

Документ подписан простой электронной подписью  
Информация о владельце:  
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич  
Должность: Ректор  
Дата подписания: 12.09.2025 09:48:46  
Уникальный программный ключ:  
04c19ed8bfb28f3b6cb77a486b9a8788b8322323



МИНОВЕРИТАТИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)

Фонд оценочных средств по дисциплине «Клиническая микробиология 06.03.01 «Биология»  
ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

стр. 1

## **Фонд оценочных средств**

по дисциплине

## **Клиническая микробиология**

Направление подготовки (специальность)

**06.03.01 Биология**

Присваиваемая квалификация

**Бакалавр**

Форма обучения

**Очная**

Год набора: 2025

Челябинск, 2025

## 1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: 06.03.01 Биология.

Дисциплина: Клиническая микробиология.

Семестр изучения: 7.

Форма промежуточной аттестации: экзамен.

## 2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

### 2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины направлено на формирование компетенций, представленных в таблице 1.

Таблица 1. Компетенции, формируемые в результате освоения дисциплины

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
УК-1	Способен осуществлять поиск, критический анализ и синтез информации, применять системный подход для решения поставленных задач	УК-1.1. Выполняет поиск информации, определяет критерии системного анализа поставленных задач УК-1.2. Использует критический анализ, систематизацию и обобщение информации для решения поставленных задач	Знать: Для достижения УК-1.1 знать: основные виды источников знаний по дисциплине Уметь: Для достижения УК-1.2 уметь: пользоваться разными видами систем поиска данных Владеть: Для достижения УК-1.2 владеть: методами поиска и усвоения знаний; информационной и библиографической культурой
УК-8	Способен создавать и поддерживать в повседневной жизни и в профессиональной деятельности безопасные условия жизнедеятельности для сохранения природной среды, обеспечения устойчивого развития общества, в том числе при угрозе и возникновении чрезвычайных ситуаций и военных конфликтов.	УК-8.1. Идентифицирует опасности и оценивает факторы риска, опирается на принципы создания и поддержания безопасных условий жизнедеятельности для сохранения природной среды и обеспечения устойчивого развития общества. УК-8.2. Обеспечивает создание и поддержание безопасных условий жизнедеятельности, оказания первой помощи в	Знать: Для достижения УК-8.1 знать: требования информационной безопасности Уметь: Для достижения УК-8.2 уметь: использовать полученные данные для организации ликвидации последствий антропогенных загрязнений окружающей среды Владеть: Для достижения УК-8.3 владеть: методикой эксплуатации основных видов лабораторной и полевой аппаратуры

		<p>повседневной жизни и в профессиональной деятельности, в том числе при угрозе и возникновении чрезвычайных ситуаций и военных конфликтов. УК-8.3. Применяет способы и технологии создания и поддержания безопасных условий жизнедеятельности, в повседневной жизни и в профессиональной деятельности, алгоритм оказания первой помощи, в том числе при угрозе и возникновении чрезвычайных ситуаций и военных конфликтов.</p>	
ПК-2	<p>Способен применять знания и методы различных отраслей биологической науки для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации.</p>	<p>ПК-2.1. обладает знаниями о фундаментальных основах биологических наук для решения профессиональных задач; ПК-2.2. применяет базовые знания об основах функционирования и жизнедеятельности и методах изучения биологических систем различного уровня организации в научно-исследовательской деятельности; ПК-2.3. применяет современные экспериментальные методы для решения профессиональных задач при изучении биологических систем разного уровня организации.</p>	<p>Знать: Для достижения ПК-2.1 знать: фундаментальные основы, современные достижения и проблемы микробиологии Уметь: Для достижения ПК-2.1 уметь: использовать знания о фундаментальных основах, достижениях и проблемах микробиологии при планировании научно-исследовательской работы и в своей профессиональной деятельности Владеть: Для достижения ПК-2.3 владеть: методикой постановки экспериментов с применением микроорганизмов</p>

### 3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

#### 3.1. Виды оценочных средств

Виды оценочных средств по дисциплине представлены в таблице 2.

Таблица 2. Виды оценочных средств по дисциплине

№ п/п	Код компетенции, планируемые результаты обучения	Контролируемые темы, разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации/ № задания
1	<p><b>УК-1.</b> Для достижения УК-1.1 знать: основные виды источников знаний по дисциплине Уметь: Для достижения УК-1.2 уметь: пользоваться разными видами систем поиска данных Владеть: Для достижения УК-1.2 владеть: методами поиска и усвоения знаний; информационной и библиографической культурой</p>	<p>Значение симбиотической и транзиторной микрофлоры человека в норме и патологии  Антибиотики : чувствительность и резистентность УПМ</p>	<p>1. Устный опрос. 2. Отчет по лабораторной работе. 3. Реферат. 4. Тест.</p>	<p>Вопросы к экзамену № 1-21          Вопросы к экзамену № 42-48</p>
	<p><b>УК-8</b> Для достижения УК-8.1 знать: требования информационной безопасности Уметь: Для достижения УК-8.2 уметь: использовать полученные данные для организации ликвидации последствий антропогенных загрязнений окружающей среды Владеть: Для достижения УК-8.3 владеть: методикой эксплуатации основных видов лабораторной и полевой аппаратуры</p>	<p>Микробиология тяжелых оппортунистических и СПИД-ассоциированных инфекций</p>	<p>1. Устный опрос. 2. Отчет по лабораторной работе. 3. Реферат. Тест.</p>	<p>Вопросы к экзамену № 33-41</p>
2	<p><b>ПК-2</b> Для достижения ПК-2.1 знать: фундаментальные основы, современные достижения и проблемы микробиологии Для достижения ПК-2.1 уметь: использовать знания о фундаментальных основах, достижениях и проблемах микробиологии при планировании научно-исследовательской работы и в своей профессиональной деятельности Для достижения ПК-2.3 владеть: методикой постановки экспериментов с применением микроорганизмов</p>	<p>Микробиология бактериальных поражений органов мочевого выделения, репродукции, дыхания, кожи и ее производных</p>	<p>1. Устный опрос. 2. Отчет по лабораторной работе. 3. Реферат. 4. Тест.</p>	<p>Вопросы к экзамену № 22-32, 49-60</p>

Типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины. Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

### 3.2. Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации по предмету «Клиническая микробиология» представлены вопросами для экзамена.

Вопросы для экзамена:

#### 1. Характеристика понятия «патогенность» микроорганизмов. Группы факторов патогенности. Условия возникновения оппортунистических инфекций.

**Патогенность** - видовой признак: способность определенного вида МО вызывать соответствующий инфекционный процесс у одного или нескольких видов организма хозяина. Патогенные виды реализуют свою способность вызывать инфекционный процесс у большинства особей популяции восприимчивого вида макроорганизма. Если же способность вызывать инфекцию определяется состоянием иммунитета особей популяции (условиях иммунодефицита), то такие виды микробов называются условно-патогенными

*Факторы патогенности.*

1) Поверхностные структуры для прикрепления возбудителя к клеткам организма у входных ворот инфекции за счет молекул адгезинов. У грамотрицательных бактерий в этот процесс включаются пили (ворсинки), жгутики, белки наружной мембраны, а у грамположительных микроорганизмов - тейховые кислоты, поверхностные белки.

2) Ферменты:

- гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, основной компонент соединительной ткани;  
- нейраминидаза расщепляет сиаловую кислоту, входящую в состав поверхностных рецепторов клеток. Именно этот фермент позволяет преодолеть первый защитный барьер – муциновый слой слизистых оболочек, содержащий большое количество сиаловых кислот;

- фибринолизин растворяет сгустки фибрина, образующиеся в тканях в результате развития воспаления, как защитной реакции, ограничивающей воспалительный очаг и препятствующий распространению болезнетворных микроорганизмов;

- плазмокоагулаза вызывает коагуляцию плазмы в воспалительном очаге и образование капсулы вокруг микробной клетки, что препятствует ее фагоцитозу и предохраняет от действия комплемента;

- коллагеназа разрушает коллаген и снижающая стабильность структуры тканей;

- лецитиназа действует на лецитин и другие фосфолипиды, входящие в состав клеточных мембран.

3) факторам патогенности, обладающим антифагоцитарной активностью. К ним относятся капсулы, микрокапсулы, слизистые чехлы и входящие в их состав антигены. Они являются барьерами, защищающими поверхностные структуры микробов, взаимодействующие с опсонинами, выполняющими роль распознающих молекул и роль лигандов, связывающих микробные поверхностные молекулы с фагоцитирующими клетками. Кроме того, они непосредственно взаимодействуют с рецепторами фагоцитирующих клеток, что препятствует распознаванию микробных клеток и их поглощению. И даже при поглощении, капсульное вещество защищает микробы от действия лизосомальных ферментов и перекисных радикалов фагоцитирующих клеток.

4) Токсины- важнейшие факторы патогенности, вырабатываемые МО и реализующие основные механизмы инфекционного процесса. Различают 2 группы токсинов:

Эндотоксины		Экзотоксины	
1.	Прочно связаны с телом клетки	1.	Легко диффундируют в окр.среду
2.	Малотоксичны	2.	Обладают высокой активностью
3.	Тропность отсутствует или слабо выражена	3.	Отличаются тропностью
4.	Либо не обладают, либо обладают слабовыраженными АГ свойствами	4.	АГ свойства ярко выражены, способны вызывать образование антитоксина
5.	Разнообразные орг. соединения.	5.	Протеины
6.	Термостабильны	6.	Термолабильны

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) <b>Клиническая микробиология</b> по направлению подготовки <b>06.03.01 «Биология»</b> ФГБОУ ВО «ЧелГУ»		стр. 6
7. Устойчивы к действию протеаз	7. Высококочувствительны к действию протеаз	к
8. При действии формалина токсичность практически не снижается	8. Формалин приводит к образованию анатоксина	к

Группы экзотоксинов: гемолизины, лейкоцидины, энтеротоксины, нейротоксины, некротоксины.

*Условия возникновения оппортунистических инфекций.*

Изменения со стороны макроорганизма	Изменения со стороны МО
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Иммунодефициты</li> <li>• Системные заболевания</li> <li>• Дисбиоз</li> <li>• Антибиотикотерапия/гормональная терапия</li> <li>• Трансплантации</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Перенос в несвойственные локусы</li> <li>• Приобретение дополнительных факторов патогенности</li> <li>• Резкое увеличение концентрации</li> </ul>

## 2. Свойства условно-патогенных бактерий: свойства, обусловленные генами вирулентного стиля жизни; продукты вирулентно-ассоциированных генов; формирование вектора распространения; чувство кворума.

*Свойства, обусловленные генами вирулентного стиля жизни*

Гены вирулентного стиля жизни – это все гены, необходимые для проявления патогенности:

○ Истинно-вирулентные гены – прямо отвечают за тканевое повреждение

○ Вирулентно-ассоциированные гены – гены, продукты которых участвуют в обмене веществ МО и напрямую не связаны с вирулентностью

Формирование вектора распространения (характерно для легионелл, *Pseudomonas aeruginosa* (как возбудителей ВБИ с помощью воды))

• **Чувство кворума** - способность некоторых бактерий общаться и координировать своё поведение за счёт секреции молекулярных сигналов. **Назначение чувство кворума** — координировать определённое поведение или действия между бактериями того же вида или подвида в зависимости от плотности их населения. Например, оппортунистические патогенные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* могут размножаться в пределах хозяина без ущерба, пока они не достигают определённой концентрации. Но они становятся агрессивными, когда их число становится достаточным, чтобы преодолеть иммунную систему хозяина, приводя к развитию болезни. Для того чтобы сделать это, бактериям необходимо сформировать биоплёнку на поверхности тела хозяина.

Биологический смысл феномена кооперативной чувствительности (чувство кворума), вероятно, заключается в синхронизации синтеза факторов вирулентности и "включения" этого процесса только в тот момент, когда плотность микробной популяции оказывается достаточной для наработки токсических субстанций в количестве, необходимом для повреждения тканей хозяина.

## 3. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов (УПМ). Продукты вирулентно-ассоциированных генов УПМ. Отличительные признаки истинных патогенов и оппортунистов.

*Характеристика условно-патогенных микроорганизмов*

УПМ – большая группа разнородных МО, которые вступают с организмом человека в различные взаимоотношения: симбиоза, комменсализма или нейтрализма, или в конкурентные отношения, нередко приводящие к развитию заболевания. УПМ встречаются среди всех групп микробов: бактерий, грибов, простейших и вирусов. В современной патологии человека большое значение имеют представители родов *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Haemophilus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Treponema*, *Candida* и другие. Большинство видов УПМ являются нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек тела человека, не оказывая на здоровый организм патогенного влияния. Патогенное действие на организм человека УПМ оказывают в условиях проникновения во внутреннюю среду в больших количествах, или резкого снижения общего и местного иммунитета человека.

Факторф и параметры патогенности и вирулентности подвержены фенотипическим и генотипическим изменениям. Причины- эффекты различных физических и химических факторов.

Патогенные свойства находятся под контролем хромосомных и плазмидных генов. Способность к образованию экзотоксинов детерминируют в внехромосомные tox-гены конвертирующих бактериофагов и плазмид (дифтерийный гистотоксин). Образование эндотоксинов кодируют хромосомные гены.

#### **Отличительные признаки истинных патогенов и оппортунистов.**

<b>Признак</b>	<b>Ист. патоген</b>	<b>УПМ</b>
1. Место	Макроорганизм	Макроорганизм и окр.среда
2. Количество хозяев	Определенный круг хозяев	Не имеют
3. Входные ворота	Определенные входные ворота	Отсутствуют, нефизиологические пути проникновения
4. Состояние иммунитета	Не имеет значения	Снижение
5. Экол.ниша	Своя экологическая ниша	При попадании в чужую экол.нишу либо в ходе монополизации своей ниши
6. Локализация	Тропность	Не имеет значения
7. Клинич.картина	Ярко выражена	Особенностей нет
8. Контагиозность	Высокая	Отсутствует
9. Антибиотикотерапия	Чаще успешна	Есть сложности
10. Спец.профилактика	Эффективна	Отсутствует

#### **4. Понятие клинической микробиологии. Предмет изучения клинической микробиологии. Классификация заболеваний, используемая в клинической микробиологии. Методы лабораторной диагностики в клинической микробиологии.**

Клиническая микробиология - раздел медицинской микробиологии. Исследует одну группу микробов - УПМ, одну группу заболеваний - оппортунистические инфекции и одну антропогенную экосистему - больничные учреждения.

*Задачи клинической микробиологии:*

- Изучение роли УПМ в этиологии и патогенезе инфекционных заболеваний человека.
- Разработка и использование методов микробиологической диагностики, специфической терапии и профилактики заболеваний, вызванных микробами, встречающихся в неинфекционных стационарах.
- Исследование микробиологических аспектов проблем ВБИ, дисбактериоза, лекарственной устойчивости микробов.
- Микробиологическое обоснование и контроль за антимикробными мероприятиями в больничных стационарах.

*Классификация заболеваний, используемая в клинической микробиологии*

По поражению органов и систем:

- Инфекции верхних(синусит, гайморит, тонзиллит, фарингит)и нижних( ларингит, трахеит, бронхит) дыхательных путей
- Инфекции центральной нервной системы (менингит –воспаление мягких оболочек спинного и головного мозга, миелит – спинного мозга, энцефалит – головного мозга)
- Бактериальные поражения крови(сепсис, бактериемия, бактериальный шок)
- Бактериальные поражения органов пищеварения( Полости рта: пульпит – пульпы зуба, периодонтит – корень зуба, стоматит –слизистой оболочки полости рта. ЖКТ: гастрит, энтерит, колит)
- Заболевания органов брюшной полости(гнойный аппендицит, холецистит-воспаление стенок желчного пузыря, панкреатит- воспаление поджелудочной железы,перитонит-воспаление брюшины, перитонит-брюшины)
- Инфекции мочевыводящих путей(пиелонефрит-воспаление паренхимы и лоханки почки, пара-

нефрит, цистит-мочевого пузыря, уретрит- мочеиспускательного канала)

- Инфекции женских половых органов (вульвит - наружных половых органов, вагинит- влагалища, эндометрит- слизистой матки, сальпингит- маточных труб, оофорит - яичников, мастит- паренхимы молочных желез)

- Инфекции мужских половых органов(простатит – предстательной железы, везикулит – семенных пузырьков, эпидидимит – придатков яичников)

- Бактериальные поражения сердечно-сосудистой системы (эндокардит, миокардит, перикардит)

*Методы лабораторной диагностики в клинической микробиологии.*

- Микроскопический метод позволяет выявлять в мазках патологического материала бактерии только в случае их массивного содержания (10<sup>5</sup> КОЕ/мл и более) и позволяет только ориентировочно судить о возбудителе, относя его к крупным таксонам (палочки, кокки, спирохеты, грамположительные или грамотрицательные и т.п.). Результаты микроскопии могут быть использованы при выборе питательных сред для дальнейшего выделения возбудителя.

- Основным методом микробиологической диагностики оппортунистических инфекций является бактериологический. Достоверность бактериологического исследования зависит: от правильного забора материала от больного; применения эффективного набора дифференциально-диагностических и селективных питательных сред; использования количественного посева материала; этапности идентификации выделенных чистых культур (семейство, род, вид и в необходимых случаях вариант); определения свойств, указывающих на патогенность культур и их принадлежность к госпитальным штаммам.

- Серологический метод имеет вспомогательное значение. Возможности серологического метода ограничивают выраженная мозаичность антигенной структуры многих УПМ, наличие к ним антител у здоровых людей и слабая выраженность иммунного ответа на антигены УПМ. Тем не менее при затяжных и хронических формах болезни серологический метод иногда позволяет установить этиологию болезни. Серологические реакции ставятся с парными сыворотками больного и аутокультурой, результат оценивается по сероконверсии в 4 раза и более. На сегодняшний день слабо разработаны диагностические препараты, основанные на иммунных реакциях (ИФА, иммунофлюоресцентные диагностикумы, моноклональные антитела) к УПМ.

Биологический метод обычно не используется из-за неспецифичности клинической картины, вызываемой УПМ у лабораторных животных, и содержания в патологическом материале микробных ассоциаций, которые при заражении животных претерпевают изменения.

Аллергологический метод в связи с отсутствием сенсибилизации или ее малой специфичностью не используется.

## **5. Принципы забора материала для микробиологического исследования, условия и сроки хранения, транспортировки. Основные методы исследования, используемые в клинической микробиологии.**

*Правила забора, хранения и транспортировки материала*

- Вид материала определяется клинической картиной заболевания и должен соответствовать локализации предполагаемого возбудителя с учетом патогенеза болезни.

- Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования и его повторения в случае необходимости.

- Материал берут по возможности в начальном периоде болезни.

- Взятие материала должно осуществляться до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени после ее назначения, необходимый для выведения препарата из организма.

- Материал необходимо брать непосредственно из очага инфекции или исследовать соответствующее отделяемое (гной из фистулы, мочу, желчь и др.).

- Забор материала необходимо проводить во время наибольшего содержания в нем микробов.

- Необходимо предупредить контаминацию материала нормальной микрофлорой больного и микробами окружающей среды.

- Следует предупредить возможность попадания в материал антимикробных препаратов (дезинфектантов, асептиков, антибиотиков), исключить контакт с металлами, обладающими олигодинамическим свойством, с ватой, содержащей свободные жирные кислоты.

- Любой клинический материал должен рассматриваться как потенциально опасный для человека. Поэтому при его заборе, хранении, доставке, обработке во избежание заражения должны соблюдаться такие же меры техники безопасности, как при работе с патогенными микробами.

- Срок доставки не должен превышать 2 часов.

- К клиническому образцу, направляемому в лабораторию, прилагают сопроводительный документ, содержащий основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования (характер материала, фамилию, имя и отчество больного, название учреждения или отделения, номер истории болезни, предполагаемый диагноз заболевания, предшествующую

антимикробную терапию, дату и время взятия материала, подпись врача, направляющего материал на исследование).

• В процессе транспортировки материал следует оберегать от действия света, тепла, холода, механических повреждений.

• После исследования остатки материала подлежат уничтожению (автоклавированию или сжиганию), а посуда, контейнеры, инструменты - обеззараживанию.

*Методы лабораторной диагностики в клинической микробиологии.*

➤ Микроскопический метод позволяет выявлять в мазках патологического материала бактерии только в случае их массивного содержания (105 КОЕ/мл и более) и позволяет только ориентировочно судить о возбудителе, относя его к крупным таксонам (палочки, кокки, спирохеты, грамположительные или грамотрицательные и т.п.). Результаты микроскопии могут быть использованы при выборе питательных сред для дальнейшего выделения возбудителя.

