблюдаться *модификации* оснований (изменения отдельных нуклеотидов), выпадение нескольких пар нуклеотидов (*делеции*),

перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы (*транспозиция*), разрыв путем вставки посторонней ДНК (*инсерция*) или добавление нуклеотидных пар (*дупликация*) и деформации спирали ДНК. Для точечных мутаций частота реверсий довольно высока, в то время как для аббераций реверсии не характерны.

Первичный эффект мутагенного фактора не обязательно ведет к истинной мутации. Новый фенотип проявляется только тогда, когда измененный ген начнет функционировать. С помощью различных методов удастся накапливать и выделять мутантов с разного рода дефектами: с нарушением процессов транспорта или использования субстрата, с дефектами промежуточного обмена, с повышенной чувствительностью к температуре и т. д.

Теоретически мутации, вызванные радиацией, химическими веществами или другими факторами, могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции, однако в любой живой клетке существуют биохимические механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих реакции коррекции повреждений ДНК, составляют *системы репарации*, которые принципиально различаются по биохимическим механизмам восстановления генома. Известны три основных механизма коррекции дефектов ДНК:

- 1) непосредственная реверсия от поврежденной ДНК к исходной структуре;
- 2) эксцизия («выпадение») повреждений с последующим восстановлением исходной структуры;
- 3) активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям.

*Реверсия повреждений ДНК.* К механизмам прямой реверсии повреждений ДНК относится *световая репарация* или *фотореактивация* (исправление деформации ДНК под действием УФ-лучей). Световая репарация осуществляется несколькими ферментами: фотолиазой (расщепляет тиминовый димер и восстанавливает целостность соседних тиминовых оснований),  $O^6$ -метилтрансферазой (удаляет  $O^6$ -метильную группу из остатков гуанина после действия метилирующих агентов), ДНК-пурин инсертазой (осуществляет встраивание утерянного при мутации основания в апуриновый сайт), ДНК-гликозилазой (удаление дефектных оснований). Все эти процессы происходят в один этап под

действием конкретного фермента и безошибочно восстанавливают исходную структуру ДНК.

Системы *эксцизионной репарации* удаляют неправильно спаренные или поврежденные основания из ДНК и синтезируют новую последовательность ДНК, замещающую их. Место повреждения распознает эндонуклеаза, расщепляющая цепь ДНК вблизи дефекта, фрагмент удаляется, а дефект восполняется при помощи ДНК-полимеразы, которая проникает в брешь и встраивает в нее отсутствующие нуклеотиды, используя неповрежденную цепь ДНК в качестве матрицы. ДНК-лигаза ковалентно связывает 3'-конец вновь синтезированного участка ДНК с цепочкой. Поскольку эта система репарации основана на ресинтезе нуклеотидной цепи на базе неповрежденной матрицы, она также является практически безошибочной.

*Репарационные механизмы устойчивости к повреждениям ДНК.* Кроме механизмов исправления повреждений клетки имеют возможность «обойти» вызванную повреждениями блокаду репликации ДНК, например, путем репарации в процессе рекомбинации.

### **Фенотипическая изменчивость бактерий**

Временные, наследственно не закрепленные изменения, называются *модификациями*. Модификации также контролируются геномом бактерий, но (в отличие от мутаций) не сопровождаются изменениями кодирующей структуры и быстро утрачиваются. Чаще всего у бактерий отмечаются *морфологические* (приводящие к обратимым изменениям формы) и *биохимические* (проявляются индуцибельным синтезом некоторых продуктов, чаще ферментов) модификации. Модификации возникают как адаптивные реакции бактериальных клеток на изменения окружающей среды, что позволяет им быстро приспосабливаться и сохранять численность популяции на жизнеспособном уровне. После устранения соответствующего воздействия, вызвавшего их образование, бактерии возвращаются к исходному фенотипу.

Стандартное проявление модификации – разделение однородной популяции на несколько типов. Этот феномен получил название *диссоциация микробов*. Обычно диссоциации возникают в условиях, неблагоприятных для исходной популяции. Примером диссоциации может служить изменение вида и структуры бактериальных колоний

на твердых питательных средах. Для обозначения диссоциирующих колоний используют первые буквы английских названий: *S-колонии* (от *англ. smooth* – гладкий); *R-колонии* (от *англ. rough* – шероховатый); *M-колонии* (от *англ. mucoid* – слизистый) и *D-колонии* (от *англ. dwarf* – карликовый). Диссоциации сопровождаются изменениями биохимических, морфологических, антигенных и патогенных свойств возбудителей.

Изменение фенотипа следует считать модификацией, если выполняются три основных условия: 1) определенность (связь изменения фенотипа с определенным фактором); 2) общность изменений в популяции; 3) обратимость (восстановление признака после прекращения действия фактора).

### **Применение генетических методов в диагностике Инфекционных заболеваний**

Для диагностики инфекционных заболеваний генетическими методами маркером возбудителя является его геном. Методы индикации нуклеиновых кислот применяют для диагностики вирусных инфекций, для идентификации бактерий (особенно таких, которые трудно выделить) и для определения точного таксономического положения микроорганизмов. Методы позволяют обнаружить микроорганизм в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию ДНК без его выделения в чистую культуру.

**Метод молекулярной гибридизации** основан на способности ДНК и РНК специфически соединяться (*гибридизироваться*) с комплементарными олигонуклеотидными фрагментами, искусственно синтезированными и мечеными ферментом, флюорохромом или изотопом. Эти фрагменты называются *зондами*.

Для проведения молекулярной гибридизации молекулу исследуемой ДНК расплетают, одну нить закрепляют на специальном фильтре, который помещают в раствор, содержащий меченый зонд. Создаются условия, благоприятные образованию двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль. После окончания гибридизации и отмывания несвязавшихся продуктов проводится детекция образовавшегося комплекса при помощи соответствующей метки.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** основана на многократном увеличении числа копий (амплификации) определенного участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой. ПЦР – это очень чувствительный метод, теоретически для получения результата достаточно наличие в материале одной молекулы ДНК.

ПЦР состоит из трех основных этапов: подготовки исследуемой пробы (изоляция ДНК или РНК), собственно ПЦР и детекции продукта ПЦР (амплифицированной ДНК). При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР предварительно на этой РНК-матрице посредством фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы или ревертазы) синтезируют комплементарную ДНК, которая затем используется в качестве матрицы в ПЦР. После того, как из бактерий *Thermosus thermophilis* удалось получить ДНК-полимеразу, которая наряду с полимеразной обладает еще и обратнотранскриптазной активностью, удалось совместить эти две реакции. Этот вариант ПЦР широко применяется для детекции РНК-содержащих вирусов, определения экспрессии вирусных, бактериальных и клеточных генов по их РНК.

Для проведения ПЦР необходимы пять основных компонентов: 1) фермент ДНК-полимераза; 2) пара олигонуклеотидных праймеров; 3) набор нуклеотидов; 4) копируемая ДНК; 5) ионы  $Mg^{+2}$ , необходимые для функционирования ДНК-полимеразы.

Для амплификации (то есть синтеза ДНК-матрицы) отбирают наиболее консервативную часть, уникальный ген. Для запуска синтеза на ДНК-матрице используют 2 *праймера* (короткие, длиной 20-30 оснований одноцепочечные фрагменты ДНК), комплементарные 3'-концам ДНК искомого гена. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на две нити. Добавляют праймеры, затем смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками (*отжиг*). Добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. При температуре, оптимальной для функционирования ДНК-полимеразы, нуклеотиды присоединяются к 3'-концам праймеров, формируется специфический фрагмент (ампликон). После этого цикл повторяют снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз в 2 раза. Рассчитано, что за 30-40 циклов из одной матрицы можно получить  $10^8$  ампликонов. Реакцию проводят в специальных приборах –

амплификаторах. После 30-80 циклов накопления копий ДНК проводят их идентификацию методом гель-электрофореза и визуализацию в УФ свете после окрашивания этидием бромидом. Для подтверждения принадлежности ДНК возбудителю можно провести ДНК-гибридизацию.