➤ Основным методом микробиологической диагностики оппортунистических инфекций является бактериологический. Достоверность бактериологического исследования зависит: от правильного забора материала от больного; применения эффективного набора дифференциально-диагностических и селективных питательных сред; использования количественного посева материала; этапности идентификации выделенных чистых культур (семейство, род, вид и в необходимых случаях вариант); определения свойств, указывающих на патогенность культур и их принадлежность к госпитальным штаммам.

➤ Серологический метод имеет вспомогательное значение. Возможности серологического метода ограничивают выраженная мозаичность антигенной структуры многих УПМ, наличие к ним антител у здоровых людей и слабая выраженность иммунного ответа на антигены УПМ. Тем не менее при затяжных и хронических формах болезни серологический метод иногда позволяет установить этиологию болезни. Серологические реакции ставятся с парными сыворотками больного и аутокультурой, результат оценивается по сероконверсии в 4 раза и более. На сегодняшний день слабо разработаны диагностические препараты, основанные на иммунных реакциях (ИФА, иммунофлюоресцентные диагностикумы, моноклональные антитела) к УПМ.

Биологический метод обычно не используется из-за неспецифичности клинической картины, вызываемой УПМ у лабораторных животных, и содержания в патологическом материале микробных ассоциаций, которые при заражении животных претерпевают изменения.

Аллергологический метод в связи с отсутствием сенсibilизации или ее малой специфичностью не используется.

## **6. Критерии определения этиологической значимости УПМ. Методики посева клинического материала (количественные, условно-количественные).**

*Критерии определения этиологической значимости УПМ*

1) Количественный критерий: обнаружение МО в концентрации  $10^5$ - $10^6$  КОЕ, взятого из очага поражения

2) Неоднократное выделение возбудителя несколько дней подряд

3) Высев однотипных МО из разных очагов, объединенных общим.

4) Наличие соответствующей клинической картины.

*Методики посева клинического материала*

Количественные:

○ Метод Lindsey. Используется для посева материала, требующего разведения (мокрота, испражнения). Материал разводят в физ.растворе в соотношении 1:10. Высевают на плотную питательную среду калибровочной петлей (6мм) в I сектор. Петлю обжигают, собирают материал из I сектора и разносят по II сектору. Аналогично в III сектор. Выдержать в термостате, подсчитать колонии.

○ Метод Gouldy. Применяется для микробиологического исследования жидкого клинического материала (мочи). Петлей диаметром 2 мм берут каплю и делают 30-40 штрихов на сектор I чашки Петри. Прожигают петлю и производят 4 штриха через сектор I в сектор II. Аналогичным образом из сектора II засевают сектор III, а из сектора III - сектор IV. Чашки инкубируют. Учет результатов проводят по специальной таблице.

Условно количественный метод:

○ «Тампон-петля». Используется тогда, когда материал собирается на тампон. Тампоном наносится небольшой участок. Затем калибровочной петлей (6мм) материал разносится по I сектору, петля переворачивается и разносится по II сектору; обжигается. Также материал разносится по III и IV секторам. Инкубация, учет результатов.

## **7. Проведение микробиологического мониторинга и его роль в системе эпиднадзора.**

Микробиологический мониторинг- является неотъемлемой частью системы инфекционного контроля, позволяющей следить за циркуляцией возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, изменениями в их структуре, тенденциями развития устойчивости к

антимикробным препаратам (далее – АМП), а также выявлять эпидемиологические связи, что особенно важно при расследовании вспышек и случаев внутрибольничного заражения, основываясь на идентичности антибиотикограмм и комплекса биологических свойств микроорганизмов.

Мониторинг необходим для полноценного функционирования системы инфекционного контроля. Такой мониторинг предусматривает количественный учет резистентных штаммов (абсолютное число и доля представленности).

Изучение ведущей микрофлоры и доли ее представленности необходимо для анализа результатов тестов на чувствительность к антибиотикам. Анализ проводится с помощью группировки штаммов микроорганизмов, устойчивых и чувствительных по отношению к изучаемому антибиотику (набору антибиотиков).

Соотношение долей чувствительных и устойчивых микроорганизмов по отношению к тому или иному антибиотику (набору антибиотиков) дает представление о характере циркулирующих штаммов с позиций их принадлежности к госпитальным вариантам. Чем выше доля представленности, тем надежнее информация об активности того или иного антибиотика.

Полученные результаты анализа антибиотикорезистентности микроорганизмов позволяют:

- обоснованно назначать антибактериальные средства в профилактических и лечебных целях до получения антибиотикограммы по каждому больному;
- производить целенаправленные закупки определенных видов лекарственных препаратов для нужд данного стационара.

Динамика показателей частоты выделения штаммов микроорганизмов, устойчивых к тому или иному антибиотику (набору антибиотиков):

- дает представление об изменении эпидемической ситуации в стационаре;
- позволяет отслеживать циркуляцию госпитальных вариантов микроорганизмов;
- проводить анализ структуры генотипов антибиотикорезистентности по фенотипам бактерий и отслеживать изменения, происходящие в этой структуре.

Наиболее перспективным в плане сдерживания роста антибиотикорезистентности является мониторинг чувствительности, проведенный с помощью одного и того же метода (диско-диффузионным методом, методом определения минимальной подавляющей концентрации (МПК), методом Е-тестов) либо с помощью автоматизированных аналитических систем определения чувствительности микроорганизмов к АМП.

Данные микробиологического мониторинга используются госпитальным эпидемиологом для выявления эпидемиологических связей между микроорганизмами, прежде всего с целью предупреждения и раннего купирования вспышек. Результаты анализа данных микробиологического мониторинга являются качественной основой для формирования политики выбора и применения АМП в учреждениях здравоохранения.

Мероприятия: в каждом клиническом отделении необходимо определить группы пациентов, подлежащих бактериологическому обследованию, показания к проведению обследования, вид биоматериала, подлежащего исследованию, кратность, стандартный набор сведений о пациенте, отражаемых в направлении на исследование.

Наиболее оптимальной формой является разработка соответствующего протокола под контролем заместителя главного врача по эпидемиологической работе. Набор необходимых сведений о пациенте должен содержать, помимо паспортных и идентификационных данных, сведения, которые могут быть использованы при проведении анализа факторов риска возникновения инфекций. Крайне важным элементом системы микробиологического мониторинга является обеспечение качественного забора материала и доставки его в лабораторию. Тестирование выделенных возбудителей на наличие чувствительности/резистентности должно выполняться на основе набора антибиотиков для тестирования, согласованного с лечащими врачами, клиническими фармакологами и госпитальными эпидемиологами.

#### **8. Кандиды: классификация; распространенность; роль грибов рода *Candida* в патологии человека; классификация кандидозов; этиологическая значимость выделенных изолятов кандид.**

Домен: Eucariota

Царство: Fungi

Отдел: Ascomycetes

Подотдел: Ascomycotina

Класс: Saccharomycetes

Подкласс: Ascomycetedes

Семейство: Saccharomycetaceae

Род: *Candida*

Вид: *C. albicans*

Грибы рода *Candida*- наиболее распространенные представители условно-патогенной

микробиоты, являющиеся причиной разнообразных грибковых заболеваний кожи и слизистых оболочек человека в условиях нарушенной резистентности организма, особенно при различных иммунодефицитах.

От других грибов они отличаются отсутствием настоящего мицелия. Иногда образуют псевдомицелий - удлиненные клетки, которые объединяются в цепочки, которые могут иметь терминальные хламидоспоры.

Род *Candida* насчитывает 168 видов, среди которых только некоторые могут вызывать заболевания. Основным возбудителем кандидоза у человека является:

- *Candida albicans* – является почти постоянным представителем микрофлоры кишечника животных и человека, вызывает кандидозы различных органов (чаще всего выделяется из очагов поражения на коже, во влагалище и полости рта.)

- *C. Parapsilosis* - является причиной паронихий и онихомикозов,

- *C. Kursei*- выделяется преимущественно из очагов кандидоза слизистой оболочки полости рта у больных ВИЧ-инфекцией.

- *C. pseudotropicalis* и некоторые другие.

Выделяют четыре основные формы кандидозов:

- 1. Локальные - поражение кожи, ногтей, ногтевых валиков, слизистых оболочек рта, глотки, влагалища, вульвы.

- 2. Системные - поражение дыхательных путей, кишечника, мочеполовой и центральной нервной систем.

- 3. Генерализованные - хронический гранулематозный кандидоз, септикопиемия.

- 4. Вторичные (аллергические) кандидозы - на фоне сенсибилизации организма возникают новые очаги воспаления, в которых возбудитель отсутствует.

При оценке этиологической значимости будет играть вид кандид. Имеет значение анатомическая область выделения и количество колонизируемых анатомических областей. При росте более 1000 типичных колоний в расчете на 1 г исследуемого материала делают вывод, что кандиды являются этиологическим агентом заболевания. Этиологическая значимость  $10^3$  КОЕ/мл.

#### **9. Принципы лабораторной диагностики кандидозов: правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала; среды для выделения кандид и характер роста на них; методы идентификации кандид.**

При локальных и системных формах заболевания материал для исследования берут из пораженных участков - чешуйки кожи, соскобы с ногтей, слизь, гной, мокрота, мочу, желчь, ликвор, стул, при генерализованных - кровь, пунктаты абсцессов, биопсийный материал, от трупов - кровь из сердца, кусочки паренхиматозных органов.

**Кал.** Каких-либо ограничений в диете и режиме питания перед исследованием не требуется. Следует выяснить у пациента особенности его питания, принимал ли он недавно или продолжает принимать противомикробные препараты. Материал для исследования берется не ранее чем через 2-3 недели после лечения бактериофагами или антибактериальными препаратами, а также эубиотиками или пробиотиками. За 3-4 дня до исследования отменить прием слабительных препаратов, касторового и вазелинового масла и прекратить введение ректальных свечей. Кал, полученный после клизмы, для исследования непригоден. Кал собирается в стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой и ложечкой (можно купить в аптеке) или в подготовленную стеклянную банку с крышкой (например, из-под детского питания следующим образом: промыть без использования дезинфицирующих средств и прокипятить в течение 20 минут в воде). Кал не должен собираться с тканевой поверхности (памперсов). Следует избегать попадания кусочков не переваренной пищи и мочи. В банку поместить не менее 1 чайной ложки кала. Крышку контейнера (банки) плотно закрыть.

**Моча.** Собирают только в стерильную посуду. Мочу необходимо сдать не ранее 3 дней после окончания лечения химиопрепаратами. Доставить в лабораторию в течение 2 часов. Можно хранить в холодильнике не более одних суток.

**Отделяемое из глаз.** Взятие материала производит врач отдельным тампоном для каждого глаза. Материал забирают с пораженных мест в разгар воспалительного процесса с соблюдением правил асептики. Доставка материала в лабораторию как можно быстрее, если используются специальные транспортные среды - в течение суток.

**Отделяемое из носа.** Материал из носовой полости забирают сухим стерильным ватным тампоном, который вводят вглубь полости носа. Для каждого носового хода используют отдельный тампон. Доставка материала в лабораторию как можно быстрее, при использовании транспортной среды - в течение суток.

**Отделяемое носоглотки.** Материал из носоглотки берут стерильным заднеглоточным ватным тампоном. При невозможности доставки в течение быстрого времени - хранить тампоны с материалом следует в холодильнике не более 2-3 часов.

**Материал из полости рта.** Материал из ротовой полости берут натошак или через 2 часа после

еды стерильным ватным тампоном со слизистой оболочки или ее пораженных участков у выходов протоков слюнных желез, поверхности языка, из язвочек. При наличии пленки, снимают стерильным пинцетом. При невозможности доставки материала в течение короткого периода можно хранить тампоны с материалом в холодильнике не более 2-3 часов.

**Отделяемое влагалища.** Влагалищное отделяемое собирают стерильным одноразовым зондом из заднего нижнего свода или патологически измененных участков слизистой. После взятия материала зонд переносят в упаковку зонда либо вносят в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, пробирка закрывается и маркируется, после чего материал доставляется в лабораторию.

**Секрет предстательной железы.** Из кавернозной части выдавливается 0,5-1 мл простатического секрета, который собирается в сухую стерильную емкость. Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться в сумке-холодильнике.

**Подтверждением диагноза** является положительный ответ посева с пораженных тканей.

**Схема:** Исслед материал : отделяемое зева, носа, мокрота, испражнения, желчь, моча, гной, кровь, чешуйки кожи, ногтей и др.

Микроскопия: гр+ дрожжевые клетки.

Среды: Сабуро, МПА 2% глюкозы, Сусло-агар. 37\* 24ч., 28\*48-96ч.

Ростовые трубки, хламидоспоры.

БХ: Ауксонограмма (ассимиляция), Зимограмма (ферментация)

Исследование биоматериала на присутствие грибов рода *Candida* складывается из нескольких этапов:

1. взятие материала от больных;
2. микроскопическое исследование;
3. микологическое исследование - выделение культур грибов и их идентификация (серологическая реакция и постановка аллергической пробы).

Обычно микроскопическое исследование материала проводится одновременно с посевом или посев делается сразу, без микроскопии. От техники и времени во многом зависит результат исследования. Желательно делать посевы непосредственно после взятия материала.

**Микроскопия:** Окрашивают препараты простым методом: 1% спиртовым раствором метиленового синего 1-3 мин, 1% водным раствором фуксина 0,5-1 мин. Используют также метод окраски по Граму, по Цилю - Нильсену, по Романовскому - Гимзе. При микроскопическом исследовании выявляют клетки типичной морфологии (овальные, круглые), в некоторых случаях с почкой (всегда одной), псевдомицелий, иногда хламидоспоры, определяют типы филаментации. Однако в препарате из исследуемого материала обычно видны только клетки грибов, редко псевдомицелий. Все другие элементы морфологии грибов выявляются в ходе исследования выделенной культуры гриба.

#### Посевы:

При **локальных** и **системных** формах заболевания материал для исследования берут из пораженных участков - чешуйки кожи, соскобы с ногтей, слизь, гной, мокрота, мочу, желчь, ликвор, стул, при **генерализованных** - кровь, пунктаты абсцессов, биопсийный материал, от трупов - кровь из сердца, кусочки паренхиматозных органов.

#### Первый этап микологического исследования:

Любой патологический материал сеют количественным методом на плотную **среду Сабуро** или **сусло-агар**, а также в **глюкозный МПБ**. В стерильных средах перед посевом добавляют пенициллин и стрептомицин для подавления роста сопутствующей бактериальной флоры. Посевы выращивают при температуре 30 °С. При росте более 1000 типичных колоний в расчете на 1 г исследуемого материала делают вывод, что кандиды являются этиологическим агентом заболевания. Изолированные колонии *C. albicans* на агаре Сабуро **круглые беловато-кремовые, блестящие, гладкие, с ровными краями, напоминающие капли майонеза**. Они глубоко врастают в среду.

Для выявления псевдомицелия колонии отсеивают в один из жидких сред - **глюкозный МПБ**, картофельную воду или морковно-рисовый отвар. Сначала появляется муть или осадок, реже - пленка на поверхности среды. Псевдомицелий обнаруживают на 3-5 день или позже при микроскопическом исследовании надавленных капли, пользуясь объективом 8х.

**Второй этап микологического исследования** проводится через двое суток после посева материала, когда на чашках вырастают колонии. Он включает четыре момента:

1. отбор характерных однотипных колоний грибов и подсчет их;
2. микроскопия окрашенных (генцианвиолетом) препаратов для проверки чистоты культуры и изучения морфологии клеток, иногда при этом обнаруживается псевдомицелий и тогда сразу определяется принадлежность гриба к роду *Candida*;
3. пересев из колонии на мясопептонный бульон (МПБ) с глюкозой или хламидоспор-агар для выявления псевдомицелия (если он не обнаружен в мазке из колоний);

4. пересев из колонии на скошенную среду Сабуро или сусло-агар в пробирке для выделения чистой культуры.

В случае отсутствия типичных колоний грибов чашки сохраняются 7 дней и лишь тогда, если грибы не вырастут, выдается отрицательный ответ.

**Третий этап микологического исследования** - идентификация выделенной культуры гриба, включающая определение принадлежности к дрожжеподобным грибам рода *Candida* и определение вида гриба. При определении принадлежности к дрожжеподобным грибам рода *Candida* возникает необходимость дифференциации их с истинными дрожжами - сахаромицетами. Дрожжи образуют аскоспоры, не имеют псевдомицелия, вертицилл, хламидоспор, ферментируют углеводы через 12-20 ч, растут при оптимальной температуре 20-30° С (температурный максимум роста 35° С), размножаются множественным почкованием, непатогенны для животных).

**Дрожжеподобные грибы рода *Candida* не имеют аскоспор, образуют псевдомицелий, вертициллы, хламидоспоры (*C. albicans*), ферментируют углеводы через 24-48 ч (*C. tropicalis* через 18-20 ч), температурный оптимум роста 37° С, максимум 43° С, почкование концевое, патогенность для животных выражена различно (наиболее патогенны *C. albicans*). Первые два признака являются основными при дифференциации.**

Практически, чтобы исключить принадлежность грибов к дрожжам, достаточно выявить псевдомицелий, который обнаруживается в мазках из МПБ с глюкозой через 48 ч, в пределах 7 сут. Для ускорения его образования посев инкубируется при температуре 37° С одни сутки, а затем остается при комнатной температуре (обычно псевдомицелий виден через 48 ч). Быстрее и проще псевдомицелий выявляется в посевах на хламидоспор-агаре, где через 18-20 ч обнаруживаются хламидоспоры, псевдомицелий и определяется тип филаментации.

Более подробная идентификация выделенных грибов с определением их вида проводится по следующей схеме:

1. определение типа филаментации
2. тест на ростовые трубки. Проводится при внесении изучаемой культуры в сыворотку. Культура выделяется в течении 2-4 часов в термостате. Делается мазок и просматриваются клетки.
3. выявление хламидоспор(дифференциальный признак для *C. albicans*)
4. изучение биохимических свойств - постановка теста на ассимиляцию(источник углерода).
5. так же ставится ауксограмма (для оценки селективной активности) и зимограмма(ферментативная активность)
6. определение антимикотической чувствительности(проводится с помощью диско-диффузионного метода или фунги-теста.) Диско-диффузионный метод:на поверхность агараказетоновая среда вносится двухсуточная культура в определенной концентрации, затем вносят диски с антимикотиками(нистатин,клотримазол,флуконазол). Чашку выдерживают при 35С 48 часов. После проводится определение зон задержки роста и интерпретация.

Кроме микробиологической диагностики существуют экспресс-методы, которые могут использоваться в отношении глубоких и диссеминированных кандидозов:

- серологические реакции(РП,иммунодиффузия,ИФА,латекс-агглютинация)
- молекулярные методы:газово-жидкая хроматография и ПЦР.

**10. Неферментирующие грамотрицательные палочки: классификация; клинически значимые виды; морфологические, культуральные, биохимические свойства; методыобнаружения, выделения и идентификации.**

Неферментирующие грамотрицательные бактерии относятся к различным таксономическим подразделениям, они встречаются среди представителей :

- *Род Pseudomonas,*
- *Род Acinetobacter,*
- *Род Moraxella и др.*
- *Род Alcaligenes (алкалиджесен)*
- *Род Flavobacterium*
- *Род Achromobacter.*

В 70% случаев из любого клинического материала выделяется *Ps.aeruginosa* и *Ac.baumannii*.

На остальные 30% случаев-*Achromobacterxylosoxidans, Flavobacteriummeningosepticum, F. odoratum,* рода *Flavobacter* — *F. breve, F. multivorum, F. spiritivorum, Moraxellabovis, M. lacunata, M. atlantae.* Более 20 видов рода *Pseudomonas* — *Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. mallei, Ps. pseudomallei, Ps. putida.*

В мазках располагаются одиночно, парами или

короткими цепочками. Метаболизм дыхательного типа. Образуют каталазу, синтез оксидазы вариабелен. Неферментирующие грамотрицательные бактерии не образуют спор, многие имеют капсулу. Среди них встречаются как подвижные, так и неподвижные бактерии. У моракселл и ацинетобактера описана своеобразная «дергающая» подвижность.

Наименее прихотливы к факторам роста *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*; прочие нуждаются в сложных по составу питательных средах, нередко с добавлением гемина и сыворотки крови человека или животных. На кровяном агаре образуют гладкие или шероховатые колонии диаметром от 0,2 до 3 мм, отличающиеся по консистенции, пигментообразованию, наличию или отсутствию зоны гемолиза вокруг колоний на кровяном агаре. Для многих представителей оптимальной температурой роста является 30–33°C. Большинство относится к строгим аэробам. Некоторые виды *Pseudomonas* способны к анаэробному росту в присутствии нитритов и нитратов, если они используются в качестве конечных акцепторов электронов; при этом процесс накопления химической энергии начинается с фосфорилирования глюкозы.