### **Вопросы для подготовки к занятию**

1. Изучение генетической системы бактерий.
2. Репликация бактериальной ДНК.
3. Регуляция выражения генетической информации у бактерий.
4. Перенос генетического материала бактерий.
5. Генетическая изменчивость бактерий.
6. Фенотипическая изменчивость бактерий.
7. Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний.

## ЗАНЯТИЕ № 19. ИТОГОВЫЙ СЕМЕСТРОВЫЙ ЗАЧЕТ

**Цель занятия:** промежуточный семестровый контроль знаний студентов по курсу «Общая микробиология».

### **Вопросы для итогового семестрового зачета:**

#### **1. Морфология микроорганизмов**

1. Классификация прокариотов. Основные таксономические единицы. Понятие о виде, варианте, штамме, клоне.
2. Сравнительная характеристика прокариотов и эукариотов.
3. Морфология и анатомия бактерий. Постоянные компоненты бактериальной клетки. Цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, рибосомы, мезосомы, генофор, их строение, функции и значение для бактериальной клетки.
4. Особенности строения клеточной стенки грамположительных бактерий. Пептидогликан, тейхоевые кислоты, минорные и мажорные белки. Биологические свойства и значение для бактериальной клетки. Принцип окраски по Граму.
5. Особенности строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Липополисахарид: биологические свойства и значение для бактериальной клетки. Принцип окраски по Граму.
6. Особенности строения клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий. Метод окраски кислотоустойчивых бактерий. Формы бактерий, лишенные клеточной стенки: протопласты, сферопласты, L-формы.
7. Непостоянные компоненты бактериальной клетки. Включения, споры, капсула, жгутики и пили бактерий. Состав, биологическая роль, методы обнаружения.
8. Классификация, ультраструктура и химический состав актиномицетов. Методы обнаружения и роль в патологии человека.
9. Классификация и ультраструктура спирохет. Методы обнаружения и роль в патологии человека.
10. Классификация, ультраструктура и химический состав хламидий, риккетсий и микоплазм. Методы обнаружения и роль в патологии человека.
11. Морфология грибов. Принципы классификации. Строение дрожжевых (Blastomycetes) и плесневых (Hyphomycetes) грибов. Спо-

собы размножения грибов. Методы обнаружения и роль в патологии человека.

12. Классификация, структура и химический состав вирусов.

13. Классификация и химический состав бактериофагов. Строение бактериофага на примере Т-четного бактериофага кишечной палочки.

## **2. Физиология микроорганизмов**

1. Типы и механизмы питания бактерий. Классификация бактерий по типам питания. Транспорт метаболитов у бактерий: пассивная и облегченная диффузия, активный транспорт.

2. Способы получения энергии бактериями (дыхание, брожение). Методы культивирования и выделение чистой культуры анаэробов.

3. Рост и размножение бактерий. Фазы размножения бактерий в замкнутой среде (периодическая культура). Непрерывное культивирование. Промышленное культивирование бактерий.

4. Основные принципы культивирования бактерий. Аппаратура для культивирования микроорганизмов. Культуральные свойства бактерий.

5. Искусственные питательные среды, их классификация. Требования, предъявляемые к питательным средам.

6. Принцип и методы выделения чистых культур аэробных и анаэробных микроорганизмов.

7. Международная классификация и характеристика ферментов бактерий. Методы определения гликолитических и протеолитических ферментов бактерий. Идентификация бактерий по ферментативной активности.

8. Механизмы действия на микроорганизмы химических веществ. Дезинфекция. Асептика. Антисептика.

9. Действие физических факторов на микроорганизмы (температура, высушивание, свет, ультразвук, радиация). Стерилизация: методы, аппаратура, контроль режима стерилизации.

10. Антибиотики. Классификация антибиотиков по источнику получения, способу получения, по химической структуре, по механизму и спектру действия. Механизмы антибиотикорезистентности микроорганизмов. Пути преодоления устойчивости бактерий к антибиотикам.

11. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

12. Типы взаимодействия вируса с клеткой. Фазы репродукции вирусов.
13. Методы культивирования вирусов. Методы индикации вирусов в исследуемом материале.
14. Бактериофаги. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой. Умеренные и вирулентные фаги. Лизогения и фаговая конверсия.
15. Применение бактериофагов в медицине и биотехнологии. Получение препаратов бактериофагов.
16. Микрофлора организма человека. Биотопы. Понятие об аутохтонных, аллохтонных, резидентных и транзиторных микроорганизмах. Значение нормальной микрофлоры. Гнотобионты.
17. Дисбактериоз, причины его возникновения, методы диагностики и препараты для коррекции.

### **3. Генетика бактерий и вирусов**

1. Генетическая система бактерий. Генофор, плазмиды, транспозоны, Is-элементы; их функции и значение для бактериальной клетки.
2. Перенос генетического материала бактерий. Конъюгация, трансдукция и трансформация.
3. Фенотипическая и генотипическая изменчивость бактерий. Модификации, мутации и репарации. Значение мутаций и репараций в эволюции микроорганизмов.
4. Генетическая система вирусов. Типы вирусных нуклеиновых кислот и особенности их репликации. Понятие о позитивном и негативном РНК-геноме. Фенотипическая и генотипическая изменчивость вирусов.
5. Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### **4. Санитарная микробиология**

1. Микрофлора воздуха. Факторы, влияющие на количество микробов в воздухе. Методы исследования микрофлоры воздуха. Санитарно-показательные микроорганизмы воздуха.
2. Микрофлора воды. Факторы, влияющие на количество микробов в воде. Методы санитарно-бактериологического исследования и санитарно-показательные микроорганизмы воды. Показатели качества воды: общее микробное число, определение бактерий семейства Enterobacteriaceae и термотолерантных колиформных бактерий. Понятие о коли-титре и коли-индексе воды. Нормативы питьевой воды.

3. Микрофлора почвы. Факторы, влияющие на количественный и качественный состав видов почвенных микробов. Почва как фактор передачи инфекционных болезней. Методы санитарно-бактериологического исследования и санитарно-показательные микроорганизмы почвы. Основные санитарно-бактериологические показатели почвы.

## **5. Инфекция и иммунитет**

1. Понятие об инфекции. Формы инфекционного процесса и стадии инфекционного заболевания. Механизмы, пути и факторы передачи инфекции. Входные ворота инфекции.
2. Патогенность и вирулентность бактерий. Единицы измерения вирулентности. Факторы патогенности. Адгезия, колонизация и инвазия, ферменты патогенности. Эндотоксины и экзотоксины бактерий.
3. Понятие о резистентности (врожденном иммунитете) организма. Фагоцитоз: разновидности фагоцитов, стадии фагоцитоза, виды фагоцитоза, кислородзависимые и кислороднезависимые механизмы бактерицидности фагоцитов.
4. Гуморальные факторы резистентности. Система комплемента, ее структура, функции, пути активации, роль в иммунитете. Лизоцим, белки «острой фазы». Интерфероны: классификация, природа, способы получения и применение.
5. Понятие об иммунитете. Органы иммунитета. Структура и функции иммунной системы. Пути формирования естественного и искусственного иммунитета (активный, пассивный иммунитет).
6. Антигены: определение, строение, основные свойства. Антигены бактерий и вирусов.
7. Строение молекулы иммуноглобулина. Классы иммуноглобулинов, их характеристика, структура и функции. Антителообразование: первичный и вторичный ответы.
8. Схема Th1 иммунного ответа. Эффекторы клеточного иммунного ответа.
9. Схема Th2 иммунного ответа. Эффекторы гуморального иммунного ответа.
10. Особенности антибактериального, антитоксического и противовирусного иммунитета. Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма.
11. Реакция агглютинации. Механизм. Компоненты. Разновидности. Применение.