**Биохимическая активность** слабо выражена, что создает трудности при идентификации. Они не образуют индол, **не ферментируют глюкозу и другие углеводы**, но многие виды способны к окислению сахаров и многоатомных спиртов без образования газа. Часть характеризуется полной инертностью по отношению к глюкозе, другие – окисляют глюкозу путем последовательного ее превращения в ацетилкоэнзим А, который включается в цикл Кребса, обеспечивающий обмен веществ в клетках аэробных микроорганизмов. При этом разные виды одного рода (*Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp.) и даже штаммы одного вида (*Burkholderia* spp.) могут отличаться по сахаролитической активности. Протеолитическая активность слабо выражена, однако для некоторых видов способность разжижать свернутую сыворотку и желатин является важным дифференциальным признаком. За редким исключением **оксидазоположительные**, что свидетельствует о наличии у них в цепи транспорта электронов цитохрома с; оксидазонегативные микроорганизмы (*Acinetobacter* spp., *Chryseomonas* spp., *Flavimonas* spp., *S. maltophilia* и некоторые штаммы *B. cepacia*) имеют лишь цитохромы а и b.

*Методы обнаружения и идентификации.*

*P. aeruginosa* в отличие от двух других видов растет при 42°C (но не при 5°C) на простых средах; среда обычно приобретает зеленоватый цвет за счет продукции пигмента, часто имеет фруктовый запах; на кровяном агаре многие штаммы образуют б-гемолиз. В жидкой среде образует пленку на поверхности. Большинство штаммов помимо флуоресценции продуцирует пигмент пиоцианин, сине-зеленого цвета, однако встречаются и безпигментные штаммы (до 10%). Утилизирует цитрат и малонат, слабо свертывает лакмусовое молоко, вызывая быструю его пептонизацию и редукцию лакмуса.

**Группа *Alcaligenes*** включает два основных вида: *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*. У человека могут быть выделены из крови, мочи, дыхательного тракта и абсцессов. Изоляты не растут при 42°C, но дают рост при 5°C. Чувствительны к тетрациклину, сульфаниламидам, котримаксазолу, тобрамицину, часто – к ампициллину, цефалоспориновому поколению. Род *Burkholderia*. *B. pseudomallei* – возбудитель **melioidоза** (продуцирует 2 токсина: летальный фактор с антикоагулянтной активностью и белковый фактор некроза кожи) – редкого сапоподобного заболевания, эндемичного для грызунов и поражающего человека и животных. Характерной особенностью изолятов является формирование морщинистых колоний на агаре через 48–72 ч инкубации, а в бульоне на переваре сердца образуют на поверхности толстую пленку, которая сморщивается на 2–3-и сутки. В специализированных лабораториях для идентификации возбудителя используют биопробу на морских свинках и специфические флуоресцирующие антисыворотки. При серодиагностике заболевания определяют уровень специфических антител в реакциях агглютинации и связывания комплемента. Чувствительны к хлорамфениколу, ко-тримаксазолу, цефтазидиму, карбапенемам. *B. cepacia* изоляты либо оксидазонегативные (более 13%), либо обладают слабо выраженной оксидазной реакцией. Часть бактерий продуцирует не флуоресцирующий желто-зеленый пигмент (встречаются штаммы с голубым пигментом). Резистентны к полимиксину и аминогликозидам; чувствительны к хлорамфениколу, ко-тримаксазолу, ципрофлоксацину, карбенициллину, цефтазидиму, меропенему, азтреонаму.

*Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) – условный патоген, широко распространенный в природе, вызывает бактериемию, эндокардит, пневмонию, мочевую, раневую инфекцию, различные абсцессы. Устойчив к большинству антибиотиков, кроме хлорамфеникола, ко-тримаксазола, доксициклина и налидиксовой кислоты.

Схема:

Исслед материал испражнения, гной.

Микроскопия Гр- палочки.

Среды: МПА, 5% КА, Эндо.

Цитохромоксидаза +, Каталаза +.

БХ: Хью, Ацетат, МПА, Сахароза, Сорбит, Адонит, Аргинин, Желатин, Крахмал, Глюкоза.

АБЧ.

### **11. Неспорообразующие строго анаэробные бактерии: исследуемый материал, правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки; методы выделения и идентификации анаэробов.(лекция)**

**Неспорообразующие (неклостридиальные) анаэробы**- грамотрицательные (бактероиды, порфиромонады, превотеллы, фузобактерии и др.) и грамположительные (актиномицеты, пептококки, пептострептококки и др.) палочко- и кокковидные бактерии с разнообразными биологическими свойствами. Они составляют обширную группу облигатных анаэробов, входящих в различные таксономические категории. Наиболее типичными и часто выделяемыми видами неспорообразующих анаэробов являются бактериоиды и порфиромонады .Типовые виды бактериоидов – *Bacteroides fragilis*, порфиромонад – *Porphyromonasa saccharolytica*, превотелл – *Prevotella melaninogenica*.

Общие свойства облигатных анаэробов:

- существуют в анаэробии
- продукция супероксиддисмутазы, а так же каталазы
- высокая питательная требовательность при культивировании
- широкий спектр АБ-резистентности к бэта-лактамам, пенициллинам
- наличие факторов патогенности(гиалорунидаза, фибринолизина,лецитиназы,ДНКазы) и токсинов.

Исследуемый материал: пункция полостей и органов, отделяемое из глубины ран, пунктат абсцессов, гнойное содержимое органов, кровь, мокрота, испражнения.

Для забора материалов используются герметизированные шприцы, заполненные газом. Полученную пробу необходимо поместить в закупоренные контейнеры с редуцированной питательной средой (тиогликолевой или иной). Доставлять материал необходимо не позднее 1,5 часов от момента взятия.

*В лабораторной диагностике используют несколько методов.*

В качестве ускоренного метода может использоваться газожидкостная хроматография, которая подтверждает наличие анаэробной инфекции по спектру выделяемых жирных кислот.

Возможно применение ИФА для выявления антигенов возбудителей и ПЦР для идентификации нуклеиновых кислот в материале.

Бактериологический метод является длительным и требует сред и реактивов с высокой стоимостью. В качестве селективных сред используется кем-агар, агар Шедлера. Чашки выдерживают при 35С до 3 суток с ежедневным контролем роста. Выросшие колонии изучают люминесцентным микроскопом(представители *Fusobacterium*-зеленое свечение, *Porphyromonas*-красное) Определяют наличие пигментации, делается мазок по Граму, ставится тест на каталазу и ведется отсев на КА на 2 чашки(1-инкубируется при 35С до 48 ч. в условиях аэробии; 2- в условиях анаэробии). После 48 ч производится идентификация.

В обычной практике возможно установить анаэробную инфекцию ускоренными методами, а также использовать микроскопию материала. Обнаружение грамотрицательных палочек, без спор, расположенных поодиночке или парами указывает на наличие анаэробов и необходимость проводить посев в строго анаэробных условиях.

В специализированных лабораториях выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, биохимическим признакам, определяют чувствительность к антимикробным препаратам.

### **12. Стафилококки: роль в патологии человека: правила взятия клинического материала, сроки и условия хранения и транспортировки; методы выделения и идентификация.**

Род стафилококки входит в семейство *Staphylococcaceae*, порядок *Bacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, царство Бактерии.

В род стафилококки входят следующие (перечислила основные) виды: [S. aureus \(стафилококк золотистый\)](#), [S. capitis](#), [S. epidermidis \(стафилококк эпидермальный\)](#), [S. haemolyticus](#), [S. hominis](#), [S. hyicus](#), [S. saprophyticus \(стафилококк сапрофитный\)](#), [S. xylosus](#).

Стафилококки представляют собой неподвижные шарообразные клетки диаметром от 0,5 до 1,5 мкм, Грам + (фиолетовые) располагающиеся одиночно, парами или гроздьями. Не образуют спор. Лучше других бактерий переносят воздействие высокой температуры, света, высушивания и химических агентов. Оптимальная температура для развития стафилококков 30–37 °С (диапазон 7-48 С), pH-4-9 (опт. 7,0-7,5), устойчив к высокой концентрации NaCl. Колонии кремовые, желтые или оранжевые.

#### **Коагулаза-положительные и коагулаза-отрицательные стафилококки**

Коагулаза-положительными (способны сворачивать кровь) являются 5 видов стафилококков (тут основные): *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, среди которых патогенный для человека только золотистый СФ. Кроме СФ коагулаза-положительной является бактерия *Y. pestis* — возбудитель чумы.

К коагулаза-отрицательным относятся [эпидермальный](#) и [сапрофитный](#) стафилококки, а

также *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus* и другие виды. Коагулаза-отрицательные стафилококки менее патогенны, чем коагулазо-положительные.

Стафилококки каталаза +, оксидаза - .

Роль (по Бахаревой): Факторами П. являются: - адгезины – колонизация; - ферменты, ассоц. с образованием биопленки; - инвазины – обесп. внутриклеточную инвазию; - токсины (эндо и экзо) - могут накапливаться во внешней среде (энтеротоксин) и при попадании в пищевые продукты вызывают инфекцию.

Клиническая картина: - синдром ошпаренной кожи; - болезни кожи и подкожной клетчатки; - заболевания дыхательных путей (ангины, гаймориты); - болезни нервной системы и органов чувств (менингиты, абсцессы); - болезни системы кровообращения – сепсис; - б. мочевыводящей системы.

Специфические клин. проявления: - синдром ошпаренной кожи; - СТПШ (синдром токсического шока) – за счет выделения токсина; - некротическая форма пневмонии; - скарлатиноподобная лихорадка. *Группа риска: онкобольные, ВИЧ – инфицированные, новорожденные, люди получившие травмы. Путь передачи: воздушно – капельный, контактный, аспирационный (ИВЛ).*

Правила взятия клинич материала, условия и сроки хранения и транспортировки (привела в пример не весь материал): Выбор материала зависит от локализации инфекционного процесса: при гнойно-воспалительных – гной, моча, раневое отделяемое, кровь, мокрота, пунктат из очагов воспаления, мазки со слизистых носоглотки, СМЖ. При пищевых токсикоинфекциях – рвотные массы, промывные воды желудка, фекалии, продукты питания, смывы с инструментов, воздух, вода.

В общем: ликвор, кровь, мокрота, содержимое верхних дыхательных путей (на томпон), моча, раны, испражнения, катетер, разлчный клинический материал от новорожденных, пищевые продукты.

Моча – берут среднюю утреннюю порцию свободновыпущенной мочи, в стерильную емкость, до начала АБ терапии, перед сбором проводят тщательный туалет. Хранить без консерванта не более 2 часов при комнатной температуре. С консервантом-не более 24 часов (количественный Goldy)

Мокрота – прополоскать рот водой и почистить зубы, материал забирают в стерильную емкость с бусами для гомогенизации материала, перед посевом мокроту тщательно растирают в ступке, в стерильную банку с бусами помещают 1 мл мокроты и 9 мл ПептонВода. Из этого готовят 10и кратное разведение. Хранят не более 2 ч при комнатной температуре. Для транспортировки используют стерильную емкость с завинчивающийся крышкой. (посев количественный Lindsey)

Кровь – берут из локтевой вены, после тщательной обработки в месте прокола (70и % спирт). Для забора используют стерильный вакуумный шприц. Забор ведется до начала приема АБ. Если идет АБ терапия, то иссл 2 раза в день. В подъем температуры берут 2 пробы крови из разных вен с интервалом 15-20 минут. Оптимальное взятие 3-4 раза. 2 образца из разных вен- интервал 20 минут. Объем крови у взрослого 10-30 мл, у детей от 1-5. Посев производится у постели больного с ПС. Флаконы с ПС инкубируют при 35 градусах не менее 7 дней.

Методы выделения и идентификация:

Микроскопия – микр. метод имеет самостоятельное значение лишь при асептической работе с материалами, которые у здорового человека стерильны (н-р, кровь, спинномозговая жидкость). Обнаружение стафилококков при этом имеет самостоятельное диагностическое значение. В остальных случаях микроскопический метод применяется как предварительный, ориентировочный (мочу, кровь, фекалии, мазки из зева и носа не микроскопируют )

Бактериологический метод.

Используют количеств или условно-колич методы посева. Среды –КА (позволяет выделить наибольший спектр мо), ЖСА (определение наиб. патогенных), среда обогащения. Инкубация t=35, 24часа, аэробноз.

Схема:

1 день- микроскопия по ГР, Посев на чашку с соевым и кровяным МПА, Посев на МПБ с 7,5%NaCl(для крови) из расчета 1:10.

2 день- Микроскопический отбор колоний по пигменту и гемолизу, Микроск отбор колоний с окраской по ГР, Отсев на 1% сахарный МПА для выделения чистой культуры. при росте на КА колонии белого или золотисто желтого цвета. Колонии золотистого сф – окружены зоной полного гемолиза. На ЖСА – золот сф – зона помутнения - венчик (лецитиназа+)

3 день- Макро и микроскопический контроль чистой выдел культ, Определени основны тестов патогенности: плазмокоагулазы,гемотоксина,некротоксина. Определение чувствительности к АБ и поливалент бактериофаг. = опред тестов ваирулентности:гиалуронидаза,лецитиназы,ферментация мантиа,лактозы.

4 день – окончательную идентификацию до вида проводят по комплексу изученных биологических свойств. Внутривидовую дифференцировку проводят с помощью типовых БФ

Так же проверяем чувствительность к новобиоцину (*S. aureus* *S. saprophyticus* – чувствительны, s. ep. - нет).

### 13. Стрептококки, энтерококки: роль в патологии человека: правила взятия клинического материала, сроки и условия хранения и транспортировки: методы выделения и идентификации.

Стрептококки относятся к семейству Streptococcaceae роду Streptococcus. Основные представители рода *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. intermedius*, *S. Mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* *S. Agalactiae*.

Мелкие кокки. Способны вытягиваться в длинные цепочки. Не образуют спор, а некоторые образуют капсулу. Хемоорганотрофы, факультативные анаэробы. Лучше растут при повышенном содержании CO<sub>2</sub>. Ферментируют сахар без образования газа до молочной кислоты. Каталаза-, оксидаза-

Классификация по гемолитической активности:

Альфа-гемолитические : зеленые на агаре, частичный гемолиз. Пневмония (чувствит к оптоцину, растворим в желчи, капсула=реакция набухания) ,Вириденс (устойчив к оптоцину, нерастворим в желчи, нет капсулы)

Ветта-гем : прозрачн на агаре, полный гемолиз. Агалактиа(устойчив к бацитрацину)

Гамма-гем: отсутствие гемолиза Энтерококкус фекалис, фециум.

Классификация Лэнсфилд (основана на наличие группспецифичных С – полисахаридов в клеточной стенке)

Стрептококки группы А (*S. pyogenes*) – β-гемолитические стрептококки. Чаще всего вызывают рожистое воспаление, скарлатину, острый гломерулонефрит, ревматизм, ГВЗ уха, тканей пазух носа, флегмоны, пневмонии, послеродовой сепсис.

Стрептококки группы В (*S. agalactiae*) – β-гемолитические стрептококки – чаще всего вызывают инфекции мочеполового тракта, половых путей (чаще у женщин), остеомиелит, септический артрит, эндокардит, менингит, внутриутробные инфекции.

Стрептококки группы С (*S. dysgalactiae*, *S. anginosus*) – β-гемолитические стрептококки. Вызывают фарингиты, остеомиелиты, эндокардиты, менингиты, абсцессы мозга.

Стрептококки группы D. В эту группу входят преимущественно стрептококки вида *S. bovis*, возбудители эндокардитов и менингитов.

Стрептококки группы G – β-гемолитические стрептококки. Чаще всего вызывают респираторные инфекции, флегмоны, эндокардиты, менингиты. К этой группе относятся *S. anginosus* и *S. milleri*.

Энтерококки

Энтерококки (*Enterococcus*) – это род бактерий семейства Enterococcaceae (выделенный в 1984 г. из рода стрептококков. Разделены на 27 видов, объединенных в 5 групп. Часть из них – группа В. Диплококки.

Факультативные анаэробы. Т=10-45 (35-37 опт.), рН= 2.5-9.6. Они показатели фекального загрязнения. Дают гидролиз искулина на желчно-солевом агаре. Растут на солевом бульоне(стрептококки не растут). Дифференцировать между собой можно по отношению к сорбиту, арабинозе. Ряд Шармена позволяет дифференцировать стрептококки и энтерококки (МПА 45 градусов, молоко с мителеновой синью, МПБ 40% желчи, МПБ 6,5 % NaCl, МПБ рН 9.6 – эти показатели у стрептококков отрицательные, у энтерококков- положительные).

Вызывают многие заболевания, такие как: инфекция мочевыводящих путей, нагноение ран, бактериемия, дивертикулит, менингит, бактериальный эндокардит.

Правила взятия материала: выбор материала зависит от локализации инф процесса: гнойное отделяемое, кровь, мокрота, ликвор, отделяемое слизистой оболочки, моча, биоптаты.

Забор гнойного отделяемого: взятие материала проводят с помощью стерильного тампона, чаще всего во время операции или перевязки, тщательно обрабатывают поверхность вокруг раны ватным тампоном, смоченным 70% спирте. Используют круговые вращательные движения от центра к периферии раны, не касаясь краев. Если имеется гнойный экссудат, то его забирают шприцем или стерильным тампоном. Хранят не более 2 часов при комнатной температуре. Транспортируют: в стерильной емкости со средой для анаэробов, в шприце без иглы, закрытом резиновой пробкой

Методы выделения и идентификации: 1. Стрептококки

1 день: гнойное отделяемое окрашивают по граму (Грам + , 2мкм, цепочки). Первичный посев на КА и в сахарный бульон.

- для выделения стрептококков группы А и В из смеси культур посев делают на кровяной агар с неомисином;
- для выделения *Streptococcus bovis* посев материала делают на желчно-эскулиновый агар;
- для выделения *Streptococcus agalactiae* гнойное отделяемое сеют на селективный бульон с налидиксовой кислотой и гентамицином;
- в качестве сред обогащения используют бульон для стрептококков и среду для контроля стерильности.

После посева чашки помещают в эксикатор с плотно прилегающей крышкой или в анаэрошат, на дно которого ставят зажженную свечу. Стрептококки при культивировании в условиях повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  бурно растут. По мере возрастания  $\text{CO}_2$  в анаэробных условиях свеча гаснет, что создает благоприятные условия для роста стрептококка. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 ч.

### 2-й день исследования

Через 24 ч просматривают посев на твердой питательной среде и в сахарном бульоне. Изучают культуральные свойства. На кровяном агаре стрептококки образуют мелкие точечные колонии серовато-белого цвета. В сахарном бульоне отмечается придонно-пристеночный рост.

На кровяных средах образуются зоны гемолиза, по которым стрептококки делят на три группы:

- **β-Гемолитические стрептококки** — полное просветление среды вокруг колоний, полный лизис эритроцитов. Колонии слизистые, прозрачные, правильной формы, возможно матовые, шероховатые с приподнятым центром или мелкие, блестящие круглые с ровными краями и влажной поверхностью.
- Слизистая консистенция у колоний *Streptococcus pyogenes* (за счет капсулы).

Блестящие колонии характерны для *Streptococcus agalactiae*.

- **α-Гемолитические стрептококки** на кровяном агаре дают частичный гемолиз с формированием полупрозрачной с зеленоватым

оттенком зоны вокруг колоний, которая образуется в результате превращения гемоглобина в метгемоглобин. Колонии у зеленых стрептококков мелкие, сероватого цвета с гладкой или шероховатой поверхностью. Такой рост характерен для *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus otitidis*.

- **γ-Гемолитические стрептококки (негемолитические)** — при росте не изменяют питательную среду вокруг колоний. Клинического значения не имеют.

Рост стрептококка на жидкой питательной среде имеет свои особенности:

- *Streptococcus pyogenes* — придонно-пристеночный рост, прозрачная среда;
- *Streptococcus bovis*, *Streptococcus agalactiae* — вызывают интенсивное помутнение бульона с образованием однородного осадка.

На следующем этапе готовят мазки, окрашивают по Граму и микроосеивают. В мазках из выросших колоний характерных для возбудителя длинная цепочка кокков не обнаруживается. Стрептококки располагаются одиночно, парно, короткими цепочками или скоплениями неправильной формы.

Подозрительные на стрептококк колонии пересеивают на кровяной агар для накопления чистой культуры и ее дальнейшей идентификации.

### 3-й день исследования

Проверяют чистоту выделенной культуры, проводят микроскопию мазка.

Станят тесты для биохимической идентификации:

- определение вида гемолиза на кровяном агаре;
- постановка пробы на каталазу;
- определение чувствительности к бацитрацину и сульфаниламидам (сульфаметоксазол и триметоприм);
- постановка CAMP-теста (определение белка синергидного гемолиза);
- постановка теста Фогеса–Проскауэра (на образование ацетона);
- гидролиз гиппурата натрия;
- постановка желчно-эскулинового теста;
- рост в бульоне с 6,5% NaCl;
- определение наличия PYR (пирролидониламинопептидазы).

**Проба на каталазу** основана на способности бактерий, имеющих данный фермент, расщеплять перекись водорода с образованием кислорода и воды.

Для постановки теста чистую культуру тампоном или стеклянной палочкой вносят в каплю 3%-ного раствора перекиси водорода на стекле и растирают. В присутствии каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков газа.

**САМР-тест** основан на том, что стрептококки группы В (*Streptococcus agalactiae*) вырабатывают протеин (САМР-фактор), который усиливает лизис эритроцитов при взаимодействии с  $\beta$ -лизином золотистого стафилококка (белок синергидного гемолиза).

При постановке САМР-теста чашку с кровяным агаром засевают суточной культурой *S. aureus*, которая продуцирует  $\beta$ -лизин. Исследуемую культуру стрептококка засевают перпендикулярно к линии посева стафилококка. Для положительного контроля используют *Streptococcus agalactiae*, для отрицательного контроля — *Streptococcus pyogenes*. Инкубируют 18 ч при 37 °С. Если САМР-тест положительный, на месте пересечения посевов стафилококка и *Streptococcus agalactiae* выявляется зона усиления гемолиза в виде «крыла» бабочки, что свидетельствует о наличии в исследуемом материале *Streptococcus agalactiae*.

**PYR-тест** основан на обнаружении фермента пирролидонил-риламидазы, который продуцируют большинство стрептококков (*Streptococcus pyogenes*).

Для постановки теста 0,2 мл питательного бульона, который содержит 0,01 %  $\alpha$ -пирролидонил- $\beta$ -нафтиламида, засевают исследуемой культурой. Посев инкубируют при 37 °С в течение 4 ч.

После инкубации добавляют одну каплю альдегида. Положительная реакция проявляется ярко-красным окрашиванием.

**Желчно-эскулиновый тест** используют для дифференциации *Streptococcus bovis* (группа D), которые растут на желчно-эскулиновом агаре. При росте на среде образуется темно-коричневые или черные пятна. Для постановки теста изучаемую культуру засевают на агаровую среду, содержащую 40% желчи, 0,1 % эскулина, 0,05% цитрата железа. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч при 37 °С.

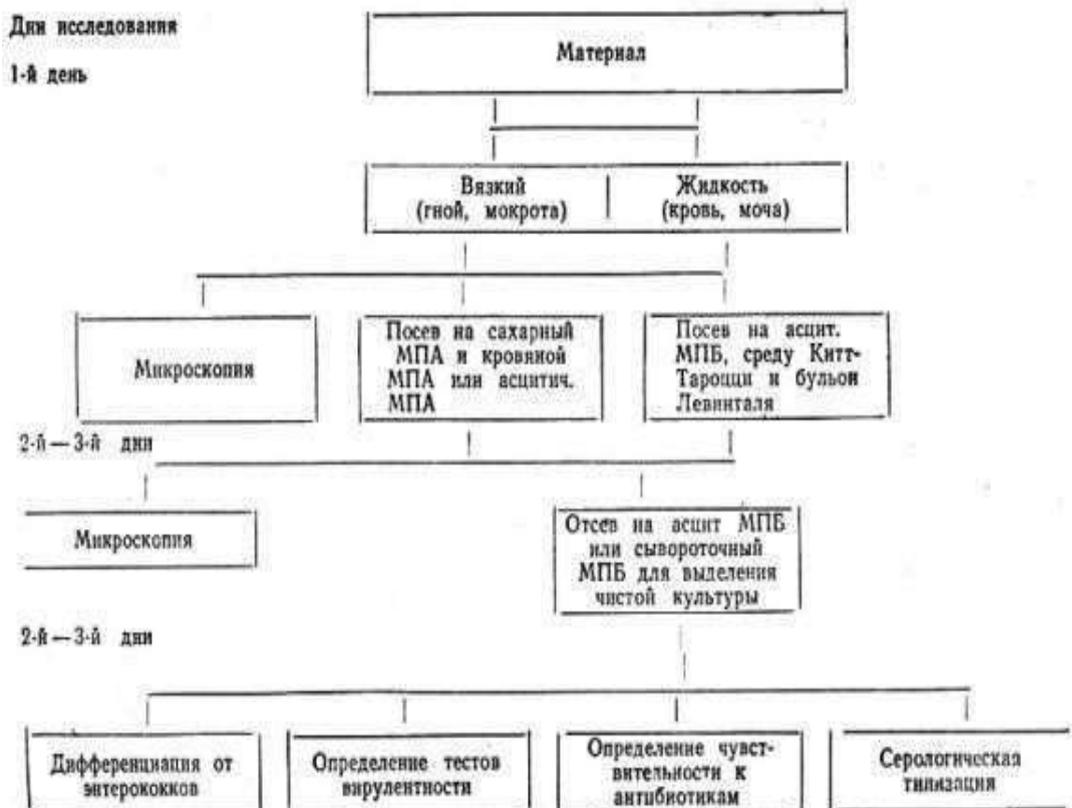
**Гидролиз гиппурата натрия.** Метод позволяет дифференцировать стрептококки группы В, которые способны вызывать гидролиз гиппурата натрия. Культуру стрептококка забирают петлей, тщательно размешивают в 0,4 мл 1%-ного водного раствора гиппурата натрия.

Инкубируют в течение 2 ч при 37 °С, после чего добавляют 0,2 мл 3,5%-ного раствора нингидрина в смеси бутанола и ацетона (1:1). Если реакция положительная, то через 10 мин появляется ярко-бордовое окрашивание.

#### **Серологическая диагностика стрептококковой инфекции**

- Обнаружение полисахаридного Аг клеточной стенки (группоспецифический полисахарид С) в реакциях преципитации, латекс-агглютинации и др.
- Определение в крови специфических стрептококковых Аг к стрептолизину О в парных сыворотках. Титры антистрептолизина О в норме — 250 МЕ, при острых и хронических стрептококковых инфекциях они возрастают (АЕ<sub>Sto</sub>).
- Определение титра антигиалуронидазы (АЕНуS) при диагностике активности ревматического процесса. В норме титр не превышает 300 единиц (АЕНуS), а у больных ревматизмом повышается до 1000 единиц и выше.
- Использование реакции коаггутинации для выявления *Streptococcus pyogenes* группы А в клиническом материале.
- ИФА при диагностике стрептококков группы А (*Streptococcus pyogenes*) в нативном материале.

### СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛА



## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПНЕВМОКОККАМИ

Пневмококки относятся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, виду *Streptococcus pneumoniae*. Возбудитель относится к нормальным обитателям верхних дыхательных путей и служит основным этиологическим фактором острых пневмоний, менингитов, отитов и синуситов.

### Материал для исследования

Выбор материала для исследования зависит от локализации инфекционного процесса: кровь, спинномозговая, плевральная и перикардиальная жидкость, мокрота, биопсийный, бронхоскопический материал, фарингеальные мазки.

### **1-й день исследования**

Из мокроты готовят два мазка: один окрашивают по Граму, другой — по методу Бурри–Гинса для выявления капсул. При микроскопии можно обнаружить грамположительные диплококки ланцетовидной формы, окруженные капсулой.

Возможна постановка реакции набухания капсулы по Нейфельду. Для этого готовят мазок из исследуемого материала с добавлением капли поливалентной пневмококковой антикапсулярной сыворотки и капли метиленовой сини. Мазок накрывают покровным стеклом и проводят микроскопию. Капсула вокруг клеток пневмококка набухает и увеличивается в размере, что позволяет ее четко увидеть. Этот феномен позволяет дифференцировать пневмококки от других стрептококков.

Первичный посев проводят на кровяной агар. Инкубируют при 37 °С в атмосфере с 5–10% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч.

### **2-й день исследования**

После инкубации чашки просматривают, выявляют характерные для пневмококка колонии с зоной L-гемолиза.

Колонии пересевают на чашки с кровяным агаром для накопления чистой культуры.

### **3-й день исследования**

Проводят дальнейшее изучение выделенной чистой культуры по феномену лизиса желчью.

**Тест лизиса с желчью** основан на способности 10% желчи крупного рогатого скота лизировать культуры пневмококка. Для постановки теста на плотную питательную среду, засеянную культурой, наносят каплю желчного бульона и выдерживают 10–15 мин.

Если на месте капли через это время клетки уплотняются или исчезают, то это *Streptococcus pneumoniae*. Только *Streptococcus pyogenes* растет.

**Тест с оптохином** основан на определении чувствительности пневмококка к оптохину. Выделенную чистую культуру засевают на кровяной агар, содержащий до 5 мкг/мл оптохина. Посевы инкубируют при

37 °С в течение 18–24 ч. После чего учитывают зону задержки роста, которая для *Streptococcus pneumoniae* должна быть не менее 18 мм, и диагностически превышать зону задержки роста α-стрептококков.

Окончательную идентификацию культуры проводят серологическими методами, которые позволяют идентифицировать капсулярный Ag пневмококка с помощью реакции преципитации, латекс-агглютинации.

#### **Серологическая диагностика**

Для серодиагностики проводят определение уровня антипневмококковых Ат в сыворотке крови больного, используя непрямой вариант метода флуоресцирующих Ат в РИФ. При постановке метода флуоресценции в качестве Ат используют аутоштаммы пневмококка, выделенные у больного. Для диагностики пневмококковой инфекции применяют биологический метод. Для его постановки 0,5–1 мл исследуемого материала вводят внутрибрюшинно белым мышам. Через несколько (до 5) дней мышь погибает от сепсиса, ее вскрывают, проводят забор крови из сердца, которую засевают и исследуют.

## **14. Понятие о нормальной микрофлоре. Функции нормофлоры. Основные виды нормофлоры в различных отделах ЖКТ. Благоприятные и неблагоприятные условия, создаваемые для МИ в различных отделах ЖКТ.**

**Нормальная микрофлора человека** – это совокупность множества микробиоценозов, характеризующихся определенными взаимосвязями и местом обитания.

В организме человека в соответствии с условиями обитания формируются биотопы с определенными микробиоценозами. Любой микробиоценоз – это сообщество микроорганизмов, существующее как единое целое, связанное цепями питания и микроэкологией.

Виды нормальной микрофлоры:

- 1) резидентная – постоянная, характерная для данного вида;
- 2) транзиторная – временно попавшая, нехарактерная для данного биотопа; она активно не размножается.

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

Функции нормальной микрофлоры:

- Защита от экзогенной инфекции и обеспечение собственного микробного гомеостаза.

Обеспечение колонизационной резистентности — одна из важнейших функций нормальной микрофлоры. Способность нормальной микрофлоры защищать поверхность слизистых оболочек и кожи от патогенных бактерий — мощный механизм противомикробной резистентности.

- Мощный иммуномодулятор. Нормальная микрофлора поддерживает иммунокомпетентные клетки в состоянии «постоянной готовности» праймирования (субактивации), что обеспечивает более быстрый и эффективный ответ на инфекцию.

- Активное участие в различных метаболических процессах за счет продукции большого количества ферментов и образования метаболитов при микробной трансформации эндогенного и экзогенного происхождения. Через каскад биохимических реакций исходный субстрат превращается либо в промежуточный, либо в конечный продукт катаболизма.

- Нормальная микрофлора — неограниченный банк генетического материала. Между представителями нормальной микрофлоры постоянно происходит обмен генетического материала, а также его передача патогенным видам, попадающим в ту или иную экологическую нишу.

- Детоксикация как в отношении организмов, попавших из внешней среды, так и в отношении эндогенной флоры, образующей токсические продукты метаболизма.

- Участие в регуляции газового, водно-солевого обмена, поддержании рН среды.

- Синтез витаминов, в том числе К, Е, В<sub>2</sub>, биотина, рибофлавина, пантотеновой кислоты, фолиевой кислоты.

Основные виды нормофлоры в различных отделах ЖКТ (по Хайдаршиной)

**Микрофлора ротовой полости и условия.** По большей части благоприятные условия: питание, вода, аэробные и анаэробные условия. Неблагоприятные факторы: механическое воздействие, лизоцим в слюне, наличие отдельных Е в слюне. Существуют особенности в видовом составе слизистых: языка, десен, зубнечесневых карманов, защечных мешков – аэробы и анаэробы.

Состав: до 60% стрептококки, лактобактерии, бифидобактерии, пропионобактерии, вейлонеллы, бактероиды и тд. Могут встречаться: кандиды, актиномицеты, непатогенные трепонемы, гемофилусинфлуэнца, микоплазмы, простейшие.

Первичное заселение нормофлорой происходит при прохождении через родовые пути: лакто и бифидо. В течение 2 дней они, затем в течение недели засев остальными.

**МФ желудка.** Пищевод и желудок контаминирован незначительно в силу создающихся условий: постоянное движение, питательных веществ мало, крайне низкие значения рН. Концентрация около 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Обитают чаще в толще.

Состав: стрептококки, лактобактерии, грибы. В меньшем количестве вейлонеллы, бактероиды.

**МФ тонкого кишечника.** Сложное местообитание, за счет большого кол-ва самых разнообразных Е: протеазы, липазы, желчные кислоты. Концентрация незначительна 100-1000 кл/мл

Состав: лактобактерии, бифидобактерии. Низкие концентрации: бактероиды, вейлонеллы, энтеробактерии.

В тонком кишечнике идет эмульгация жиров, располагаются выводные протоки поджелудочной железы – протеолитическая функция, бактерицидная.

**МФ толстого кишечника.** Концентрация клеток в содержимом до 25 \* 10<sup>10</sup> КОЕ/мл. Большое количество м/о, в том числе выделяется с фекалиями 1/3 выделяемого. В толстом кишечнике создаются анаэробные условия, концентрация анаэробов выше.

Удельный вес: облигатные анаэробы: бактероиды, бифидобактерии, лактобактерии до 70%, Аэробные актиномицеты до 17%, Аэробы: стафило-, стрепто- энтерококки, коринеформные бактерии до 5%, Энтеробактерии не более 2%, Транзиторная флора: клебсиеллы, клостридии, синегнойные палочки, дрожжи, простейшие.

В толстом отделе кишечника находятся в составе биопленки, в просвете планктонные формы.

Благоприятные условия – много питательных веществ.

**15. Дисбиоз ЖКТ: определение; причины; показания для обследования; правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала; подготовка материала для посева; питательные среды для выделения бактерий.**

Дисбиоз – нарушение количественного и качественного состава всей флоры: вирусы, простейшие, грибы, бактерии.

Причины:

Причины компенсированного дисбактериоза (неосложненные):

1. Пищевой дисбактериоз: диеты, богатые углеводами – ведут к увеличению бактериальной массы, жировая диета – угнетает бифидо и энтеро, возбуждает бактероиды, современные химические продукты
2. Стрессорный д-з возникает при попадании человека в необычные условия на долгое время: тяжелая физическая работа, космические полеты, зимовка в Антарктиде. Восстановление условий приводит к восстановлению МФ
3. Сезонный д-з
4. Возрастной д-з
5. Д-з при курении и употреблении алкоголя

Причины декомпенсированного дисбактериоза

1. Заболевания, патогенез которых связан с изменением эпителиальной ткани
2. Поражения ЖКТ инфекц или неинфекц природы
3. Острые вирусные и бактериальные инфекции некишечной локализации
4. Аллергические заболевания
5. Злокачественные процессы
6. Длительный прием АБ, гормональные препараты
7. Лучевая и химиотерапия

Показания для обследования: КЛИНИКА (нигде не нашла! Везде информация о дисбактериозе кишечника, если для него, то длительно протекающее заболевание кишечника неясной этиологии, переход острого инфекционного процесса в хронический, кишечный синдром неустановленной этиологии, анатомические нарушения кишечника, связанные с резекцией, опухолями и другими причинами, нередко исследование назначают больным с сахарным диабетом и с аллергиями различной этиологии).

Правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировка клинического материала

Материал: слюна (при дисб полости рта), кал (дисб кишечника),

СЛЮНА

Взятие материала. Провести тщательную гигиену полости рта (почистить зубы, прополоскать рот водой до полного удаления зубной пасты) ч/з 30 минут можно начинать сбор слюны в стерильную емкость (желательно в пробирку с красной крышечкой). Забор слюны можно производить в течение дня.

Хранение: при  $t^{\circ} +2 +8^{\circ}C$  — не более 6 час.

Транспортировка: в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

КАЛ

Забор материала

Фекалии собирают в стерильную посуду, соблюдая правила асептики через 8-10 часов после приема пищи 1г.

При естественной дефекации сбор проводят с пеленок или <sup>[1]</sup>из горшка стерильным шпательем, вмонтированным в ватную <sup>[1]</sup>пробку пробирки.

• Забор материала проводят при появлении первых признаков заболевания, до начала лечения антибиотиками.

• Забор фекалий можно проводить ректальным тампоном (материал от детей). Для этого тампон вводят за пределы анального <sup>[1]</sup>сфинктера и, аккуратно вращая, забирают материал из анальных <sup>[1]</sup>крип.

Хранение.

Сохранять материал на транспортном тампоне можно не <sup>[1]</sup>более 2 ч. В лабораторию он должен быть доставлен не позже 2 ч после <sup>[1]</sup>взятия, в противном случае его необходимо сохранять в холодильнике. При невозможности немедленного посева собранный материал <sup>[1]</sup>помещают в пробирки с консервирующим раствором. +4.

Транспортировка — в биксах, пеналах в течение 1-2 ч с соблюдением необходимых правил осторожности. Если возможности быстрой <sup>[1]</sup>доставки нет, то фекалии необходимо перенести в поддерживающую <sup>[1]</sup>среду Кэрри—Блейера, желательно не держать более 2 ч.

Подготовка материала для посева

СЛЮНА (не нашла)- бак посев *слюны* почти нигде не делают. Делают биохимический анализ слюны на дисбактериоз – это лабораторное исследование, основанное на определении уровня биохимических показателей, а именно метаболитов летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной), которые продуцируют микроорганизмы, живущие в полости рта и отражающие состояние желудочно-кишечного тракта. При различной патологии, как полости рта, так и со стороны желудка, кишечника, печени изменяется микрофлора, а соответственно и биохимические параметры. Определяя спектр летучих жирных кислот, можно судить о локализации и заболевании пищеварительного тракта.

Микроорганизмы участвуют в процессах пищеварения с образованием метаболитов – летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, масляная). Результаты изучения летучих жирных кислот в

ротовой полости показали, что уменьшение или увеличение концентраций кислот соотносится с определённой патологией, таким образом, легко можно диагностировать пародонтоз, гингивит, стоматит.

#### **КАЛ**

Испражнения взвешивают, берут ровно 1 г. Он гомогенизируется в 9 мл физ р-ра.

#### ПС для выделения бактерий

КАЛ: УПМ- Эндо, Сабуро, ЖСА, КА.

Киш. Патог: Плоскирева, ВСА

Облиг. Анаэр. : МРС (лактобактерии), ср. Рогоза, Блаурокка (бифидобактерии и лактобактерии).

Клостридии: ЖСС

### **16. Кишечный дисбиоз: подготовка клинического материала; питательные среды для выделения микроорганизмов и схема посева; методы идентификации; микробиологическая оценка полученных результатов.**

Показания на назначение: длительно протекающее заболевание кишечника неясной этиологии, переход острого инфекционного процесса в хронический, кишечный синдром неустановленной этиологии, анатомические нарушения кишечника, связанные с резекцией, опухолями и другими причинами, нередко исследование назначают больным с сахарным диабетом и с аллергиями различной этиологии.

Материал: испражнения. Испражнения взвешивают, берут ровно 1 г. Он гомогенизируется в 9 мл физ р-ра.

ПС и схема посева: УПМ- Эндо, Сабуро, ЖСА, КА (Lindsey)

Киш. Патог: Плоскирева, ВСА (метод Lindsey)

Облиг. Анаэр. : МРС (лактобактерии), ср. Рогоза, Блаурокка (бифидобак. и лактобак.).

Клостридии: ЖСС (Lindsey)

Схема:

1:10 на среды Плоскирева, ЖСА, САБуро. Методом Lindsey КА, Эндо. на 37Гр 48ч. 0,1 мл селенит б.

10-3, 10-5, 10-7, 10-9.

ЖСА, МРС, Блаурокка.