12. Реакция непрямой гемагглютинации. Механизм. Компоненты. Применение.
13. Реакция преципитации. Механизм. Компоненты. Разновидности. Применение.
14. Реакция иммунофлюоресценции. Механизм. Компоненты. Разновидности. Применение.
15. Иммуноферментный анализ. Механизм. Компоненты. Разновидности. Применение.
16. Аллергия: определение, понятие о сенсибилизации организма. Понятие о ГНТ и ГЗТ. Классификация гиперчувствительности по Джеллу и Кумбсу.
17. Т-зависимая гиперчувствительность, условия ее возникновения и роль в инфекционном процессе. Реализация механизмов ГЗТ в нестерильном иммунитете. Аллергические пробы, их механизм, применение.
18. Роль I типа (анафилактического) и III типа (иммунокомплексного) аллергических реакций в развитии побочных эффектов серотерапии. Правила введения гетерологических сывороток и иммуноглобулинов.
19. Живые вакцины, получение, применение. Достоинства и недостатки. Проверка их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
20. Убитые вакцины. Получение, применение. Достоинства и недостатки. Проверка их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
21. Субъединичные (химические) вакцины. Достоинства. Получение и применение. Роль адъювантов. Генно-инженерные вакцины. Принципы получения и применение.
22. Анатоксины. Получение, очистка, применение. Проверка их безвредности, реактогенности и иммуногенности.
23. Антитоксические сыворотки. Получение, очистка, титрование, применение. Проверка их реактогенности и иммуногенности. Осложнения при введении гетерологических сывороток и их предупреждение.
24. Препараты иммуноглобулинов. Получение, очистка, показания к применению. Проверка их реактогенности и иммуногенности.

## ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

| № практи-<br>ческого за-<br>нятия | Тест<br>1 | Тест<br>2 | Тест<br>3 | Тест<br>4 | Тест<br>5 | Тест<br>6 | Тест<br>7 | Тест<br>8 | Тест<br>9 | Тест<br>10 |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Занятие 1                         | 2         | 2         | 3         | 3         | 3         | 2         | 4         | 4         | 2         | 2          |
| Занятие 2                         | 1         | 3         | 1         | 3         | 1         | 1         | 3         | 1         | 3         | 1          |
| Занятие 3                         | 3         | 2         | 1         | 4         | 3         | 2         | 2         | 3         | 3         | 4          |
| Занятие 4                         | 3         | 3         | 2         | 2         | 1         | 4         | 3         | 3         | 1         | 2          |
| Занятие 6                         | 2         | 1         | 1         | 2         | 3         | 3         | 2         | 1         | 4         | 4          |
| Занятие 7                         | 3         | 2         | 1         | 2         | 4         | 3         | 2         | 2         | 1         | 3          |
| Занятие 8                         | 2         | 3         | 3         | 3         | 3         | 1         | 3         | 2         | 1         | 4          |
| Занятие 9                         | 3         | 2         | 4         | 4         | 3         | 1         | 4         | 3         | 3         | 2          |
| Занятие 10                        | 1         | 4         | 3         | 3         | 4         | 2         | 1         | 1         | 3         | 2          |
| Занятие 12                        | 2         | 3         | 1         | 1         | 1         | 2         | 3         | 1         | 2         | 4          |
| Занятие 13                        | 1         | 2         | 1         | 2         | 3         | 1         | 3         | 2         | 3         | 4          |
| Занятие 14                        | 4         | 1         | 2         | 3         | 1         | 2         | 3         | 1         | 2         | 1          |
| Занятие 15                        | 3         | 2         | 4         | 3         | 2         | 2         | 2         | 4         | 3         | 1          |
| Занятие 16                        | 2         | 1         | 2         | 4         | 2         | 2         | 1         | 3         | 1         | 2          |

## ОТВЕТЫ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Задачи к занятию № 1

#### Задача 1.

1. Это стрептококки.
2. Стрептококки делятся в одной плоскости и не расходятся после деления, поэтому в препаратах видны в виде цепочек.
3. К шаровидным микроорганизмам кроме стрептококков относятся еще микрококки, диплококки тетракокки, сарцины и стафилококки.

#### Задача 2.

1. Студент неправильно выбрал объектив для микроскопии окрашенного мазка. Окрашенные бактериальные мазки микроскопируются в иммерсионной системе с использованием объектива х90.
2. Студенту нужно было капнуть на окрашенный мазок иммерсионное масло, центрировать объектив х90, опустить его в каплю масла, осветить поле зрения и только тогда привести изображение.
3. Морфология бактерий изучается для того, чтобы определить разновидность микроорганизма.

#### Задача 3.

1. Студенту необходимо залить дезинфицирующим раствором разлитую питательную среду с микроорганизмом, подождать 20 минут и убрать тряпкой разлитый материал.
2. При работе в учебной лаборатории студент должен соблюдать определенные правила.
  - Вход студентов на кафедру микробиологии возможен только в халате, шапочке и второй обуви (бахилах).
  - Рабочее место следует содержать в чистоте, не загромождать посторонними предметами.
  - По окончании работы следует убрать все красители, реактивы, посуду, микробные культуры, препараты.
  - Использованные микробные культуры и предметы, загрязненные микроорганизмами, студенты должны отнести в «Автоклавную» для дальнейшего обезвреживания.
  - Студентам запрещается работать в лаборатории без преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

- К выполнению работы студент может приступать только после разрешения преподавателя. Приступая к работе необходимо: а) уяснить методику работы; б) подготовить рабочее место к работе; в) проверить соответствие взятых реактивов, сред, культур указанным в описании работы.
- По окончании работы необходимо: а) убрать реактивы, посуду, приборы; б) унести грязную посуду, использованные культуры в «Автоклавную»; в) убрать рабочее место; г) выключить воду, электричество.
- Пролитую на пол или стол культуру или кислоту студенты обезвреживают под руководством преподавателя или лаборанта в соответствии с установленными правилами.
- Перед зажиганием спиртовок нужно удостовериться, что корпус ее исправен, фитиль выпущен на нужную высоту, а горловина и держатель фитиля сухие. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя (иначе возможна вспышка паров внутри спиртовки и взрыв).
- Зажженную спиртовку нельзя переносить с места на место, нельзя зажигать одну спиртовку от другой. Гасить спиртовку нужно накрывая пламя фитиля колпачком. Задувать пламя запрещается.
- В рабочих помещениях запрещается: а) хранить личную одежду; б) убирать случайно пролитые опасные жидкости при зажженных спиртовках (в случае пролива огнеопасной жидкости спиртовки нужно немедленно погасить); в) уходить с рабочего места и оставлять без присмотра зажженные спиртовки (перед уходом даже на короткое время спиртовка должна быть погашена).

#### **Задача 4.**

1. Студент не зафиксировал препарат на пламени спиртовки и при промывке мазка все его содержимое смылось.
2. После приготовления мазка студенту нужно было высушить его и зафиксировать на пламени спиртовки, а уже потом покрасить.
3. Морфология бактерий изучается для того, чтобы определить разновидность микроорганизма.

#### **Задача 5.**

1. Студент не осветил препарат и поэтому не смог его рассмотреть.

2. Иммерсионная система позволяет повысить разрешающую способность микроскопа. При использовании иммерсионной системы уменьшается рассеяние света и тем самым увеличивается контраст изображения. Это особенно важно при исследовании слабо отражающих объектов.

## **Задачи к занятию № 2**

### **Задача 1.**

1. Это стафилококки.
2. Фиолетовый (сине-фиолетовый).
3. Этапы окраски микроорганизмов по Граму: 1. на мазок кладут фильтровальную бумагу и наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 1-2 мин; 2. снимают бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 мин; 3. сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 96<sup>0</sup> спирте в течение 30 с; 4. промывают водой; 5. красят 1-2 мин водным раствором фуксина; 6. промывают водой и высушивают.

### **Задача 2.**

1. Грамотрицательные палочки.
2. Розовый.
3. Палочки могут быть разные по размеру и толщине, могут располагаться цепочкой – стрептобактерии, могут образовывать споры (бациллы и клостридии), к палочкам относятся микобактерии, каринобактерии, бруцеллы и др.

### **Задача 3.**

1. Зерна валютина (включения).
2. Метод Нейссера.
3. Этапы окраски по Нейссеру: 1. фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синей краской на 4 мин, затем сливают краску; 2. промывают водой и наливают раствор Люголя на 20-30 с; 3. не промывая водой, окрашивают везувином 1-3 мин; 4. промывают водой, высушивают. Бактерии окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна валютина – в темно-синий, почти черный цвет.

#### **Задача 4.**

1. Обнаруженные кокки – грамотрицательны.
2. Это диплококки.
3. Окраска по Граму.
4. Мазок сначала окрашивают генциан-виолетом, затем обрабатывают раствором Люголя, который образует комплекс с красителем и закрепляет его, после этого обрабатывают спиртом. Спирт вымывает генциан-виолет из рыхлых клеточных стенок грамотрицательных микроорганизмов и не вымывает его из плотных клеточных стенок грамположительных микроорганизмов. Обесцвеченные грамотрицательные микроорганизмы окрашивают фуксином, и они приобретают розовый цвет, грамположительные остаются фиолетовыми.

#### **Задача 5.**

1. Стафилококки – это грамположительные круглые микроорганизмы, расположенные гроздьями.
2. Окраска по Граму.
3. Для окрашенных препаратов микроорганизмов применяют иммерсионную микроскопию. Это микроскопия с использованием объектива x90 и иммерсионное масло.

#### **Задачи к занятию № 3**

##### **Задача 1.**

1. Для выявления спор бактерий применяется метод Ожешко.
2. Методика окраски спор по Ожешко: на высушенный мазок наливают 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1-2 мин, препарат промывают водой и фиксируют над пламенем горелки, затем на мазок помещают фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля и осторожно нагревают на горелке до появления паров, операцию повторяют 2-3 раза, когда препарат остынет, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают препарат водой. Затем препарат погружают 2-3 раза в стакан с 5% серной кислотой на 1-2 с, тщательно промывают препарат водой и докрашивают щелочным метиленовым синим 3-5 мин, промывают водой и подсушивают.
3. Споры прочно удерживают карболовый фуксин и окрашиваются в красный цвет, цитоплазма бактерий обесцвечивается 5% серной

кислотой и после докрашивания метиленовым синим приобретает синий цвет.

### **Задача 2.**

1. Спорообразующие микроорганизмы называются бациллы и клостридии. Споры располагаются в микробной клетке терминально, субтерминально или центрально.
2. Споры выявляются методом Ожешко.

### **Задача 3.**

1. Чтобы определить подвижность, нужно приготовить нативный препарат «раздавленная капля» и промикроскопировать в темнопольном или фазовоконтрастном микроскопе.
2. Принцип устройства темнопольного микроскопа: лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоида), или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.
3. Принцип устройства фазовоконтрастного микроскопа: при прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным, необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива. Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

### **Задача 4.**

1. Чтобы установить наличие у него капсулы, нужно приготовить препарат и окрасить по Бурри-Гинсу.
2. Для этого на середину предметного стекла наносят каплю черной туши и смешивают ее с помощью петли с каплей культуры капсульных бактерий. Краем другого предметного стекла делают мазок по типу кровавого. Мазок сушат на воздухе и фиксируют в пламени горелки. Окрашивают 5 мин карболовым фуксином, раз-

веденным водой 1:3. Осторожно промывают водой, высушивают. Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выделяются на темном фоне препарата.

### **Задача 5.**

1. У бактерий жгутики располагаются по одному с одного полюса (монотрих), по пучку с одного полюса (лофотрих), по два с обоих полюсов или по пучку жгутиков на каждом полюсе (амфитрих), по всей поверхности бактерии (перитрих).
2. Чтобы определить подвижность, нужно приготовить нативный препарат «раздавленная капля» и промикроскопировать в темнопольном или фазовоконтрастном микроскопе.
3. Принцип устройства темнопольного микроскопа: лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид), или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.
4. Принцип устройства фазовоконтрастного микроскопа: при прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным, необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива. Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

## **Задачи к занятию № 4**

### **Задача 1.**

1. Микоплазмы.
2. Относятся к семейству *Mycoplasmataceae* класса *Mollicutes* (мягкокожие), роды *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. Цитоплазма этих микроорганизмов окружена только ЦПМ, клеточная стенка отсутствует. В связи с этим микоплазмы имеют разнообразную форму – шаровидную, нитевидную, колбовидную и могут менять ее в процессе жизнедеятельности. Величина разных видов микоплазм сильно

варьирует от 0,2 мкм (сферические тельца) до 150 мкм – нитчатые формы. Микоплазмы очень требовательны к составу питательных сред и культивируются на плотных и полужидких питательных средах, содержащих перевары сердца крупного рогатого скота, дрожжевые экстракты, комплекс витаминов группы В. Микоплазмы растут в толще питательной среды, образуют мелкие колонии, которые хорошо видны в проходящем свете и напоминают «яичницу-глазунью», так как имеют плотный центр и нежную периферию. Лечение микоплазмозов проводят антибиотиками из группы макролидов и тетрациклинов, так как к антибиотикам, действующим на клеточную стенку (В-лактамам), эти микроорганизмы не чувствительны.

3. Дыхательная система, опорно-двигательный аппарат (суставы) и мочевыделительная система.

4. Фазово-контрастная и темнопольная микроскопия в прижизненных препаратах, при световой микроскопии выявляются только крупные формы

### **Задача 2.**

1. Хламидии.
2. Хламидийные включения.
3. Элементарные ретикулярные и промежуточные тельца.
4. Хламидиоз.

### **Задача 3.**

Грибки имеют схожие признаки с растениями и животными.

С растениями объединяет:

- наличие клеточной стенки, вакуолей;
- неспособность к передвижению;
- особое поглощение питательных веществ;
- размножение и распространение спорами.

К организмам животного происхождения грибки приближают:

- гетеротрофный тип питания;
- потребность в витаминах;
- накопление в клетках гликогена, а не крахмала;
- способность к образованию хитина.

### **Задача 4.**

1. У грибов существуют два типа роста грибов – дрожжевой и гифальный.

2. У гифомицетов тело состоит из переплетающихся нитей – гиф.
3. У высших грибов гифы имеют перегородки – септы.
4. Конидии - это экзоспоры, они образуются на конидиеносцах.
5. Эндоспоры образуются в сумках.
6. Примером грибка, образующего эндоспоры, является *Mucor*.

### **Задача 5.**

1. Некоторые грибки могут проявлять феномен диморфизма, то есть в разных условиях грибки могут находиться в гифальном или дрожжевом состоянии.
2. Грибы рода *Candida*.
3. Многие грибки являются продуцентами антибиотиков. Некоторые обладают факторами патогенности и вызывают заболевания – микозы.
4. Для изучения морфологии грибов используют не окрашенные, нативные, препараты, приготовленные по методу «раздавленная капля» или препараты, окрашенные простыми методами. Рассматривать препараты грибов можно при использовании объективов 20, 40 и 90.