#### Методы идентификации

Через 20 - 22 часа на среде Эндо подсчитывают число и процент лактозонегативных (бесцветных) колоний по отношению ко всему числу выросших колоний. Колонии со слабо выраженными ферментативными свойствами (слабое разложение лактозы - розовые колонии) подсчитывают по отношению к общему числу колоний кишечной палочки.

С чашек со средами Эндо, Левина, Плоскирева выделяют не менее 4 - 5 колоний, отличающихся по морфологии, окраске на среды Рессела с мочевиной и солью Мора или на среду Олькеницкого, а также в пробирку с бульоном, под пробку которой подвешена индикаторная бумажка для определения индола. В дальнейшем лактозонегативные культуры изучают прежде всего в отношении принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Родовой состав лактозоотрицательных энтеробактерий, не относящихся к патогенным микробам семейства кишечных, может быть определен с помощью тестов, рекомендованных Всесоюзным центром по эшерихиям. Вместе с тем для выявления дисбактериоза можно не детализировать родовой состав лактозонегативных бактерий, а ограничиться определением на среде Эндо общей суммы лактозонегативных колоний.

Рост микробов рода протей характеризуется разложением мочевины и окрашиванием среды Рессела в фиолетово-коричневый цвет при индикаторе тимоловый синий + кислый фуксин или оранжевый при индикаторе ВР, на среде Олькеницкого - в оранжевый цвет.

На 3 - 5% кровяном агаре учитывают процентные соотношения колоний кишечной палочки, обладающих и не обладающих гемолизирующими свойствами; соотношения колоний кишечной палочки и кокковых форм; соотношения гемолизирующих и негемолизирующих кокков. Количество в 1 г фекалий указанных групп микробов учитывают, как это было указано, на среде Эндо.

С 5% кровяного агара пересевают колонии разного вида на скошенную поверхность слабощелочного агара. После 20 - 22-часовой инкубации в термостате при 37° проводят микроскопию окрашенных по Граму мазков. Культуры стафилококка проверяют в реакции плазмокоагуляции и в отношении лецитиназной активности на желточно-солевом агаре.

Для определения плазмокоагуляции петлю агаровой культуры стафилококка вносят в пробирку с 1 - 2 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы, разведенной 1:5 <\*>. Посевы помещают в термостат и проверяют результат через 30 минут, 2 - 4 и 24 часа. В качестве контроля ставят пробирки с плазмой без добавления культуры и с плазмой, в которую посеян заведомо коагулирующий стафилококк. При свертывании плазма полностью уплотняется или в пробирке плавает сгусток.

Для определения лецитиназной активности делают посев секторами на чашку с желточно-солевым агаром (на одну чашку можно посеять 4 - 8 культур). Посев инкубируют 24 - 48 часов при 37°, после чего учитывают результат. Лецитиназоположительной считают культуру, вокруг которой образуется радужный венчик.

Для дифференциации энтерококка от прочих диплококков и диплострептококков применяют следующие тесты: способность расти и редуцировать метиленовую синьку в молоке, как наиболее надежный тест, рост в бульоне с 40% желчи, расщепление маннита, терморезистентность (выживание при прогревании при 60° 30 минут).

С целью обнаружения патогенных грибов посевы на среде Сабуро инкубируют в течение 3 - 5 дней при 28 - 30°, выделяют плотные непрозрачные колонии в пробирки со скошенной поверхностью этой же среды. Посевы снова выдерживают в термостате при той же температуре 3 - 4 суток, после чего проводят микроскопию препарата из живой культуры в капле стерильной водопроводной воды при помощи объектива 40, окуляра 10. К патогенным грибам относят культуры почкующихся клеток при наличии длинных нитей мицелия (псевдомицелий) или более коротких нитей (истинный мицелий).

Для определения анаэробных бифидобактерий посевы на среде Блаурокк выращивают при 37° в течение 48 часов. Из посевов, в которых виден рост в виде помутнения всей среды, в виде отдельных колоний или тяжей, готовят окрашенные по Граму мазки. Обнаружение характерных грамположительных палочек с разветвлениями на концах, расположенных в виде римской цифры V, с несколько утолщенными концами или в виде скоплений, напоминающих китайские иероглифы, подтверждает их принадлежность к бифидобактериям. При отсутствии роста через 48 часов посевы оставляют в термостате до 72 часов.

Выделение чистой культуры *B. bifidum* является весьма трудоемким и практически необязательным, так как определение разведения, в котором обнаруживают *B. bifidum*, является вполне достаточным для оценки нормального или пониженного их содержания в фекалиях.

Исследования указанных представителей кишечной микрофлоры не исчерпывает весь биоценоз кишечника, тем не менее позволяет выявить нормальное или нарушенное состояние кишечной микрофлоры.

#### Оценка полученных результатов:

Диагноз дисбактериоза выставляется на основании данных бактериологических исследований (двух- и трехкратных), при наличии стойких отклонений от нормы, по качественным и количественным показателям и их сочетанием, например:

- при отсутствии роста бифидобактерий в  $10^6$ - $10^8$  разведении, молочно-кислых бактерий в  $10^2$  разведении;
- при снижении количества типичной кишечной палочки до  $10^4$  и менее в 1 г фекалий;
- при увеличении количества лактозонегативных штаммов кишечных палочек более 10-20%, при выделении из фекалий гемолизирующей кишечной палочки в любом количестве, а также выделения *St. aureus*;
- при выделении из фекалий условно-патогенных микроорганизмов (протей, кандиды) более  $10^5$  у детей и более  $10^4$  у взрослых; - при увеличении количества штаммов *Str. faecium*, когда соотношение *Str. faecalis/Str. Faecium* <3

**17. Нормофлора генитального тракта женщины: основные представители; факторы, определяющие микрoэкологический баланс влагалища (строение эпителия, гормональный статус, колонизационная резистентность). Изменения нормофлоры влагалища в онтогенезе.**

Основными представителями микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста являются **лактобактерии**, их количество достигает  $10^7$ - $10^8$  в 1 мл вагинального отделяемого.

Колонизация влагалища лактобактериями обусловлена высоким уровнем эстрогенов у женщин детородного возраста. Эстрогены индуцируют накопление в вагинальном эпителии гликогена, являющегося субстратом для лактобактерий, и стимулируют образование рецепторов для лактобактерий на клетках вагинального эпителия. Лактобактерии расщепляют гликоген с образованием молочной кислоты, которая поддерживает pH влагалища на низком уровне (4,4-4,6) и является важнейшим контролирующим механизмом, препятствующим колонизации патогенными бактериями этой экологической ниши. Продукция перекиси водорода, лизоцима, лактацинов способствует поддержанию колонизационной резистентности.

Нормальная микрофлора влагалища включает **бифидобактерии (встречаются редко), пептострептококки, пропионибактерии, бактероиды, коринеформные бактерии,**

коагулазоотрицательные стафилококки. Преобладающими микроорганизмами являются анаэробные бактерии, соотношение анаэробы/аэробы составляет 10/1. Примерно у 50% здоровых сексуально активных женщин обнаруживаются *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, а у 5% - бактерии рода *Mobiluncus*.

На состав микрофлоры влагалища оказывают влияние беременность, роды, возраст. Во время беременности количество лактобактерий повышается и достигает максимума в III триместре беременности. Доминирование лактобактерий у беременных снижает риск патологической колонизации при прохождении его через родовые пути. Роды приводят к резким изменениям в составе микрофлоры влагалища. Снижается количество лактобактерий и существенно увеличивается количество бактероидов, эшерихий. Данные нарушения микробиоценоза транзиторны, и к 6-й неделе после родов состав микрофлоры возвращается к норме.

При рождении влагалище новорожденной девочки стерильно, но уже в первые 24 часа колонизируется аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами. В последующем, через несколько дней, в вагинальной микрофлоре новорожденной начинают преобладать лактобактерии. Это связано с наличием эстрогенов, полученных ребенком трансплацентарно от матери. Доминирование лактобактерий и ограниченность остальной флоры до кислотоустойчивых видов делает состав микрофлоры влагалища новорожденной девочки похожим на состав микрофлоры влагалища взрослых женщин.

К концу периода новорожденности трансплацентарно полученные эстрогены метаболизируются, происходит уменьшение запасов гликогена в эпителиоцитах и, как следствие, элиминация лактобактерий, среда становится менее кислой, в микрофлоре начинают доминировать анаэробы.

После наступления менопаузы в генитальном тракте снижаются уровни эстрогенов и гликогена, уменьшается количество лактобактерий, преобладают анаэробные бактерии, pH приобретает нейтральное значение.

Полость матки в норме стерильна.

#### **18. Характер микрофлоры при вагинозе; причины нарушения состава микрофлоры; материал для исследования, правила взятия, транспортировки, хранения; микроскопическая картина вагинального мазка в норме и при вагинозе.**

##### Характеристики бактериального вагиноза:

Бактериальный вагиноз является результатом замещения нормальной микрофлоры женских половых органов на условнопатогенную анаэробную флору. Здоровое влагалище заселено лактобациллами (более чем на 95%) которые поддерживают кислую среду, препятствующую размножению патологических микроорганизмов.

Вагиноз не является воспалительной и инфекционной болезнью, или заболеванием передающимся половым путем.

• Отмечается обильный избыточный рост условно-патогенной, преимущественно анаэробной, микрофлоры: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Mycoplasma hominis* и некоторых других микроорганизмов. Их численность может увеличиваться в сотни и даже тысячи раз.

• Количество лактобацилл при этом заметно снижается вплоть до полного их исчезновения.

• Воспалительная реакция во влагалище отсутствует.

##### Причины развития

До конца причины развития бактериального вагиноза так и не выяснены. Врачи могут выделить только несколько факторов, которые чаще всего провоцируют замещение нормальных микроорганизмов на патогенные.

##### **К таковым относятся:**

• длительный прием антибактериальных препаратов (антибиотиков);

• снижение иммунитета на фоне других заболеваний;

• нарушения в гормональном фоне, в том числе беременность, аборт;

• токсические факторы окружающей среды;

• частое использование контрацептивов местного назначения – например, вагинальные таблетки или свечи.

• Частая смена половых партнеров.

Материалом для исследования на наличие бактериального вагиноза является

• *Содержимое заднего свода влагалища (забирается ватным тампоном)*

• *Содержимое цервикального канала (забирается ватным тампоном)*

Забор материала производится медицинским специалистом на тампон с лизированной кровью (чтобы сохранить облигатных анаэробов) на 2 тампона.

##### **Правила взятия, хранения, транспортировки:**

##### 1. Вульва, преддверие влагалища

Рекомендации по забору биологического материала :

1. Материал собрать с помощью стерильного одноразового зонда–тампона;
2. При воспалении бартолиниевых желез производят их пункцию;
3. После взятия материала аккуратно извлечь тампон и поместить в пробирку с транспортной сре-

дой. Хранение и транспортировка

Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

2. Материал из влагалища

Рекомендации по забору биологического материала:

1. Материал необходимо брать до проведения мануальных исследований;
2. Ввести гинекологическое зеркало и подъемник;
3. С помощью двух стерильных одноразовых зонд–тампонов осуществить сбор исследуемого материала с заднего свода влагалища или патологически измененных участков;
4. Первый тампон поместить в пробирку с транспортной средой.

5. Второй тампон использовать для приготовления мазка, материал наносится на два предметных стекла. Если одновременно планируется исследование из цервикального канала и/или уретры, все 2–3 мазка можно сделать на одном стекле (в лабораторию доставляются два стекла, на каждом из которых мазки из всех трех биотопов). Мазки промаркировать, высушить и поместить в специальные планшеты для транспортировки стекол или чашки Петри;

Хранение и транспортировка

Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

3. Материал из цервикального канала

Рекомендации по забору биологического материала:

1. Перед взятием материала необходимо удалить стерильным ватным тампоном слизь, затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
2. Ввести узкий (алюминиевый или тонкий пластиковый) зонд–тампон в цервикальный канал на глубину 1,0–1,5 см и вращательным движением осуществить сбор биоматериала в течение 5–10 с. Аккуратно извлечь тампон.

Хранение и транспортировка

Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

**Микроскопическая картина вагинального мазка в норме и при вагинозе**

Нормальная бактериоскопическая картина – палочки Дедерляйна (молочные бактерии). Они должны определяться в мазке вместе с эпителиальными клетками (поверхностный слущивающийся слой стенок влагалища) и небольшим количеством лейкоцитов (до 20 в поле зрения микроскопа).

При бактериальном вагинозе происходит изменение влагалищной флоры: преобладание мелкой палочки над нормальной палочкой молочной бактерии, и наличие «ключевых» клеток – картины, встречающейся только при бактериальном вагинозе: это клетки эпителия, «облепленные» мелкой палочкой.

**19. Микробиологическая диагностика вагиноза: исследуемый материал, правила сбора, условия и сроки хранения, транспортировки; методы исследования; микробиологические критерии дисбиоза.**

Методы исследования:

- Исключение ЗППП
- Микроскопия вагинального мазка, окрашенного по Грамму (КК, лейкоциты, вариабельность окраски клеток микроорганизмов)
- Постановка аминотеста: 1-2 капли вагинального отделяемого на предметное стекло, 1-2 капли 10% го раствора щелочи. Появление «рыбного» запаха – один из признаков дисбиоза.
- Определение рН влагалищного отделяемого
- Посев вагинального отделяемого на питательные среды

**Правила взятия, хранения, транспортировки:**

1. Вульва, преддверие влагалища

Рекомендации по забору биологического материала :

1. Материал собрать с помощью стерильного одноразового зонда–тампона;
2. При воспалении бартолиниевых желез производят их пункцию;
3. После взятия материала аккуратно извлечь тампон и поместить в пробирку с транспортной средой.

Хранение и транспортировка

Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

### 2. Материал из влагалища

Рекомендации по забору биологического материала:

1. Материал необходимо брать до проведения мануальных исследований;
2. Ввести гинекологическое зеркало и подъемник;
3. С помощью двух стерильных одноразовых зонд–тампонов осуществить сбор исследуемого материала с заднего свода влагалища или патологически измененных участков;
4. Первый тампон поместить в пробирку с транспортной средой.
5. Второй тампон использовать для приготовления мазка, материал наносится на два предметных стекла. Если одновременно планируется исследование из цервикального канала и/или уретры, все 2–3 мазка можно сделать на одном стекле (в лабораторию доставляются два стекла, на каждом из которых мазки из всех трех биотопов). Мазки промаркировать, высушить и поместить в специальные планшеты для транспортировки стекол или чашки Петри;

### Хранение и транспортировка

Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

### 3. Материал из цервикального канала

Рекомендации по забору биологического материала:

1. Перед взятием материала необходимо удалить стерильным ватным тампоном слизь, затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
2. Ввести узкий (алюминиевый или тонкий пластиковый) зонд–тампон в цервикальный канал на глубину 1,0–1,5 см и вращательным движением осуществить сбор биоматериала в течение 5–10 с. Аккуратно извлечь тампон.

### Хранение и транспортировка

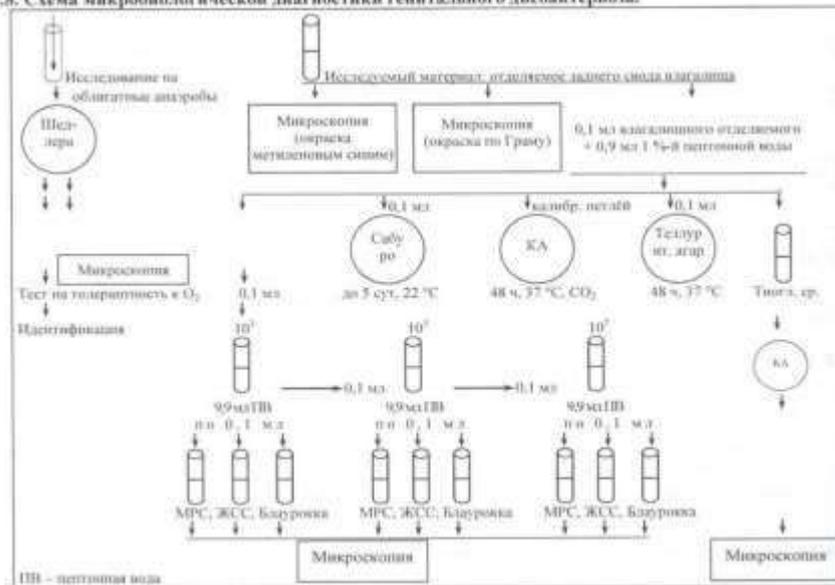
Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

### **Микроскопическая картина вагинального мазка в норме и при вагинозе**

Нормальная бактериоскопическая картина – палочки Дедерляйна (молочные бактерии). Они должны определяться в мазке вместе с эпителиальными клетками (поверхностный слущивающийся слой стенок влагалища) и небольшим количеством лейкоцитов (до 20 в поле зрения микроскопа).

При бактериальном вагинозе происходит изменение влагалищной флоры: преобладание мелкой палочки над нормальной палочкой молочной бактерии, и наличие «ключевых» клеток – картины, встречающейся только при бактериальном вагинозе: это клетки эпителия, «облепленные» мелкой палочкой.

4.8. Схема микробиологической диагностики генитального дисбактериоза.



30

**Основные микробиологические критерии бактериального вагиноза**

Показатель	Нормальный состав	Бактериальный вагиноз
Lactobacillus	Максимальное количество	Резкое уменьшение
Отношение анаэробы : аэробы	2:1 - 5: 1	100: 1 - 1000: 1
Gardnerella	5-60%	70-90%
Mobiluncus	< 5%	80-100%
Mycoplasma	15-30%	60-75%
Candida	< 2%	30-35%

**20. Классификация инфекций УГТ: по локализации (перечислить и пояснить), по времени проявления (перечислить и пояснить), по способу передачи (перечислить заболевания, возбудителей и методы их обнаружения или выделения).**

Классификация инфекций генитального тракта *по месту локализации:*

- Вульвит –воспаление слизистой вульвы встречается редко, является следствием вагинита
- Вагинит /кальпит
- Эндометрит - воспаление слизистой эндометрия матки
- Сальпингит –воспаление слизистой маточных труб

- Оохолит – воспаление яичников
- Перитонит –воспаление брюшины

*По времени проявления:*

- Первичные – когда ворота инфекции в половом аппарате женщины

• Вторичные – когда инфекционный агент заносится из первичного очага гематогенным или лимфогенным путем.

*По способу передачи:*

• Инфекции, передающиеся половым путем специфические (имеют определенную клиническую картину) –сифилис, гонококковая инфекция, уrogenитальный хламидиоз, уrogenитальный трихомониаз, венерическая лимфогранулема (хламидии), шанкроид (гемофилус дюкрей, протекают по типу сифилиса), паховая гранулема, аногенитальные бородавки, аногенитальная герпетическая вирусная инфекция) (методы выделения: микроскопические, выделение хламидий в культурах клеток, иммунологические методы)

• Неспецифические передающиеся половым путем –микоплазмоз и уреоплазмоз, цитомегаловирусная инфекция (бактериологический посев, иммунологические методы , ПЦР)

• Заболевания, не передающиеся половым путем – вульвовагинальные инфекции. Среди них различают бактериальный вагиноз, цитолитический вагиноз, вульво-вагинальный кандидоз, неспецифический вагинит (методы выделения в пред. вопросах)

•

**21. Возбудители неспецифических инфекций генитального тракта женщины; правила сбора, условия и сроки хранения, транспортировки клинического материала; особенности бактериоскопии вагинального мазка; методы выделения и идентификации.**

Различают воспалительные процессы *неспецифической и специфической этиологии*. **К первой группе** относят воспалительные процессы, вызванные *стафилококками, кишечной палочкой, стрептококками, синегнойной палочкой, ко второй* - обусловленные *трихомонадами, гонококками, кандидами, вирусами, микоплазмами, хламидиями*.

#### **4.11. Возможные возбудители неспецифических вагинитов.**

Аэробы, микроаэрофилы		Строгие анаэробы			
Staphylococcus	Haemophilus	Clostridium	Fusobacterium	Leptotrichia	Porphyromonas
Streptococcus	Enterobacteriaceae	Peptococcus	Differoides	Propionobacterium	Veilonella
Enterococcus		Peptostreptococcus	Prevotella	Actinomyces	Bilophila spp.
		Bacteroides			

правила сбора, условия и сроки хранения, транспортировки клинического материала; (См. Выше)

**Особенности бактериоскопии вагинального мазка;**

При неспецифическом вагините всегда встречается большое количество лейкоцитов (от 30 до 60 и более). Ключевые клетки отсутствуют, но достаточно много клеток слущенного эпителия влагалища. В целом микроскопическая картина характерна для воспалительного экссудата.

#### **Методы выделения и идентификации**

Для диагностирования неспецифического вагинита используют следующие методы:

• **Бактериологический.** Во время осмотра женщины берут материал для исследования. Его помещают на специальную благоприятную среду для роста возбудителей. Через несколько дней можно оценить выросшие бактерии. Этот метод диагностики является малоинформативным ввиду того, что во влагалище в любом случае присутствует много разнообразных микроорганизмов. Более информативную картину дает второй метод исследования, количественный.

• **Бактериоскопический (количественная оценка).** Аналогично берут мазок на микроскопическое исследование. Содержимое окрашивают специальным препаратом. При этом можно точно определить тип микроорганизмов, вызвавших воспаление. Их может быть несколько. Неспецифический вагинит характеризуется высоким количеством лейкоцитов в мазке.

• **Осмотр с помощью зеркала.** Помогает наглядно увидеть поражения слизистой оболочки влагалища.

#### 4.13. Этапы лабораторной диагностики:

- Исключение ЗППП.
- Микроскопия мазков, окрашенных по Граму (соотношение грам-/+ флоры, наличия лейкоцитов).
- Культуральные методы диагностики. Основным критерием определения вирулентности каждого микроорганизма является **степень обсеменённости**, которая клинически значима при концентрации  $>10^5$  КОЕ/мл исследуемого материала.

#### 4.14. Принципиальная схема исследования отделяемого женских половых органов.



**22. Возбудители инфекций МВП: пути проникновения; характер патологий; клинический материал для микробиологического исследования (правила сбора, транспортировки, хранения); критерии этиологической значимости выделенных микроорганизмов.**

##### Потенциальные возбудители:

- Кишечная микрофлора: E.coli? Klebsiella, Proteus, Энтерококки, анаэробы)  
 Кожная флора: Стафилококкус, стрептококкус, Коринебактериум, анаэробы)  
 Вагинальная микрофлора: Лактобациллус, Стафилококкус, Коринебактериум  
 Госпитальная микрофлора: Аценобактер, Псевдомонады, др НГОБ.  
 Госпитальные возбудители: E/coli, K.pneumonia  
 Энтерококкус, Энтеробактер, Протеус, Стрептококкус, Ацинобактер

##### Пути проникновения микроорганизмов :

1. **Восходящий путь** – попадают из рядом расположенных локусов (кишечник, кожная флора, вагинальная флора, возбудители заболеваний передающиеся половым путем, нозокомиальная (госпитальная) флора)

В норме моча выходящая из почки стерильна

2. **Гематогенный путь** – происходит когда в организме человека есть другой очаг воспаления (нозокомиальная микрофлора, патогенны M. tuberculosis, оппортунисты, УПМ)

##### Правила взятия, хранения, транспортировки материала:

##### Моча

Исследованию подвергается утренняя средняя порция свободно выпущенной мочи (за ночь концентрация бактерий в мочевом пузыре возрастает).

Не рекомендуется принуждение пациента к приему жидкости для форсирования диуреза, так как при разбавлении мочи снижается число бактерий.

1. Нельзя собирать мочу из мочевого приемника. Следует использовать стерильную емкость с завинчивающейся крышкой или специальную систему, предназначенную для сбора мочи.

2. Перед взятием пробы мочи провести тщательный туалет наружных половых органов с мылом с целью предотвращения контаминации пробы мочи нормальной микрофлорой половых органов;

3. После того как была выпущена первая небольшая порция мочи, собрать среднюю порцию в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой или в специальную систему, предназначенную для сбора мочи;

4. При невозможности соблюдения необходимых условий и правил хранения и транспортирования пробы мочи произвести повторный забор материала, так как могут быть получены недостоверные результаты исследования;

Хранение и транспортировка

Доставка в лабораторию в течение 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение в холодильнике (от 4 до 8 С°) не более 12 ч.

**23. Типичные и атипичные возбудители инфекций МВП. Правила сбора, условия и сроки хранения, транспортировки клинического материала; этапы выделения и идентификации возбудителей инфекций МВП.**

Правила сбора, условия и сроки хранения, транспортировки клинического материала (см. выше)

**Этапы выделения и идентификации возбудителей инфекций МВП.**

1) общеклинические анализы: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимические исследования крови (мочевина, креатинин) и мочи (диастаза).

Наиболее информативным на первичном этапе является общий анализ мочи. Для исследования берется средняя порция утренней мочи. При исследовании подсчитывают количество лейкоцитов, эритроцитов, благодаря чему можно заподозрить бактериурию (бактериальный воспалительный процесс). Также информативны такие показатели как белок, сахар, удельный вес.

2) бактериологический метод (посев мочи на специальные питательные среды с целью обнаружения роста в них определенных видов микроорганизмов), при котором средняя порция утренней мочи забирается в стерильную посуду;

3) метод ПЦР (при отрицательном бакпосеве и продолжающейся инфекции мочевыводящих путей) – для выявления таких микроорганизмов как хламидии, микоплазмы.

**4.8. Схема микробиологического исследования при инфекции МВП.**



**Типичные и атипичные возбудители инфекций МВП**

К *специфическим инфекциям* мочеполовых органов относят, вызванные следующими микроорганизмами:

1. Гонорея.
2. Трихомоноз.
3. Сифилис.
4. Микст-инфекция.

Это означает, что например уретрит, вызванный сифилисом или гонореей, является специфическим. Микст-инфекция – это сочетание нескольких возбудителей специфической инфекции с

формированием тяжелого воспалительного процесса.

*Неспецифические инфекции* мочеполовой сферы обусловлены следующими микроорганизмами:

- кокки (стафилококки, стрептококки);
- палочки (кишечная, синегнойная палочка);
- вирусы (например, герпес, цитомегаловирус и т.д.);
- хламидии;
- гарднереллы;
- уреаплазмы;
- грибки рода Кандида.

Данные возбудители приводят к развитию воспалительного процесса, который является типовым, и не имеет каких-либо особенностей. Поэтому, например аднексит, вызванный хламидиями или стафилококками, будет называться неспецифическим.

#### **24) Нормальная микрофлора ВДП. Характеристика заболеваний ВДП; основные возбудители; правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала; схема выделения и идентификации возбудителей.**

##### Нормофлора ВДП

В верхние дыхательные пути попадают пылевые частицы, нагруженные микроорганизмами, большая часть которых задерживается и погибает в носо- и ротоглотке. Нормофлора ВДП представлена коринебактериями (дифтероидами), нейссериями, коагулазо-отрицательными стафилококками, альфа-гемолитическими стрептококками, гемофильными палочками, бактероидами, энтерококками. В качестве транзиторных видов могут присутствовать: *Staf. aureus*, *Escherihia coli*; и бета-гемолитические стрептококки. Микробиоценоз зева еще более разнообразен, поскольку здесь смешивается микрофлора полости рта и воздухоносных путей.

##### Заболевания

**Синусит (риносинусит)** - бактериальная или вирусная инфекция, сопровождающаяся воспалением слизистой оболочки полости и придаточных пазух носа.

Возбудители при остром бактериальном синусите, рецидивирующем остром синусите и обострениях хронического синусита - *S.pneumoniae* и *H.influenzae*. Реже встречаются *M.catarrhalis*, *Strep.pyogenes*, *S.aureus*, анаэробы. При хроническом синусите заболевание часто имеет полимикробную этиологию и вызывается ассоциациями, включающими анаэробы (*Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*), *Corynebacterium spp.*, *S.pneumoniae* и *H.influenzae*, *S.aureus*, грамотрицательные бактерии, грибы.

**Фарингит** - это острое воспаление слизистой оболочки глотки обычно вирусного, реже бактериального, происхождения.

**Тонзиллит** - острое воспаление небных миндалин обычно в результате стрептококковой, реже вирусной, инфекции.

**Стрептококковый тонзиллит** (ангина) - тонзиллит или фарингит, вызванный БГСА (*S.pyogenes*).

Среди бактериальных возбудителей *острого тонзиллита* и *фарингита* наибольшее значение имеет БГСА (бета - гемолитический стрептококк серологической группы А). Реже острый тонзиллит вызывают стрептококки группы С и G, *A.haemolyticum*, *N.gonorrhoeae*, *C.diphtheriae*, анаэробы и спирохеты, редко - микоплазмы и хламидии.

**Острый эпиглоттит** - это быстро прогрессирующее воспаление надгортанника и окружающих тканей, которое может привести к резкой полной обструкции ДП. Основным возбудителем эпиглоттита является *H.influenzae* типа В, которая может быть выделена при бактериологическом исследовании мазков с надгортанника и крови. У взрослых заболевание могут вызывать грамположительные возбудители (зеленящие стрептококки, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes* и *S.aureus*) и анаэробы.

##### Правила сбора, хранения и транспортировки материала

Материал забирают натощак до чистки зубов и споласкивания полостей рта, носа и глотки. При заборе материала из носа используют тампоны, отдельные для каждой ноздри. При отсутствии секрета тампоны можно смочить 0,9% раствором NaCl. Правильная техника забора материала из зева имеет решающее значение. Нельзя прикасаться тампоном к слизистой оболочке полости рта и языка. Поскольку микроорганизмы располагаются неравномерно, следует, используя один тампон, сначала обтереть правую миндалину, затем — нёбную дужку, язычок, левую миндалину и заднюю стенку глотки.

Материал берут в острую фазу до АБ терапии. Материал доставляют не позднее чем через 24 с момента взятия.

##### Схема выделения

**Материал: мазок на тампоне:** микроскопия. Условно-количественный посев 5%КА, 37гр,48ч. микроскопия чистой культуры.

Материал взятый шприцем из закрытых полостей: 1) 5%КА+ тиогл.ср. 2) Ср. шедлера + Шедлера .

**25) Основные возбудители заболеваний НДП. Правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала; среды для выделения возбудителей; критерии этиологической значимости; методы идентификации.**

Нижние отделы дыхательных путей обычно стерильны.

Основные возбудители

Среди бактериальных возбудителей обострений хронического бронхита ключевое положение занимают *H.influenzae*, *Strep.pneumoniae* и *M.catarrhalis*. Определенное этиологическое значение приобретают *P.aeruginosa*, *S.aureus*, энтеробактерии.

Возбудителями внебольничных пневмоний являются пневмококк, *M.pneumoniae*, Хламидия *pneumoniae*, *L.pneumophila*, *H.influenzae*, *E.coli* и *K.pneumoniae*, *S.aureus*. В этиологии нозокомиальной пневмонии преобладает грамотрицательная микрофлора семейства *Enterobacteriaceae* *Pseudomonas aeruginosa*.

Развитие абсцесса легкого связывается прежде всего с анаэробной флорой - *Bacteroides spp.*, *F.nucleatum*, *Peptostreptococcus spp.*, *P.niger* - нередко в сочетании с энтеробактериями (вследствие аспирации содержимого ротоглотки).

Правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала

Исследуемый материал: мокрота(основной!), кровь, плевральная жидкость, транстаракльный аспират.

Мокрота

- Исследуют свободно откашливаемую мокроту, утреннюю порцию, натошак
- Пациент предварительно должен почистить зубы, дёсны, язык, слизистую оболочку щёк зубной щёткой и прополоскать рот кипяченой водой.
- Если мокрота отделяется плохо, накануне пациенту дают отхаркивающие средства или проводят ингаляцию физ. раствором.
- Мокроту собирают в стерильную посуду с крышкой.
- Сроки доставки мокроты в лабораторию не должны превышать 1,5-2 часа от момента её получения (допускается хранение в холодильнике, но не более 6 часов), т.к. задержка ведёт к аутолизу *S.pneumoniae*, а за счёт размножения бактерий-контаминантов меняется истинное соотношение микрофлоры бронхиального секрета.

Плевральная жидкость

- Кожу перед пункцией обрабатывают 70% этиловым спиртом, затем спиртовой настойкой йода, затем опять спиртом.
- После прокола жидкость собирают шприцем в стерильную пробирку и незамедлительно отправляют в лабораторию.

Среды и критерии этиологической значимости

Для посева материала из НДП используются среды: кровяной агар, шоколадный агар, Эндо и Сабуро. Посев производят количественным методом по Lindsey.

Этиологическая значимость -  $10^6$ КОЕ/мл. При сборе материала щетками (бронхоальвеолярный лаваж) -  $10^7$ КОЕ/мл.

Методы идентификации

ПЦР, ИФА, РА, РПГА.

**26) Атипичные возбудители инфекций НДП: характеристика; правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала; схема лабораторной диагностики.**

К атипичным возбудителям инфекции НДП относят *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*.

*Mycoplasma pneumoniae* – микроорганизм, лишенный внешней мембраны, что обуславливает его природную устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, для него характерна тесная ассоциация с мембраной эукариотических клеток (мембранотропный патоген), возможна внутриклеточная локализация.

*Chlamydia pneumoniae* – микроорганизм, являющийся исключительно внутриклеточным паразитом, близким по строению к грамотрицательным бактериям; вызывает пневмонию в 2–8% случаев, как правило, нетяжелого течения. В последнее время накапливаются данные о частом выделении этого микроорганизма в ассоциации с другими «легочными» патогенами; микроорганизмы рода *Legionella* – грамотрицательные палочки, являющиеся облигатными патогенами. *Legionella spp.* (прежде всего *Legionella pneumophila*) – нечастый возбудитель внебольничной пневмонии (2–10%); однако легионеллезная пневмония занимает второе место (после пневмококковой) по частоте смертельных исходов заболевания.

Частота микоплазменных пневмоний возрастает во время эпидемических вспышек, повторяющихся каждые 4–5 лет, и может достигать в среднем 20% от общего числа ВП в осенне–зимний период. Этот возбудитель чаще вызывает заболевания у молодых людей. Клиническая картина обычно включает лихорадку, фарингит, миалгии, астению и внелегочные осложнения. Заболевание может излечиваться спонтанно в течение 1–2 недель, но нередко продолжается на протяжении 4–6 нед. со всеми проявлениями болезни, включая кашель со слизистой мокротой.

Пневмонии, вызванные хламидиями, стали известны сравнительно недавно. Клиническая картина этой инфекции, кроме проявлений собственно бронхита и пневмонии, включает фарингит и ларингит. Воспаление бронхов, вызванное хламидией, как правило, встречается у молодых больных и практически не наблюдается в старческом возрасте.

#### Лабораторная диагностика «атипичных» внебольничных пневмоний

В последнее время получил распространение иммуноферментный тест – с определением в моче специфичного растворимого антигена *L. pneumophila* (1–й серотип), однако в нашей стране использование этих методов экспресс–диагностики не вышло за рамки отдельных клинических центров. В настоящее время перспективным является метод ПЦР для диагностики таких возбудителей, как *Sll. pneumoniae* и *M. pneumoniae*.

Правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки клинического материала смотри в 25 вопросе!!!

### **27) Гемофилы: клинически значимые виды; экология; морфологические, культуральные, биохимические, антигенные свойства; схема выделения и идентификации.**

Род *Haemophilus* входит в семейство *Pasteurellaceae*.

Бактерии рода *Haemophilus*, особенно *H. influenzae*, чаще являются причиной заболеваний детей и лиц пожилого возраста, а также вторичных бактериальных инфекций у больных, ослабленных хроническими соматическими и онкологическими заболеваниями.

*H. influenzae* вызывает у человека острые, реже хронические респираторные заболевания (ринит, синусит, фарингит, трахеит, эпиглоссит, бронхит, пневмонию), абсцессы, эмпиему, гнойный менингит, эндокардит, артрит и сепсис.

*H. aphrophilus* выделяют при подострых эндокардитах человека.

*H. aegyptius* вызывает тяжелый остро протекающий конъюнктивит.

*H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus* и *H. parahaemolyticus* – нормальные обитатели респираторного тракта человека, но при определенных условиях первые 2 вида могут вызывать эндокардит, а на фоне вирусных инфекций – вторичные острые заболевания ротовой полости, глотки, трахеи и бронхов.

*H. ducreyi* вызывает венерическое заболевание – мягкий шанкр.

#### Экология

У здоровых людей средой обитания *H. influenzae* является слизистая оболочка верхних дыхательных путей. Источник инфекции - человек. Передача происходит воздушно-капельным путем. Во многих случаях является причиной вторичных инфекций, которые возникают как осложнения после перенесения основного заболевания в связи с развитием иммунодефицита.

Многие *Haemophilus* являются комменсалами в человеческом организме.

#### Морфология, культуральные и биохимические свойства

Мелкие (0,3-0,5 × 0,2-0,3 мкм) грам(-) неподвижные коккобациллы. Располагаются одиночно, попарно и скоплениями, образуют капсулу. Жгутиков не имеют, слабо прокрашиваются анилиновыми красителями.

*H. influenzae* является факультативным анаэробом. Образует маленькие, непрозрачные плоские колонии на средах, содержащих кровь (кровяной агар и др.). Оптимальная температура – 36-37°C, pH – 7,6. *Haemophilus influenzae* растет в основном в аэробных условиях при низком содержании CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>). Не растёт на простых питательных средах, не содержащих кровь. Образует колонии S- и R- типа. Для жизнедеятельности *H. influenzae* необходимы факторы X (гемин) и V (НАД, зависимость от факторов является систематическим признаком *H. influenzae*). Фактор X содержится в эритроцитах в виде термостабильной группы тетрапирролов, входящих в состав гематина и гемина. Фактор V — термолabile кофермент (включает НАД или НАДФ), продуцируемый многими бактериями, а также присутствующий в эукариотических клетках. Фактор V синтезируют некоторые бактерии (например, сарцины, стафилококки и др.), поэтому для культивирования гемофилов часто используют так называемые «бактериальные кормилки», выполняя посев рядом с колониями бактерий, выделяющих фактор V.

Сбраживает глюкозу с образованием кислоты. Расщепляют галактозу, фруктозу, мальтозу и ксилозу.

#### Антигенные свойства

У палочки инфлюэнзы выделяют К- и О-антигены. По структуре К-антигена все известные

штаммы разделяют на 6 сероваров (a-f). Основную эпидемическую опасность представляет палочка инфлюэнзы типа b. Некапсулированные штаммы неоднородны по набору антигенов; один из них, антиген М, имеет белковую природу и присутствует у всех штаммов.

#### Ход исследования

Материалом для исследования при менингите служит ликвор, септицемии - кровь, при пневмонии - мокроты, при других процессах - слизь из носоглотки, которые забирают от больных с помощью ватных тампонов.

Из нативного материала (кровь, ликвор, мокрота) изготавливают мазки, окрашивают по Граму или водным фуксином в течение 5 мин. При микроскопии видны мелкие палочковидные грамотрицательные бактерии, которые не образуют спор, но имеют капсулы, располагаются поодиночке, реже в виде цепочек.

Чистые культуры выделяют путем немедленного посева исследуемого материала на специальные питательные среды (кровяной, шоколадный или сердечно-мозговой агар, среда Левинталя или Файлдса).

Спинномозговую жидкость сначала центрифугируют и осадок сеют петлей на одну из плотных сред. При септицемии сеют 10 мл крови в 100 мл жидкой среды Файлдса. Через 24 часа делают высеив на агар, где через сутки вырастают маленькие выпуклые прозрачные колонии. На шоколадном агаре колонии появляются через 36-48 ч, они немного больше по размерам и полупрозрачные. На кровяном агаре с добавлением сердечно-мозгового экстракта через сутки вырастают мелкие выпуклые колонии с радужными переливами. Из типичных колоний готовят мазки и окрашивают по Граму.

Для окончательной идентификации выделенных культур проводят реакцию набухания капсул, исследуют потребности для роста X- и V-факторов, гаталазную, оксидазную, уреазную и гемолитическую активность, ферментацию углеводов, выделение индола и сероводорода. Основное значение для идентификации имеют феномен набухания капсул и исследование потребности для роста X- и Y-факторов. Для выявления такой необходимости исследуемый материал засевают на среду, на поверхность которого затем кладут стандартные полоски бумаги, пропитанные X- и Y-факторами. Интенсивный рост бактерий вокруг полосок (а не в других участках агара) подтверждает наличие *H. influenzae*.

Серологическую идентификацию культур, еще на этапе получения изолированных колоний, можно провести с помощью реакции агглютинации на стекле с капсульный антиген (a, b, c, d, e, f) с соответствующими поли- и монорецепторными диагностическими сыворотками.

### **28) Моракселлы: клинически значимые виды; распространение; локализация патологического процесса, вызываемого моракселлами; морфологические, культуральные, биохимические свойства; схема выделения и идентификации.**

Род *Moraxella* состоит из двух подродов: *Moraxella* и *Branhamella*.