## **Задачи к занятию № 6**

### **Задача 1.**

1. Бактерии нуждаются в углероде, водороде, кислороде, азоте, сере, кальции, калии, фосфоре, магнии, железе, а также микроэлементах, таких как марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, хром, бром и др.
2. Микроэлементы активируют ферменты бактерий.
3. «Факторы роста» – это вещества, необходимые для жизнедеятельности бактерий. К ним относятся аминокислоты, витамины и др. По способности самим синтезировать «факторы роста» микроорганизмы подразделяются на ауксотрофы, для которых в питательную среду необходимо добавлять один или несколько «факторов роста», и прототрофы, которые не нуждаются в добавлении в среду таких факторов.

### **Задача 2.**

1. В клеточной стенке бактерий имеются специальные белки – порины, которые окаймляют каналы, пронизывающие клеточную стенку. Через эти каналы происходит проникновение питательных веществ в клетку. Порины бывают трех типов: порины I по-

рядка пронизывают и клеточную стенку, и ЦПМ; порины II порядка пронизывают клеточную стенку и открываются в периплазматическое пространство; порины III порядка имеют вставочный белок.

2. В клеточные стенки грамположительных бактерий входят порины I и III порядка, а грамотрицательных – I и II.
3. Существует три основных механизма транспорта питательных веществ в бактериальную клетку: простая диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт.
4. К механизму проникновения питательных веществ в бактерию, которые проходят с затратой энергии АТФ, относится активный транспорт.

### **Задача 3.**

1. Автотрофы – это микроорганизмы, способные получать углерод и другие необходимые вещества из  $\text{CO}_2$  и других неорганических соединений. Гетеротрофы – это микроорганизмы, способные получать углерод и другие необходимые вещества из органических соединений.
2. Хемотрофы – это микроорганизмы, способные использовать энергию химических реакций. Фототрофы – это микроорганизмы, способные использовать энергию света.
3. Литотрофы – это микроорганизмы, для которых окисляемым субстратом являются неорганические вещества. Органотрофы – это микроорганизмы, для которых окисляемым субстратом являются органические вещества.
4. Большинство патогенных микроорганизмов по типам питания относится к гетеротрофам, к хемоорганотрофам.

### **Задача 4.**

1. Бактерии, использующие органические вещества живых организмов, называются паразиты.
2. Микроорганизмы, которые могут размножаться только в живой клетке, называются облигатными паразитами. Микроорганизмы, которые могут размножаться и в живой клетке, и в питательной среде, называются факультативными паразитами.
3. К прокариотам, не способным размножаться вне живой клетки, относятся хламидии и риккетсии.

4. Эти микроорганизмы являются энергетическими паразитами, они не способны самостоятельно получать энергию, а могут использовать энергию живой клетки, в которой размножаются.

#### **Задача 5.**

1. Чтобы среда была плотной, в нее добавляют 1,5-2% агара.
2. Агар получают из морских водорослей агар-агар.
3. Питательная среда должна быть стерильна, изотонична, должна иметь определенную влажность, определенный состав, pH 7,2-7,4.
4. Основной плотной питательной средой, используемой в бактериологии, является МПА – мясопептонный агар.

### **Задачи к занятию № 7**

#### **Задача 1.**

1. Студент выбрал неправильную среду для культивирования облигатного анаэроба *Clostridium perfringens* и не выдержал анаэробные условия культивирования.
2. Лучше всего было бы посеять данный микроорганизм в среду Китта-Тароцци, залить посев стерильным вазелиновым маслом и культивировать.
3. Культивируемый микроорганизм погиб из-за токсического действия кислородных радикалов токсичных форм кислорода, против которых у него нет ферментов.

#### **Задача 2.**

1. Протеолитические свойства микроорганизма – это способность расщеплять белки (аминокислоты).
2. Нужно определить выделение при расщеплении белков сероводорода и индола.
3. Для этого нужно посеять исследуемый штамм в МПБ и опустить в него, не касаясь среды, две полоски фильтрованной бумаги, смоченные разными индикаторами: на сероводород – уксуснокислым свинцом (он должен почернеть в присутствии сероводорода), на индол – щавелевой кислотой (она должна порозоветь в присутствии индола).

#### **Задача 3.**

1. Исследуемый штамм расщепляет глюкозу, лактозу и манит до кислоты и газа и не расщепляет сахарозу.

2. Среда Ресселя относится к полисубстратным дифференциально-диагностическим средам.
3. Дифференциально-диагностические среды состоят из основной среды (МПБ или МПА), субстрата (углевода) и индикатора.
4. В среды Ресселя входят: глюкоза и лактоза – в среду Ресселя 1; маннит и сахароза – Ресселя 2.
5. Исследуемый микроорганизм расщепляет углеводы до кислоты и газа.

#### **Задача 4.**

1. Процесс дыхания бактерий – это получение энергии в результате окисления субстрата.
2. В зависимости от окисляемого субстрата они делятся на аэробы и анаэробы.
3. Строгие анаэробы в присутствии кислорода погибают от токсического действия кислородных радикалов, против которых у них нет ферментов.

#### **Задача 5.**

1. Для первого этапа выделения чистой культуры бактериологу понадобятся лактозосодержащие среды (Эндо, Левина, Плоскирева или Мак-Конки) и висмут-сульфид агар. Для выделения чистой культуры из изолированной колонии – полисубстратные среды с углеводами (Ресселя, Клигlera или Олькельницкого) и скошенный МПА, для дальнейшего определения ферментативных свойств чистой культуры – среды Гисса и МПБ с индикаторами на сероводород и индол.
2. Питательные среды по составу делятся на простые и сложные, по физическому состоянию - на жидкие, плотные, полужидкие и сыпучие, по целевому назначению - на основные, специальные, элективные, селективные и дифференциально-диагностические.

### **Задачи к занятию № 8**

#### **Задача 1.**

1. Стекланные чашки Петри и металлические инструменты.
2. Методы стерилизации бывают тепловые (сухой жар, автоклавирование, прокаливание, кипячение, пастеризация) и нетепловые (УФ-излучение, радиоактивное излучение, фильтрация, ультразвук и др.).

3. Метод воздушной стерилизации применим не ко всем перечисленным предметам. Он может применяться для стерилизации медицинских изделий, деталей приборов и аппаратов из коррозионно-стойких металлов и стекла. Для стерилизации изделий из резины и питательных сред нужно применить паровую стерилизацию – автоклавирование.

#### **Задача 2.**

1. Александр Флеминг в 1929 г. открыл антибиотик, продуцируемый плесневыми грибами – пенициллин. Говард Флори и Эрнст Чейн разработали методы очистки пенициллина и получили его в чистом кристаллическом виде. Зинаида Виссарионовна Ермольева - «Госпожа Пенициллин» - в 1942 г. впервые в СССР получила пенициллин. Земан Ваксман предложил термин «антибиотик».
2. Нобелевской премии за открытие антибиотика «пенициллина» удостоились А. Флеминг, Э. Чейн, Х. Флори.

#### **Задача 3.**

1. *Ureaplasma urealyticum* обладает врожденной антибиотикорезистентностью к  $\beta$ -лактамами антибиотиками, так как является микоплазмой, и у нее отсутствует клеточная стенка - мишень для действия этих антибиотиков.
2. Для лечения микоплазмозов нужно применять антибиотики, действующие на другие мишени, например, подавляющие синтез белка (тетрациклиновая группа, макролиды) или нарушающие синтез ДНК (фторхинолоны).

#### **Задача 4.**

1. Для определения чувствительности к антибиотикам был использован метод серийных разведений.
2. Для антибиотикотерапии, согласно полученным результатам, эффективно использовать ампициллин, стрептомицин и тетрациклин.
3. Чтобы избежать развития дисбактериоза при антибиотикотерапии, целесообразно назначать пробиотики и пребиотики.

#### **Задача 5.**

1. Необходимо назначить антибиотик «гентамицин», так как синегнойная палочка и стафилококк чувствительны к данному препарату.