**Таблица 1. Микроорганизмы рода *Moraxella* как возбудители заболеваний различной локализации**

<i>Moraxella spp.</i>	Возбудители заболеваний	Представители транзитной микрофлоры слизистых оболочек
<i>M. lacunata</i>	Конъюнктивит, бронхит, пневмонии	<i>M. caviae</i>
<i>M. catarrhalis</i>		<i>M. cuniculi</i>
<i>M. avis</i>	Респираторные инфекции	<i>M. atlantae</i>
<i>M. bovis</i>		<i>M. phenylpyruvica</i>
<i>M. nonliquefaciens</i>	Урогенитальные инфекции	
<i>M. osloensis</i>		
<i>M. urethralis</i>		

#### Распространение и локализация патологического процесса

*Moraxella* – своеобразная группа неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (МО), обитающих на различных слизистых оболочках у человека и животных. Однако эти МО способны вызывать различные заболевания, преимущественно у людей со сниженной иммунологической реактивностью. Они характеризуются различной локализацией и клинической симптоматикой.

**Таблица 2. Основная экологическая ниша различных видов моракселл  
(Г.П. Калина, Г.М. Трухина, 1988 г.)**

Вид моракселл	Экологическая ниша
<i>M.lacunata, M.lacunata subsp. Liquefaciens</i>	Вероятно носоглотка, реже конъюнктив глаза
<i>M.nonliquefaciens</i>	Полость носа
<i>M. catarrhalis</i>	Полость носа
<i>M. atlantae</i>	Не определены
<i>M. osloensis</i>	Носоглотка, реже полость носа. Мочеполовой тракт
<i>M. phenylpyruvica</i>	Вероятно, мочеполовой тракт
<i>M. urethralis</i>	Мочеполовой тракт

Морфология, культуральные и биохимические свойства

Грамотрицательные толстые короткие кокковидные, реже длинные палочки размером 1,0-1,5 x 1,5-2,5 мкм; неподвижны. Спор не образуют. Имеют капсулу.

Моракселлы — хемоорганотрофы с окислительным метаболизмом, оптимальная pH 7,0— 7,5. Строгие аэробы. Большинство штаммов требовательно к питательным средам, но специфические ростовые факторы мало известны. Небольшое число органических кислот, стеринов и аминокислот используют как источник углерода и энергии. На плотных средах образуют два типа колоний: в свежeweделенных культурах преобладают шероховатые колонии R-типа с неровными краями и S-типа, мелкие, прозрачные, гладкие, с ровным краем.

Ход исследования

Исследуемый материал: мокрота, мазки из зева и носа, отделяемое конъюнктивы и урогенитального тракта.

Делают первичный посев материала на КА. На кровяном агаре моракселлы через 20-24 часа роста образуют колонии небольших размеров с зоной гемолиза или без нее. Культуры, имеющие капсулу, часто растут в виде больших слизистых колоний.

Дальнейшую идентификацию моракселл проводят с помощью общепринятых тестов по ключевым признакам: образование гемолиза, коррозия агара, оксидазо- и каталазоположительный тест, не образуют кислоту из углеводов в аэробных (окисление) и анаэробных (ферментация) условиях, восстанавливают нитраты. Для изучения сахаролитических свойств моракселл используются среды Хью-Лейфсена.

**29) Возможные возбудители чистых и гнойных операционных ран; классификация ран; причины возникновения раневой инфекции.**

Основные возбудители гнойных хирургических инфекций – стафилококки и грамотрицательные бактерии, принадлежащие к семейству Enterobacteriaceae и к обширной группе неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Существенная роль в этиологии хирургических инфекций отводится облигатным неспорообразующим анаэробным бактериям.

В ряде случаев этиологическими факторами инфекционного воспалительного процесса могут быть возбудители, вызывающие развитие особых видов раневой инфекции – клостридиальной (газовая гангрена), неклостридиальной анаэробной и гнилостной инфекции, сибирской язвы, столбняка, рожистого воспаления, актиномикоза, дифтерии, туберкулеза, сифилиса. Указанные возбудители резко изменяют течение раневого процесса, придают особую специфику местным и общим проявлениям воспаления.

Для острых гнойных ран характерно то, что на всех этапах обследования основными представителями раневой микрофлоры являются стафилококки, которые выделяются как в монокультурах, так и в различных микробных ассоциациях. Кроме стафилококков, с большой частотой высеваются различные грамотрицательные бактерии, особенно синегнойные палочки, а также грамположительные стрептококки.

В большинстве случаев возбудителем инфекции в случайных ранах становится стафилококк. Редко в качестве основного возбудителя выступает протей, кишечная и синегнойная палочка. В 0,1% случаев встречается анаэробная инфекция. Через несколько дней пребывания в стационаре флора меняется, в ране начинают преобладать устойчивые к антибактериальной терапии грамотрицательные бактерии, которые обычно становятся причиной развития раневой инфекции при вторичном инфицировании как случайных, так и операционных ран.

Раневые инфекции: Признак микробного обсеменения раны- гнойное отделяемое, раны подразделяют на 4 категории:

- Чистые: непроникающие ранения груди, живота, нанесенные в асептических условиях или без каких-либо признаков воспаления. 5-7%

-Условно контаминированные раны- поражения с вовлечением мышечной стенки полых органов без значительного обсеменения факультативной микрофлоры. Разрезы наносимые при вмешательствах на воздухоносных путях и органов ЖКТ, характеризующиеся заносом миним количества бактерий, контаминирующих стерильн ткани 11%.

-Инфицир раны: поражения с острыми воспалительными реакциями тканей, значительным обсеменением из полых мышечных органов, но без гнойного отделяемого. К контаминированным ранам так же относятся обширные поражения в асептических условиях, 15-21%

-Гнойные раны хар-ся наличием обильного гнойного отделяемого. Раны возникающие при перфорации органов либо в очагах хронического воспаления, изъязвления пролежей, 22-40%.

К числу местных факторов, повышающих вероятность развития раневой инфекции, относится присутствие в ране инородных тел, сгустков крови и некротических тканей. Также имеет значение плохая иммобилизация при транспортировке (становится причиной дополнительной травмы мягких тканей, вызывает ухудшение микроциркуляции, увеличение гематом и расширение зоны некроза), недостаточное кровоснабжение поврежденных тканей, большая глубина раны при малом диаметре раневого канала, наличие слепых карманов и боковых ходов.

Общее состояние организма может провоцировать развитие раневой инфекции при грубых расстройствах микроциркуляции (централизация кровообращения при травматическом шоке, гиповолемические расстройства), нарушениях иммунитета вследствие недостаточного питания, нервного истощения, химических и радиационных поражений, а также хронических соматических заболеваний. Особенно значимы в таких случаях злокачественные новообразования, лейкемия, уремия, цирроз, сахарный диабет и ожирение. Кроме того, снижение сопротивляемости инфекции наблюдается при проведении лучевой терапии и при приеме ряда лекарственных средств, в том числе – иммунодепрессантов, стероидов и больших доз антибиотиков.

### **30) Возбудители раневой инфекции: характеристика; клинический материал, правила сбора, сроки и условия хранения, транспортировки; методы выделения и идентификации возбудителей.**

Значимыми возбудителями внутрибольничной инфекции в ране являются такие как:

• Золотистый стафилококк, который может обитать на коже здорового человека, а также быть занесены при наличии воспалительных процессов в организме медработников

- Кишечная палочка
- Энтеробактер
- Протей
- Ацинетобактер
- Псевдомонады
- Клебсиеллы
- Грамотрицательные анаэробы без спорообразования

Основными причинными микроорганизмами внебольничного раневого процесса являются:

- Стафилококки
- Стрептококки
- Энтеробактерии
- Бактероиды
- Фузобактерии
- Пептострептококки и другие.

**Исследуемым материалом могут служить:** экссудат, аспират из раны, мазки (тканевая жидкость, пропитавшая зонд-тампон) биоптаты и др.

Взятие материала врач осуществляет при соблюдении правил асептики. Кожу вокруг раны или над очагом воспаления обрабатывают 70° этиловым спиртом и 1-2% настойкой йода (ее обязательно надо смыть 70° этиловым спиртом либо другим разрешенным антисептиком) во избежание ожогов. При необходимости удаляют с помощью стерильной салфетки некротические массы, детрит, гной.

Использовать растворы антисептиков для снятия повязки или обработки раневой поверхности до взятия материала нельзя.

#### **Взятие материала с помощью стерильного тампона:**

- материал забирают после туалета раны, совершенного вышеописанным способом;
- материал берут двумя стерильными ватными тампонами (один для бактериоскопии, другой – для посева; для исследования на анаэробы берут дополнительный тампон);
- пробы отбирают прокатывая зонд-тампон по раневой поверхности от центра к периферии в течении 5-10 секунд; тампон должен равномерно пропитаться тканевой жидкостью; манипуляцию необходимо проводить максимально осторожно, не травмируя ткани; появление даже следов крови свидетельствует о неудаче, так как кровь обладает бактерицидными свойствами;

- тампон с материалом помещают в пробирку с транспортной средой.

**Взятие аспирата (материал глубоких ран):**

- материал забирают после обработки кожи вышеописанным способом;  
- после высыхания дезинфектанта врач с помощью одноразового шприца объемом 3-5 мл и иглы № 22 или № 23 берет аспират из глубины раны. Если имеется везикула, берется жидкость и клетки у основания дефекта;

- если попытка взять аспират вышеописанным способом не удастся, подкожно вводят стерильный физиологический раствор и повторно пытаются взять аспират;

- при наличии в ране дренажей, отделяемое из них засасывают шприцем в количестве 1-2 мл;

- аспират из шприца, сняв иглу, переливают в пробирку с транспортной средой.

**Хранение и транспортировка:** Хранить не более 2 ч. с момента забора материала при комнатной температуре. Допускается хранение до 48 ч. при условии использования транспортной системы со средой.

Схема:

Материал взятый на тампон

Микроскопия, Условно-количеств посев: Сабуро 28гр до 60ч, ЖСА 37гр,48ч, Эндо и КА 37гр,24-48ч.

Тампон в тиогл ср.

Количественный учет выросших колоний, Выделение чист культ, Идентификация, Определение АБЧ.

**31. Сепсис: определение понятия; этиология; патогенез; правила забора крови, хранение и транспортировка материала; микробиологическая диагностика.**

**Сепсис** – это тяжелое инфекционное заболевание, при котором болезнетворные **бактерии**, их **токсины** и воспалительные вещества, вырабатываемые в организме, преодолевают иммунную защиту и распространяются по всему телу.

Различают септицемию и септикопиемию. При **септицемии** (первичном сепсисе) возбудитель непосредственно из входных ворот, при отсутствии первичного локального очага проникает в кровь, размножается в ней, вызывая сепсис. **Септикопиемия** (вторичный, метастатический сепсис) возникает в результате генерализации локального инфекционного процесса. В зависимости от первичного очага выделяют раневой, послеродовой, пупочный, урогенный, стоматогенный, ожоговый, генитальный и другие формы сепсиса.

Для сепсиса в отличие от бактериемии характерны утрата кровью антимикробных свойств (что и позволяет микроорганизмам размножаться в крови), сочетание признаков инфекции, интоксикации и повышенной реактивности организма.

**Этиологические агенты инфекций кровяного русла**

Грамотрицательные	Грамположительные
Escherichiacoli	<b>Staphylococcus aureus*</b>
Klebsiellaspp.	<b>Staphylococcus epidermidis*</b>
Enterobacterspp.	<b>α-гемолитические стрептококки*</b>
Proteusspp.	<b>Streptococcus pneumoniae*</b>
Salmonellatyphi	Enterococcus faecalis
<b>Salmonella spp.*</b>	Streptococcus pyogenes
<b>Pseudomonas aeruginosa**</b>	Listeria monocytogenes
Neisseriameningitidis	Clostridium perfringens (анаэроб)
<b>Haemophilus influenzae**</b>	Peptostreptococcus spp. (анаэробы)
<b>Bacteroides fragilis (анаэроб)**</b>	Peptococcus spp. (анаэробы)
Brucella spp.	<b>Candida albicans</b> и др. <b>Candida spp.***</b>
<b>Pseudomonas pseudomallei***</b>	Cryptococcus neoformans

\*Высокий уровень патогенности

\*\*Средний уровень

\*\*\*Низкий уровень

**Предположительная этиология сепсиса в зависимости от локализации первичного очага**

Локализация первичного очага	Наиболее вероятные возбудители
Легкие	S.pneumonia, Enterobacteriaceae, S.aureus, P.aeruginosai Acinetobacter spp. (ИБЛ)

Брюшная полость по дисциплине (модулю) Клиническая микробиология по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»	Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации Клиническая микробиология по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»	Bacteroides spp., Enterococcus spp. 40	
---	--	---	--

Почки	E.coli и др. грамотрицательные бактерии, Enterococcus spp.
Ротоглотка	Streptococcus spp., Staphylococcus spp., анаэробы
После спленэктомии	S.pneumoniae, H.influenzae
Внутривенный катетер	S.epidermidis, S.aureus

### Патогенез

#### Факторы, которые определяют возможности сепсиса:

- токсинообразование;
- агрессивность химиотерапии;
- применение демографических показателей (вынашивание детей, увелич. продолжительности жизни);
- инвазирующие устройства;
- нерациональная АБ-терапия;
- иммитация органов.

#### Пути проникновения:

- Эндогенный сепсис – органы, где находится разбалансированная флора (МВС, пища. Система, и т.д.);

Криптогенный сепсис – нельзя обнаружить возбудителя.

- Экзогенный путь

Внегоспитальный – любая травма, открытая рана.

Госпитальный – инвазирующие манипуляции, катетер-ассоциированные ситуации, пересадка суставов и т.д..

Передача МО руками мед.работника

#### **Патогенез развития сепсиса характеризуется стадийностью.**

1. Внедрение возбудителя и формирование первичного очага.
2. Прорыв микроорганизма в кровь (бактериемия).
3. Вследствие выделения токсинов бактериями наблюдается токсинемия.
4. Диссеминация возбудителя во внутренние органы, формирование вторичных очагов в селезенке, миокарде, почках, надпочечников, коже.
5. Активация иммунной системы, но с незавершенными ее функциями. Это приводит к высвобождению противовоспалительных медиаторов, но этот процесс не завершается полностью, и в результате происходит накопление цитокинов.
6. Повреждение клеток тканей, с нарушением перфузии. Данные изменения ведут к шоку.
7. Развитие септического шока. Септический шок – это сепсис с нарушением гемодинамики и развитием синдрома полиорганной недостаточности.

### МЕТОД ГЕМОКУЛЬТУР

#### **Правило взятия материала для исследования**

Микробиологическая диагностика сепсиса состоит в выделении культуры из крови (гемокультуры) и установлении пораженного звена иммунной системы организма.

- Кровь для посева берут с соблюдением правил асептики и мер индивидуальной защиты, предусмотренных при работе с материалами, потенциально опасными на заражение инфекциями, передающимися через кровь (например, использование медперсоналом резиновых перчаток).

- Нельзя брать кровь из внутрисосудистых катетеров, кроме случаев, когда ее получение непосредственно из вены затруднено или предполагается сепсис катетерного происхождения.

- В большинстве случаев острого течения сепсиса достаточно исследовать 2 – 3 образца крови, взятых раздельными венопункциями с интервалом 30 мин до назначения антибиотиков (лучше во время подъема температуры, а не на высоте лихорадки). При подостром эндокардите кровь исследуют в первый день трехкратно с интервалом 15 – 20 мин, а при отрицательных результатах через 24 ч проводят еще 3 посева. Если в предшествующие 1 – 2 недели больному проводилась антимикробная терапия, кровь исследуют по 2 раза в течение 3х дней. При лихорадке неясного происхождения кровь исследуют 2 раза в течение 1 ч, при отрицательных результатах – по той же схеме через 24 и 36 ч (как правило, увеличение числа посевов свыше 4х существенно не влияет на результативность анализа).

- Немаловажное значение имеет объем исследуемой крови, так как концентрация микробов при бактериемиях, как правило, низкая, особенно у пациентов, получающих антибиотики. У взрослых обычно требуется от 10 до 30 мл крови на каждую венопункцию, у детей 15 мл крови.

- Для взятия крови необходимо использовать стерильные шприцы или системы для одноразового пользования. Кожу над пунктируемой веной тщательно обрабатывают 70 % этиловым спиртом, затем 1 – 2-й % настойкой йода 30 с (начиная обработку кожи от центра будущего прокола по направлению к пери-

фери). Дают высохнуть обработанному участку кожи, затем производят венепункцию, после чего вновь обрабатывают участок 70 % этиловым спиртом для удаления избытка йода, во избежание раздражения кожи, возникающего у некоторой части пациентов.

• Посев осуществляют во флаконы с питательными средами для аэробного и анаэробного культивирования. При использовании коммерческих сред резиновую пробку флакона дезинфицируют 70 % спиртом и настойкой йода, давая подсохнуть. Затем прокалывают пробку флакона иглой шприца и производят посев крови. Рекомендуемое соотношение объемов крови и среды 1:10. Посев крови у постели больного.

#### Хранение и транспортировка

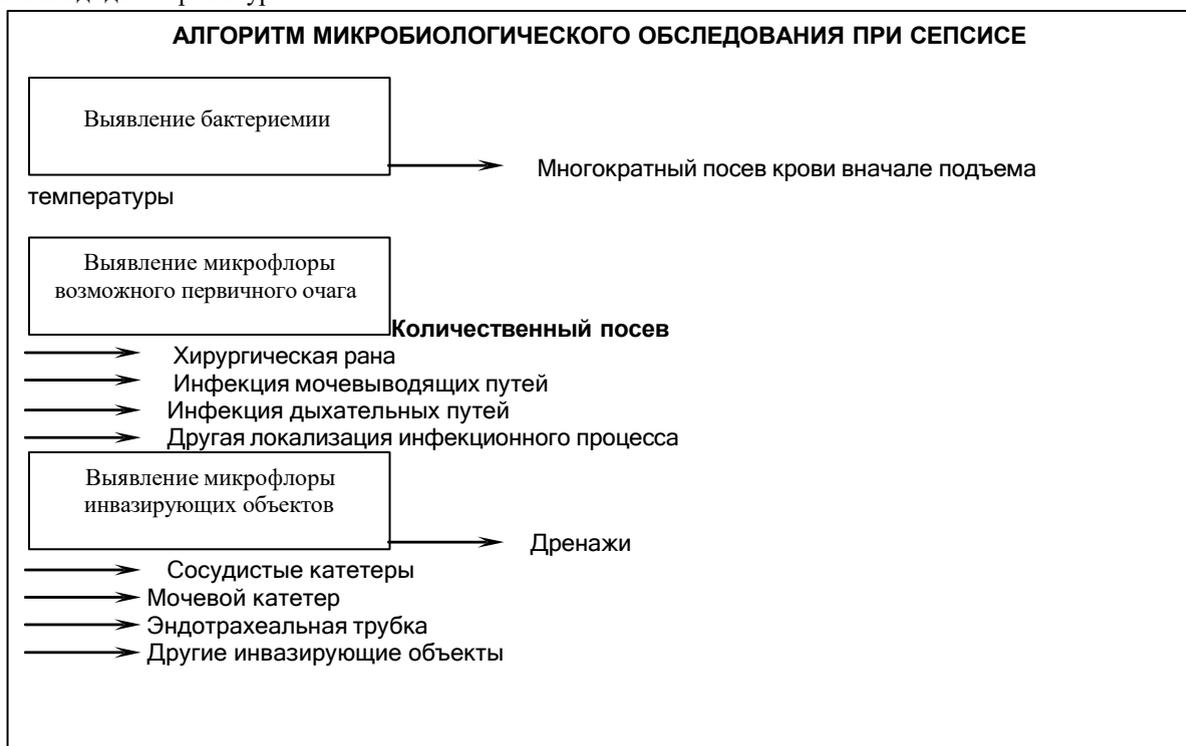
Флаконы необходимо доставить в лабораторию сразу после забора проб крови. Если невозможно доставить флаконы в лабораторию в течение 1 ч., их необходимо хранить при комнатной температуре не более 48 ч.

#### Среды для выделения гемокультур

Для выделения аэробов: - среда для контроля на стерильность,  
- двухфазная (агаровый косяк/бульон) среда,  
- бульон на сердечно-мозговом переваре,  
- триптиказо-соевый бульон,  
- Колумбийский бульон.

Для выделения анаэробов: - бульон Шэдлера,  
- Колумбийский бульон с добавлением 0,05 % цистеина,  
- тиогликолевая среда.

На кандидоз – ср. Сабуро



#### Проведение исследования

• Флаконы с посевами крови инкубируют при 35 – 37 °С не менее 7 дней, просматривая их ежедневно.

• Флаконы, предназначенные для выделения аэробных бактерий, встряхивают в первые 24 ч для улучшения аэрации среды. Длительная инкубация до 28 дней проводится при подозрении на бруцеллез.