## **Задачи к занятию № 9**

### **Задача 1.**

1. ЦПД – цитопатическое действие вируса на клетки.
2. Под действием вируса клетки изменяются: разрушаются межклеточные связи, клетки округляются, вакуолизируются, сливаются, отделяются от стекла.
3. Используют идентификацию по ЦПД, по вирусным включениям в клетках, бляшкообразованием, РИФ, цветной пробой и интерференцией.

### **Задача 2.**

1. Капсомеры.
2. Капсомеры могут располагаться по спиральной, кубической или смешанной симметрии.
3. Вирусы спирального типа симметрии образуют структуру типа спирали, а кубической – сложную структуру в виде многогранника – икосаэдра.

### **Задача 3.**

1. Это бактериофаги.
2. Присутствие бактериофагов в исследуемом материале говорит о присутствии в нем также и бактерий, к которым они специфичны.
3. Этапы взаимодействия бактериофага с чувствительной клеткой: адсорбция фага на клетке, инъекция ДНК фага в клетку, синтез компонентов фага, сборка фага и выход фагов из клетки с ее разрывом.

### **Задача 4.**

1. Такие фаги называются умеренными.
2. Лизогенные культуры могут спонтанно лизироваться в случае активации фага и приобретать новые свойства в результате фаговой конверсии.
3. Фаговая конверсия – это приобретение новых свойств из-за переноса генов при участии бактериофага (трансдукции).

### **Задача 5.**

1. На питательную среду в чашке Петри «газоном» засеивается исследуемая культура микроорганизма. Затем чашку переворачивают и расчерчивают по секторам в соответствии с количеством используемых фагов. Каждый сектор подписывают номером фа-

га. После чего на засеянную культуру в каждый сектор наносят каплю соответствующего типового фага. Инкубируют при температуре 37<sup>0</sup>С 5-6 часов. Фаготип культуры соответствует тому фагу, который вызывает её лизис.

2. Фаготип выделенной культуры определяют с целью эпидемического маркирования или выявления источника инфекции.
3. Такие фаги называются вирулентными.

### **Задачи к занятию № 10**

#### **Задача 1.**

1. На фекальное загрязнение.
2. Пробы почвы берут на глубине 10-15 см и готовят навеску 30 г, которую вносят в колбу с 270 мл воды, встряхивают и готовят разведения почвенной суспензии от 1:10 до 1:1 000 000. Из двух последних разведений берут по 0,1 мл и смешивают с 40 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45<sup>0</sup>С агара, после чего выливают в чашку Петри.

#### **Задача 2.**

1. ОМЧ воды, коли и перфрингенс титр воды.
2. Метод мембранных фильтров и титрационный.
3. Гост питьевой воды.

#### **Задача 3.**

1. Недопустимо.
2. Количество стафилококков и стрептококков, плесневых грибов и ОМЧ.

#### **Задача 4.**

1. Дисбактериоз.
2. Длительное лечение антибиотиками.
3. Колибактерин, лактобактерин.

#### **Задача 5.**

1. Нет, не может.
2. Кровь, лимфа, внутренние органы.

## Задачи к занятию № 12

### Задача 1.

1. Прямой и не прямой контакт; водный, пищевой, инокуляционный, воздушно-пылевой пути.

### Задача 2.

1. По химической природе экзотоксины – это белки. По степени связи с бактериальной клеткой экзотоксины условно делятся на три класса. Класс А – токсины, секретируемые во внешнюю среду, например, гистотоксин *Corynebacterium diphtheriae*, отечный и летальный токсины *Bacillus anthracis* и др. Класс В – токсины, частично секретируемые и частично связанные с микробной клеткой, например, тетаноспазмин *Clostridium botulinum*. Класс С – токсины, связанные с микробной клеткой и попадающие в окружающую среду лишь при аутолизе клетки, например, цито-, энтеро-, нейро-, и нефротоксин *Shigella dysenteriae*, «мышинный токсин» *Yersinia pestis*. Механизм действия белковых токсинов сводится к повышению проницаемости мембраны эритроцитов, лейкоцитов и других клеток (мембранотоксины) или к блокаде синтеза белка и других биохимических процессов в клетках (цитото-, энтеро- и нейротоксины), либо к нарушению взаимосвязи и взаимодействия между клетками (эксфолиатины, эритрогенины). Многие бактерии образуют не один, а несколько белковых токсинов, обладающих разным действием: летальным, дермонекротическим, цитотоксическим, нейротоксическим, гемолитическим.
2. Заболевания, при которых микроб остается в месте входных ворот инфекции (основные клинические проявления которых связаны с действием белкового бактериального токсина), получили название токсинемических инфекций (дифтерия, столбняк, анаэробная газовая инфекция, ботулизм). Иммуногенные свойства белковых токсинов проявляются в способности вызывать иммунный ответ со стороны макроорганизма, в частности индуцировать синтез специфических антител – антитоксинов, нейтрализующих гомологичный токсин. Следующей особенностью ряда белковых токсинов, например, столбнячного, дифтерийного и некоторых других, является их способность под действием формалина утрачивать свою ядовитость, сохраняя при этом иммуногенные свойства. Такие обезвреженные токсины получили название *анаток-*

*синов.* Для профилактики и лечения токсинемических инфекций применяют анатоксины и антитоксические сыворотки.

### **Задача 3.**

1. У исследуемого микроорганизма обнаруживаются капсула и экзотоксин. Капсула помогает микроорганизму избежать фагоцитоза, а экзотоксин вызывает отек и некроз тканей.
2. Факторами вирулентности микроорганизмов являются адгезины, факторы колонизации, инвазины, ферменты инвазии и агрессии, капсула, экзо- и эндотоксины.

### **Задача 4.**

1. Микробицидный потенциал фагоцитов реализуется через кислород зависимые и кислород независимые механизмы. Кислород зависимые – при «респираторном взрыве», а кислород независимые – через лизоцим, лактоферрин, гидролазы. При макрофагальном фагоцитозе основным микробицидным фактором является оксид азота.  $\text{NO}^-$  – промежуточный продукт превращения L-аргинина, токсичен в отношении микробов.
2. Функции макрофагов: защитная, секреторная, антигенпредставляющая.

### **Задача 5.**

1. Лизоцим – это протеолитический фермент мурамидаза (от лат. *murus* – стенка) с молекулярной массой 14000-16000. Он синтезируется макрофагами, нейтрофилами и другими фагоцитирующими клетками и постоянно поступает в жидкости и ткани организма. Лизоцим содержится в гранулах нейтрофилов и макрофагов. Механизм действия лизоцима сводится к разрушению гликопротеинов (мурамилдипептида) клеточной стенки бактерий, что приводит к их лизису и способствует фагоцитозу поврежденных клеток. Лизоцим вызывает гидролиз связей между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридных цепях пептидогликанового слоя клеточной стенки. Это приводит к изменению ее проницаемости, сопровождающейся диффузией клеточного содержимого в окружающую среду, и гибелью клеток. Следовательно, лизоцим обладает бактерицидным и бактериостатическим действием. Лизоцим вызывает лизис многих сапрофитных бактерий, оказывая менее выраженное литическое

действие на ряд патогенных микроорганизмов и не активен в отношении вирусов. Кроме того, лизоцим активирует фагоцитоз и образование антител.

2. Лизоцим содержится в крови, лимфе, слезах, молоке, сперме, в урогенитальном тракте, на слизистых оболочках дыхательных путей, в ЖКТ. Лизоцим отсутствует лишь только в СМЖ и передней камере глаза.

### **Задачи к занятию № 13**

#### **Задача 1.**

1. Реакция кольцепреципитации.
2. При положительной реакции кольцепреципитации на границе сыворотки, содержащей специфические антитела против белка крови человека, и раствора антигена наблюдается кольцо белого цвета.

#### **Задача 2.**

1. Специфические агглютинирующие сыворотки.
2. Агглютинирующие сыворотки получают путем иммунизации лабораторных животных соответствующими антигенами и при необходимости адсорбцией по Кастеллани.
3. Существует развернутая или пробирочная реакция агглютинации и ориентировочная или реакция агглютинация на стекле.

#### **Задача 3.**

1. При появлении на границе сред кольца реакция считается положительной.
2. Реакция кольцепреципитации ставится для определения антигенов, а реакция преципитация в геле – для определения и антигенов и антител.

#### **Задача 4.**

1. Реакция агглютинации на стекле.
2. При положительной реакции в капле на стекле будет хлопьевидный осадок.

#### **Задача 5.**

1. Эритроцитарный бруцеллезный диагностикум.
2. В лунках с положительной реакцией будет наблюдаться склеивание эритроцитов, осадок по типу «зонтик».

## Задачи к занятию № 14

### Задача 1.

1. IgM.
2. Метод парных сывороток.
3. На дне лунок сорбируют антиген.

### Задача 2.

1. Пероксидаза.
2. Планшет с адсорбированным в лунках антигеном, сыворотка больного, конъюгат (антитела к иммуноглобулинам человека, меченные ферментом), субстрат, хромоген и буферные растворы.
3. Ортофенилендиамин является наиболее часто используемым хромогеном. В случае положительной реакции он приобретает цвет от желтого до коричневого.

### Задача 3.

1. РИА также относится к реакциям с использованием метки. В качестве метки используются радиоактивные изотопы, например,  $^{125}\text{J}$ . Определение проводят в полистеровых планшетах. Механизм и последовательность реакции соответствуют ИФА, только результат учитывается по наличию и числу импульсов в лунках планшета, зарегистрированных счетчиком радиации.
2. В качестве метки в РИА используют  $^{125}\text{J}$ .
3. В случае положительной реакции счетчик определит превышение контрольного значения радиации в 2 и более раз.

### Задача 4.

1. РИФ основана на соединении антигенов бактерий, риккетсий и вирусов со специфическими антителами, мечеными флюоресцирующими красителями (флуоресцеинизотиоцианат, родамин, В-изотиоцианит, лиссатинродамин В-200, сульфохлорид и др.), имеющими реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианит и др.). Эти группы соединяются со свободными аминогруппами молекул антител, которые не теряют при обработке флуорохромом специфического сродства к соответствующему антигену. Образовавшиеся комплексы АГ–АТ становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами под люминесцентным микроскопом. Для проведения РИФ необходимо приготовить

препарат из исследуемого материала, диагностическая лбюминисцентная сыворотка и люминисцентный микроскоп.

2. Флуоресцеинизотиоцианат, родамин, В-изотицианит, сульфохлорид и др.

### **Задача 5.**

1. Имунноблоттинг – современный высокочувствительный метод, основанный на комбинации гель-электрофореза и серологической реакции «антиген-антитело». В практическом здравоохранении чаще всего используется имунноблоттинг для определения антител к антигенам ВИЧ. Имунноблоттинг проводится в несколько этапов:
  - 1) разделение белков методом гель-электрофореза;
  - 2) перенос белков на нитроцеллюлозную пластину;
  - 3) нарезание пластины на отдельные стрипы;
  - 4) детекция антител к полученным антигенам в сыворотке больного.
2. Антигены ВИЧ.
3. Антитела к антигенам ВИЧ.

## **Задачи к занятию № 15**

### **Задача 1.**

1. Перед введением гетерологических сывороточных препаратов необходимо провести аллергическую пробу. Для этого в среднюю треть предплечья вводят разведенную в 100 раз сыворотку и наблюдают 20-30 мин. В случае положительной реакции сыворотку вводят только в случае необходимости по Безредко (дробно).
2. При введении гетерологичных сывороток могут возникнуть анафилактические и иммунокомплексные (сывороточная болезнь) реакции.

### **Задача 2.**

1. Реакции гиперчувствительности замедленного типа (клеточно-опосредованная или туберкулиновая гиперчувствительность). В основе этого типа гиперчувствительности лежит взаимодействие цитотоксического (сенсibilизированного) Т-лимфоцита со специфическим антигеном, что приводит к высвобождению цитокинов, опосредующих проявления замедленной гиперчувствительности.

2. Туберкулин, бруцеллин, тулярин, антраксин.

### **Задача 3.**

1. Гиперчувствительностью называют чрезмерное или неадекватное проявление реакций приобретенного иммунитета. В основе гиперчувствительности лежит полезный в норме для организма иммунный ответ, но в данном случае действующий неадекватно, иногда с развитием воспаления и повреждением тканей. Первая классификация аллергий была предложена Р. Куком в 1947 г. В ее основу положено время развития аллергической реакции. Выделена гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) и замедленного типа (ГЗТ). Основным фактором развития ГНТ являются антитела (опосредована В-звеном иммунитета), для нее характерно время развития реакции менее 20-30 мин, в интактный организм ГНТ можно перенести пассивно (антителами) и адаптивно (иммунокомпетентными клетками), десенсибилизация возможна. Основным фактором развития ГЗТ являются Т-лимфоциты (опосредована Т-звеном иммунитета), для нее характерно время развития реакции более 6-8 час., в интактный организм ГЗТ можно перенести только адаптивно (иммунокомпетентными клетками), десенсибилизация невозможна. Изучение молекулярно-генетических механизмов аллергий привело к созданию П. Джеллом и Р. Кумбсом в 1968 г. новой *классификации аллергий* в зависимости от вовлечения в генез аллергии тех или иных механизмов. В соответствии с этой классификацией различают 4 основных типа аллергий: анафилактический (I тип), цитотоксический (II тип), иммунокомплексный (III тип) и клеточно-опосредованный (IV тип). Первые 3 типа относят к ГНТ, 4-й – к ГЗТ.

### **Задача 4.**

1. Для развития анафилактических реакций необходимы IgE, для иммунокомплексных и цитотоксических – IgM и IgG.
2. Клиническими примерами анафилактических реакций являются крапивница, отек Квинке, поллинозы, атопическая бронхиальная астма, анафилактический шок; клиническим примером иммунокомплексных реакций являются лекарственная аллергия, аутоиммунная гемолитическая болезнь, аутоиммунная тромбоцитопения; клиническим примером цитотоксических реакций являются

сывороточная болезнь, системные заболевания соединительной ткани, феномен Артюса.

### **Задача 5.**

На экзамене студенту достался вопрос «противовирусный иммунитет». Студент рассказал об участии антител в нейтрализации вирусных частиц и упомянул комплемент зависимый цитоллиз.

1. Иммунную защиту макроорганизма при вирусных инфекциях осуществляет противовирусный иммунитет. Его особенности обусловлены двумя формами существования вируса: внеклеточной и внутриклеточной. Основными факторами, обеспечивающими противовирусный иммунитет, являются специфические антитела, Т-киллеры, интерферон и сывороточные ингибиторы вирусных частиц. Специфические противовирусные антитела способны взаимодействовать только с внеклеточным вирусом, внутриклеточные структуры прижизненно для них недоступны. Т-киллеры специфически распознают клетки макроорганизма, зараженные вирусом и приступившие к биосинтезу его компонентов, и уничтожают их. Мощным противовирусным действием обладает интерферон. Он не влияет непосредственно на внеклеточный и внутриклеточный вирус, а адсорбируется на мембране клеток и индуцирует ферментные системы, подавляющие синтез компонентов вируса. Сывороточные ингибиторы неспецифически связываются с вирусной частицей и нейтрализуют ее, тем самым препятствуя адсорбции вируса на клетках-мишенях.

## **Задачи к занятию № 16**

### **Задача 1.**

1. Чумная вакцина, холерная вакцина, адсорбированный столбнячный анатоксин создают искусственный приобретенный активный иммунитет, а противостолбнячная сыворотка, противосибирезвенный иммуноглобулин – искусственный приобретенный пассивный иммунитет.
2. Чумная вакцина, холерная вакцина, адсорбированный столбнячный анатоксин применяют для специфической профилактики; противостолбнячная сыворотка и противосибирезвенный иммуноглобулин применяют для специфического лечения и экстренной профилактики.

3. Чумная вакцина относится к живым вакцинам, а холерная вакцина – к убитым.

### **Задача 2.**

1. БЦЖ относится к живым вакцинам.
2. БЦЖ применяют для профилактики туберкулеза, вводят внутрикожно, есть препараты БЦЖ для накожного введения.
3. Введение этого препарата создает искусственный приобретенный активный иммунитет.

### **Задача 3.**

1. Противостолбнячная сыворотка вводится для экстренной профилактики и лечения столбняка.
2. Лечебно-профилактические сыворотки готовятся из крови крупных животных (лошадей, волов, мулов) путем гипериммунизации соответствующим анатоксином и очищаются от балластных белков методом «Диаферм-3». Сыворотки контролируют на протективную активность, стерильность, апирогенность, количественное содержание антител.
3. Для предупреждения анафилактических осложнений, прежде чем ввести сыворотку, делают аллергическую пробу, и при положительной пробе для десенсибилизации препарат вводят дробно (метод Безредко).
4. Введение этого препарата создает искусственный приобретенный пассивный иммунитет длительностью 2–3 недели.

### **Задача 4.**

1. Эти препараты применяются для специфической профилактики дифтерии и столбняка.
2. При производстве анатоксинов культуры токсигенных бактерий, продуцирующих экзотоксины, выращивают в жидких питательных средах (реакторах большой емкости) для накопления токсина, а затем фильтруют через бактериальные фильтры для удаления микробных тел. К фильтрату добавляют 0,3–0,4% формалина и помещают в термостат при температуре 37°–40°С на 3–4 недели до полного исчезновения токсических свойств. Полученный анатоксин проверяют на стерильность, безвредность и иммуногенность.
3. Для профилактики столбняка и дифтерии.

4. Эти препараты вводят внутримышечно.

#### **Задача 5.**

1. Бактериофаги можно вводить местно в виде примочек, орошений, введения в очаг воспаления.
2. Бульонную культуру чувствительных бактерий заражают взвесью фагов. При размножении фагов образуется фаголизат (смесь бульона, фагов, целых и разрушенных бактерий). Фаголизат фильтруют через бактериальные фильтры. Полученный раствор фагов проверяют на стерильность, безвредность.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### Основная

1. Иммунобиологические препараты для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний [Текст]: учебное пособие / Е.П. Красноженов и [др.]; под ред. Е.П. Красноженова, Т.Л. Мирютовой. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. – 223 с.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст]: учебник / под ред. А.А. Воробьева. – М.: Медицинское информационное агентство, 2012. – 691 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология [Текст]: учебное пособие для студентов медицинских вузов / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского. – 4-е изд., стереотип. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.

### Дополнительная

1. Атлас по микробиологии, иммунологии и вирусологии: учебное пособие / Воробьёв А.А., Быков А.С. – М.: МИА, 2005. – 450 с.
2. Иммунология и аллергология: учебник / под ред. А.А. Воробьёва, А.С. Быкова, А.В. Караулова. – М.: Практическая медицина. – 2006. – 287 с.
3. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология [Текст]: учеб. для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев; под ред. А.И. Коротяева. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 768 с.
4. Томская школа микробиологов / Г.И. Мендрина, Т.С. Федорова, М.Р. Карпова и др. – Томск: Сибирский издательский дом, 2003. – 122 с.

# СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Введение.....                                                                                                                                           | 3         |
| План практических занятий по курсу общей микробиологии.....                                                                                             | 4         |
| История кафедры микробиологии Сибирского государственного медицинского университета .....                                                               | 5         |
| Правила техники безопасности при работе студентов в учебной лаборатории кафедры микробиологии.....                                                      | 9         |
| <b>Раздел 1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ .....</b>                                                                                                       | <b>11</b> |
| <b>Занятие № 1.</b> История развития микробиологической службы. Микробиологическая лаборатория. Классификация микроорганизмов. Морфология бактерий..... | 11        |
| <b>Занятие № 2.</b> Структура бактериальной клетки. Сложные методы окраски бактерий.....                                                                | 26        |
| <b>Занятие № 3.</b> Структура бактериальной клетки. Морфология актиномицетов и спирохет.....                                                            | 37        |
| <b>Занятие № 4.</b> Морфология риккетсий, хламидий и микоплазм. Микробы-эукариоты. Морфология грибов и простейших.....                                  | 48        |
| <b>Занятие № 5.</b> ИТОГОВОЕ по разделу «МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ».....                                                                               | 56        |
| <b>Раздел 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....</b>                                                                                                        | <b>58</b> |
| <b>Занятие № 6.</b> Питание, размножение, культивирование бактерий. Выделение чистых культур аэробных бактерий.....                                     | 58        |
| <b>Занятие № 7.</b> Дыхание бактерий. Методы культивирования анаэробов. Ферменты микроорганизмов.....                                                   | 67        |
| <b>Занятие № 8.</b> Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы.....                                                     | 80        |
| <b>Занятие № 9.</b> Морфология и биология вирусов. Бактериофаги.                                                                                        | 89        |
| <b>Занятие № 10.</b> Экологическая микробиология. Санитарно-бактериологическое исследование почвы, воды, воздуха. Микрофлора тела человека.....         | 100       |
| <b>Занятие № 11.</b> ИТОГОВОЕ по разделу «ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ».....                                                                              | 113       |

|                                                                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Раздел 3. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ.....</b>                                                                                       | <b>116</b> |
| <b>Занятие № 12. Взаимоотношение паразита и хозяина. Инфекция. Механизмы врожденного иммунитета.....</b>                         | <b>116</b> |
| <b>Занятие № 13. Иммуниет и его проявления. Серологические реакции.....</b>                                                      | <b>124</b> |
| <b>Занятие № 14. Серологические реакции (продолжение).....</b>                                                                   | <b>134</b> |
| <b>Занятие № 15. СЕМИНАР: Механизмы иммунного ответа. Аллергия и аллергические реакции. Механизмы гиперчувствительности.....</b> | <b>144</b> |
| <b>Занятие № 16. Иммунобиологические препараты.....</b>                                                                          | <b>155</b> |
| <b>Занятие № 17. ИТОГОВОЕ по разделу «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ».....</b>                                                             | <b>162</b> |
| <b>Занятие № 18. СЕМИНАР: Организация и регуляция генетической системы прокариот.....</b>                                        | <b>165</b> |
| <b>Занятие № 19. ИТОГОВЫЙ СЕМЕСТРОВЫЙ ЗАЧЕТ .....</b>                                                                            | <b>181</b> |
| <b>Ответы на тестовые задания .....</b>                                                                                          | <b>186</b> |
| <b>Ответы на ситуационные задачи.....</b>                                                                                        | <b>187</b> |
| <b>Рекомендуемая литература.....</b>                                                                                             | <b>210</b> |

Учебное издание

Муштоватова Людмила Степановна  
Жданова Оксана Сергеевна  
Бочкарева Ольга Петровна  
Грицута Александра Валерьевна

## **ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

под редакцией профессора М.Р. Карповой

Редактор В.А. Антонова  
Технический редактор С.Б. Гончаров  
Обложка Л.Д. Кривцова

Издательство СибГМУ  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107  
тел. 8(382-2) 51-41-53  
факс. 8(382-2) 51-53-15  
E-mail: [otd.redaktor@ssmu.ru](mailto:otd.redaktor@ssmu.ru)

---

Подписано в печать 30.09.2016 г.  
Формат 60x84  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная.  
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 13,6  
Тираж 150 экз. Заказ №

---

Отпечатано в Издательстве СибГМУ  
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2  
E-mail: [lab.poligrafii@ssmu.ru](mailto:lab.poligrafii@ssmu.ru)