• Макроскопическое исследование посевов предусматривает ежедневный осмотр на наличие видимых признаков роста. Из анаэробного флакона в отсутствие видимого роста делают высев на традиционные среды в сроки от 6 до 18 ч (раннее субкультивирование вслепую) или через 72 ч на шоколадный агар; посевы инкубируют в атмосфере CO<sub>2</sub> при 35 °С в течение 48 ч.

• Инкубация чашек в анаэробных условиях при раннем субкультивировании не показана.

• Заключительное субкультивирование (высев на питательные среды) проводят между 5 и 7 днями, хотя клинически оно приносит мало пользы. (Однако существует точка зрения о необходимости проведения анализа до 10 дней, осуществляя субкультивирование на 3, 6, 9-й дни.)

• При использовании двухфазной среды (агар с бульоном) аккуратно покачивают флакон, обеспечивая смачивание поверхности агара жидкой средой дважды в день в течение двух дней, а в оставшиеся 5

дней однократно; контрольные высевы не проводят. Субкультивирование флаконов, используемых в автоматизированных системах типа ВАСТЕС, также не производится.

• При подозрении на наличие роста готовят мазки в окраске по Граму и в соответствии с результатами микроскопии производят высевы гемокультуры на соответствующие среды с последующей идентификацией выделенных субкультур.

**32. Возбудители менингита: характеристика; патогенез вызываемой патологии; правила забора крови, хранение и транспортировка материала; схема микробиологической диагностики.**

**Менингит** - воспаление мозговых оболочек. Возбудителями менингитов являются

- бактерии (нейссерии, пневмококки, стрептококки, энтеробактерии, НГОб, листерии, микобактерии, актиномицеты),
- грибы (Candida, криптококки у ВИЧ-инфицированных),
- простейшие (токсоплазма, криптоспоридии, малярийный плазмодий),
- вирусы (энтеровирусы, вирус полиомиелита, вирус паротита, кори (особенно у взрослых), вирус бешенства).

**Частота встречаемости:**

Высокая: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, инфлюэнца, грам «-» палочки, энтеробактерии и НГОб, *Mycobacterium tuberculosis*, *криптококки*.

Средняя: *Streptococcus agalactiae*

Низкая: *Listeria monocytogenes*

У новорождённых: период до 2-х мес. Кишечная палочка, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*.

**Патогенез:**

Проникновение возбудителей в субарахноидальное пространство может происходить различными путями, каждый из которых имеет свои патогенетические особенности. В большинстве случаев точно установить механизм проникновения бактерий в ЦНС не удастся. В отношении бактериальных менингитов принято их условное деление на **первичные** (бактерии попадают в субарахноидальное пространство со слизистых оболочек) и **вторичные** (распространяющиеся контактно из близко расположенных локусов инфекции, например ЛОР-органов, или гематогенно, например из легких или других отдаленных очагов инфекции). После проникновения возбудителей в подслизистый слой они с током лимфы или крови попадают в субарахноидальное пространство, которое является идеальной средой для их развития из-за стабильной температуры, влажности, наличия питательных веществ, отсутствия гуморальных и клеточных систем противоинфекционной защиты вследствие наличия ГЭБ. Размножение бактерий в субарахноидальном пространстве ничего не ограничивает до момента их фагоцитоза микроглиальными клетками, играющими в ЦНС роль тканевых макрофагов и запускающими воспалительную реакцию. В результате воспаления резко увеличивается проницаемость капилляров ЦНС, происходит экссудация белков и клеток, наличие которых в СМЖ, в совокупности с клиническими признаками, подтверждает наличие менингита.

При менингите материал для исследования: это обычно ликвор, а также кровь, назофарингеальная слизь.

**Правила забора крови:**

Кровь отбирают из вены при поступлении больного в стационар с соблюдением правил асептики и до начала антибиотикотерапии.

Участок кожи для пункции необходимо продезинфицировать, обработать тампоном, смоченным 70%-ным этиловым спиртом, затем – тампоном с 1-2%-ным раствором йода или другим антисептиком, разрешенным к применению для этих целей в установленном порядке. Обработку проводить круговыми движениями, начиная от центра, в течение 30 с, покрывая поверхность кожи площадью 4 x 4 см. Подождать, пока высохнет обработанный участок. После обработки кожи и перед введением иглы не допускается пальпирование сосуда.

При использовании готовых флаконов со средой и разрешенными к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке реагентами, нейтрализующими антибиотики и разрушающими форменные элементы крови (или без них), у взрослых получают 10-30 мл крови, у детей 0,5-3,0 мл. Для взрослых пациентов общий объем пробы забираемой крови при клинической картине сепсиса (септического эпизода) должен составлять от 20 мл (в два флакона) до 60 мл (в 6 флаконов). Для взрослых пациентов рекомендовано использовать в паре аэробный и анаэробный флаконы. При необходимости в дополнение к аэробному и анаэробному (либо в дополнение к аэробному) следует использовать флакон для селективного выделения грибов или микобактерий.

**НА ВСЯКИЙ СЛУЧАЙ ПРО ЛИКВОР:**

1. Участок кожи для пункции необходимо продезинфицировать, обработать тампоном, смоченным 70%-ным этиловым спиртом, затем – тампоном с 1 2%-ным раствором йода или другим антисептиком, разрешенным к применению для этих целей в установленном порядке. Обработку проводить круговыми движениями, начиная от центра, в течение 30 с, покрывая поверхность кожи площадью 4 x 4 см; 2. Подождать, пока высохнет обработанный участок; 3. Иглу с мандреном вводят между поясничными позвонками – L3 L4, L4 L5 или пояснично–крестцовыми – L5 S1. Достигнув субарахноидального пространства, удаляют мандрен, и ликвор появляется на конце иглы; 4. Медленно набирают ликвор в стерильные герметично закрывающиеся пробирки. Обычно используют 3 пробирки для микробиологического, клинического и биохимического анализа. Для микробиологического анализа направляют вторую или пробирку с самым мутным содержимым.

2. 1 мл для исследования на аэробы; 2 мл для исследования на грибы и микобактерии; 2 мл и более для исследования на анаэробы.

3. После забора образец ликвора незамедлительно доставляют в лабораторию. Необходимо строго соблюдать температурный режим – 37°C. Охлаждение ликвора ниже температуры 30°C ведет к гибели менингококков. Если вирусное поражение, то в условиях холодильника.

#### **Хранение и транспортировка:**

Материал для бактериологических и серологических исследований доставляют в бактериологическую лабораторию немедленно после отбора в специальных контейнерах, способных поддерживать температуру 37 °С. При невозможности быстрой доставки материала из отделения в лабораторию (ночное время, выходные и праздничные дни и др.) материал хранят следующим образом:

- посевы ликвора на первичной чашке с «шоколадным» агаром и в 0,1 %-м полужидком питательном агаре, а также посев крови на гемокультуру хранят в условиях термостата при 37 °С;
- нативный ликвор и кровь для серологических исследований хранят в условиях холодильника при 4 °С. В лаборатории нативный ликвор используют только для бактериоскопии и постановки серологических реакций (латекс-агглютинация, ВИЭФ и др.). Для бактериологического посева хранившийся в холодильнике нативный ликвор не используют.

#### **Схема микробиологической диагностики:**

• Кровь для бактериоскопического исследования берется при ее заборе из вены. Далее готовится препарат толстой капли, который окрашивается метиленовым синим. Менингококки представляют собой диплококки (сдвоенные кокки бобовидной формы) размером от 0,6 до 0,8 мкм. *При окрашивании по Граму приобретают розовую окраску (грамотрицательные). Располагаются внутри и внеклеточно.*

При приготовлении мазков из спинномозговой жидкости обращают внимание на внешний вид биологического материала. При гнойном характере ликвора мазки готовятся из осадка, который получают при центрифугировании материала. Ликвор центрифугируется, делается посев. Среды: 20% сывороточный агар, шоколадный агар, простой МПА. Материал обязательно засеивается на ср САбуро и в бульоны, ТГС, 20% сывороточный бульон.

*Менингококки хорошо растут на средах, которые содержат нативный белок (сыворотка и кровь, асцитическая жидкость, яичный белок). Оптимальная температура роста 38-36 °С 24-48 часов, 8-10% CO<sub>2</sub>. На простых средах микробы не растут. Neisseriameningitidis являются аэробами (живут и развиваются только в присутствии кислорода). Сывороточный агар с линкомицином – для подавления сопутствующей микрофлоры. Затем делают мазки из чистой культуры. Грам»-« диплококки.*

Идентификация возбудителя (глю +, мальт +, лак -, фруктоза -, сах -, окс+, кат +, желчь -, МПА -. Инкубация 24 часа при 37°C, 8-10% CO<sub>2</sub>. Чувствительность к АБ, Серогруппирование культуры.

#### **Другие методы:**

**Реакция латекс-агглютинации (экспересс - метод).** В течение 15 мин дать заключение об отсутствии или наличии в СМЖ большого специфических антигенов.

#### **Встречный иммуно-электрофорез (ВИЭФ экспресс-метод)**

Реакция позволяет с помощью специфических антисывороток выявлять полисахаридный антиген возбудителя в СМЖ и сыворотке крови больного уже в первый день исследования материала.

#### **Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)**

Исследование сыворотки больного в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации является вспомогательным методом диагностики менингококковой инфекции и позволяет существенно увеличить процент лабораторного подтверждения генерализованных форм менингококковой инфекции. Для получения достоверного результата обязательным условием является исследование сывороток крови больного в динамике, т.е. взятых в разные сроки заболевания (на 1-й и 10 - 12-й дни болезни).

#### **ПЦР для обнаружения ДНК вирусов, бактерий.**

На поздних этапах ищут специфические АТ методом **ИФА** (IgM, IgG).

**33. Возбудители внутрибольничной инфекции (ВБИ): определение понятие ВБИ; госпитальные штаммы и пути их формирования; правила сбора и транспортировки исследуемого материала; схема микробиологического исследования при подозрении на ВБИ.**

**Внутрибольничные инфекции (госпитальные инфекции)** - это любое клинически распознаваемое инфекционное заболевание, которое развивается у пациента в результате его обращения в больницу за лечебной помощью или пребывания в ней, а также любое инфекционное заболевание сотрудника больницы, развившееся вследствие его работы в этом учреждении, вне зависимости от времени появления симптомов (после или во время нахождения в больнице). Инфекции считают госпитальными, если они развиваются не менее чем через 48 ч после поступления в клинику.

В этом определении обращают внимание на **4 важных момента**:

- во-первых, это клинически выраженное заболевание микробного происхождения, т. е. клинически выраженное инфекционное заболевание;
- во-вторых, инфицирование больного происходит в конкретном месте (лечебно-профилактическом учреждении) или во время госпитализации или посещения амбулаторно-поликлинических учреждений в целях диагностики и лечения;
- в-третьих, инфицирование медицинского персонала может произойти в связи с его профессиональной деятельностью, т. е. во время оказания больным медицинской помощи;
- в-четвертых, симптомы инфекционного заболевания могут появиться как во время пребывания в больнице, так и за ее пределами, поскольку каждое инфекционное заболевание имеет инкубационный период.

**Почему возникают ВБИ?**

- создание крупных больничных комплексов;
- наличие большого количества источников: невозможность изолировать источники инфекции;
- рост объема и вида услуг, которые оказываются в клинике;
- нерациональное использование препаратов – формирование госпитальных штаммов;
- образование мощного искусственного механизма передачи.

**Госпитальный штамм**-это адаптированный к конкретным условиям стационара возбудитель определенного вида, резистентный к лечебным, дезинфекционным и др. условиям в ЛПУ.

**Условия его формирования:**

1. множественная устойчивость к АБ
2. сниженная чувствительность к антисептикам и др. физ. растворам
3. выраженная гетерогенность и устойчивость популяции
4. адаптация к обитанию в больничной среде и приобретение возможности размножаться

на объектах внешней среды

5. повышенная конкурентная активность, вирулентность, инвазивность и способность к колонизации.

**Возбудители внутрибольничных инфекций:**

- Анаэробные инфекции: Bacteroides: *Prevotellamelaninogenicus* и *P. oralis* (ранее относившиеся к бактероидам), *Clostridium difficile*, Peptostreptococcus spp.

- **Enterobacteriaceae spp.:** *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp. **Внутрибольничную (нозокомиальную) инфекцию человека вызывает *P. stuartii***, *Proteus vulgaris* (индол-отрицательный) и *Proteus mirabilis* (индол-положительный), *Serratiamarcescens* колонизирует кишечник и вызывает нозокомиальные инфекции, в основном, в отделениях интенсивной терапии., *Citrobacterdivcrsus*, *Enterobacter*.

- **Неферментирующие микроорганизмы:** *Acinetobacter* spp. *A. baumannii*, *A. Sacoacetificus*. **Частота колонизации возрастает у грахеостомированных и больных на ИВЛ; среди заболевших до половины дети с онкологической патологией, почти все — с центральным венозным катетером. Обнаруживается в местах высокой влажности — вентиляционных системах, увлажнителях, ингаляторах., *Burkholderia* (ранее *Pseudomonas*) *sepacia* Часто находится в стационарах (дезрастворы, инструменты, медикаменты), легко передается от человека человеку: в ряде стран до 40% больных муковисцидозом колонизированы буркхолдерией., *Pseudomonasaeruginosa*, *Stenotrophomonas*. *S. Maltophilia*.**

**: Стафилококки**

Нозокомиальная стафилококковая инфекция распространена повсеместно, ее вызывает, в основном, *S. aureus*: коагулазо-отрицательный (белый, КоаНС) стафилококк представляет собой серьезную угрозу для новорожденных детей.

**: Энтерококки**

Обладая умеренной патогенностью, энтерококки рассматриваются как оппортунистические возбудители внутрибольничных инфекций, особенно у лиц, получающих много антибиотиков.

#### 4.1. Возможные возбудители госпитальных пневмоний

Тяжесть заболевания	Факторы риска	Время начала заболевания	Возбудитель
От лёгкой до средней тяжести	Нет	В любое время после поступления в стационар	«Основные» микроорганизмы: Enterobacter spp., E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp., S. marcescens, H. influenzae, S. pneumoniae, S. aureus
	Да	В любое время после поступления в стационар	«Основные» микроорганизмы: анаэробы (хирургические вмешательства на органах брюшной полости); S. aureus (травма голени, сахарный диабет); Legionella spp. (лечение гормонами); P. aeruginosa (длительное пребывание в ОРИТ, стероиды, антибиотики)
Тяжёлая форма	Нет	Раннее начало	«Основные» микроорганизмы
		Позднее начало	«Основные» микроорганизмы + Acinetobacter spp., S. aureus
	Да	В любое время после поступления в стационар	«Основные» микроорганизмы + Acinetobacter spp., S. aureus

#### Микробиологическая диагностика при ВБИ (правила сбора, хранения, транспортировки, схема микробиологической диагностики)

1) *Исследуемый материал:*

- мазок из зева;
- мокрота;
- моча;
- кровь;
- родовые отделяемое;
- раневое отделяемое;
- материал выделяемый из очага.

2) *Исследование выделяемого инвазирующего объекта (дренажи, эндотрахеальные трубки, катетеры и т.д.)*

3) *Объекты с внешней среды с которыми контактировал больной.*

**Пит. Ср.:** КА, ЖСА, Эндо

**Для накопления:** ТГС

**По показаниям:** сахар. Бульон, ср. Сабуро, Шедлера.

**В зависимости от материала:** количественный, либо не количественный метод (локус нормы стерильности или нет).

**Посев -> Микроскопия -> Идентификационные тесты + Определение возможных эпидемиологических меток.**

**Инвазирующие объекты:**

- **Сосудистый катетер:** область вокруг катетера обрабатывается 70 % спиртом, асептически извлекается стерильным инструментом отсекают 5 см дистального конца катетера (находившегося в сосуде) и помещаются в пробирку, доставка в лабораторию немедленно.

Материал доставляется в лабораторию 0,1 мл физ. Р-ра высевается на КА и размазывается активно шпателем, оставш часть вносится в 9 мл ТГС. КА 35° 48 часов аэриоз. ТГС 35° 72 часа аэриоз. Мазок из ТГС. После чего на КА с последующей идентификацией.

- **Мочевой катетер, а также дренажные трубки, зонды:** Катетер извлекается с остатками мочи с соблюдением асептики, отсекается дистальная часть катетера и немедленно в лабораторию. В стерильную пробирку добавляют 1 мл физ. Р-ра, отмывают и посев ведётся калибровочной петлёй. Оставш объём жидкости отн в 9 мл. КА 35° 48 часов аэриоз. ТГС 35° 72 часа аэриоз. По истечении инкубации выполняют мазок с последующей идентификацией.

- **Инкубационные трубки:** извлечённая трубка укладывается на стерильный лоток. Кольцо шириной 3-5мм дистального участка отсекается и укладывается в стерильную посуду, доставка в лабораторию немедленно. Посев калибровочной петлёй на ср шоколадный агар, КА, Сабуро. Инкубация 35° 48 ч микроаэрофильные условия, Сабуро 22°С 5 суток.

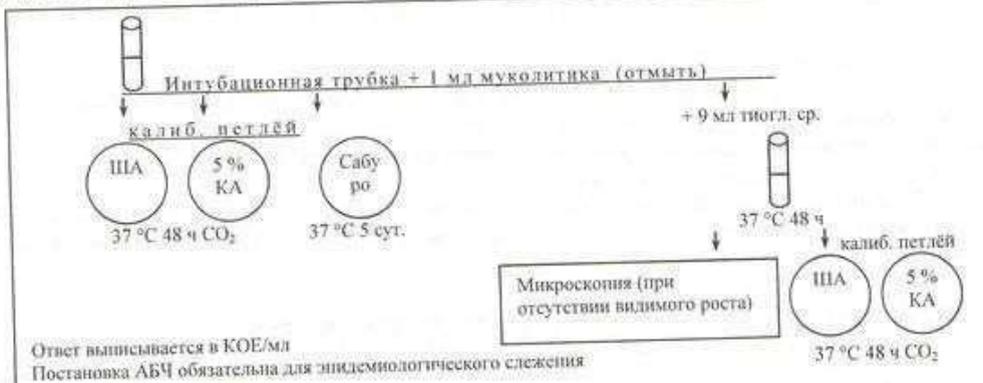
#### 4.4. Схема микробиологической диагностики нозокомиальных инфекций



#### 4.5. Схема исследования внутрисосудистых катетеров.



#### 4.6. Схема исследования интубационных трубок.



Объекты с внешней среды исследуются по показаниям, с которым соприкасались руки мед. персонала.

Бактериологический контроль эффективности обработки кожи операционного поля и рук хирургов

Смывы с кожи операционного поля и рук хирургов производят стерильными марлевыми салфетками размером 5x5 см<sup>2</sup>, смоченными в физиологическом растворе. Марлевой салфеткой тщательно протирают ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства обеих рук. После забора проб марлеву салфетку помещают в широкогорлые пробирки или колбы с раствором нейтрализатора (воды или физиологического раствора) и стеклянными бусами, встряхивают в течение 10 минут, производят отмыв марлевой салфетки. От-мывную жидкость засевают глубинным способом по 0,5 мл на 2 чашки Петри с мясопептонным агаром, а марлеву салфетку— 0,5% сахарный бульон. Посевы инкубируют при 37°С в течение 48 часов.

**Транспортировку клинического образца в лабораторию следует производить в максимально короткие сроки.**

- К клиническому образцу, направляемому в лабораторию, прилагают сопроводительный документ, содержащий основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования

(характер материала, фамилию, имя и отчество больного, название учреждения или отделения, номер истории болезни, предположительный диагноз заболевания, предшествующую антимикробную терапию, дату и время взятия материала, подпись врача, направляющего материал на исследование).

- В процессе транспортировки материал следует оберегать от действия света, тепла, холода, механических повреждений.
- После исследования остатки материала подлежат уничтожению (автоклавированию или сжиганию), а посуда, контейнеры, инструменты - обеззараживанию.

**34. Возбудители заболеваний новорожденных: особенности эпидемиологии; характеристика патологии; возбудители; исследуемый материал и правила сбора и транспортировки; принципы микробиологической диагностики.**

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ:**

**По происхождению:**

- Внебольничные;
- Госпитальные

Внебольничные – внутриутробные инфекции (ВУИ). Говоря о ВУИ говорят о TORCH. Второй вариант госпитальные инфекции возникают после рождения в процессе госпитализации, в роддоме, особенно при длительной госпитализации, особенно у детей с осложнением.

**Источники инфекции:**

- Внебольничные: мать;
- Госпитальные: мед. персонал и объекты окр. ср. (путь передачи: конт-быт, возд-кап)

**Пути заражения:**

- трансплцентарный – вертикальный, гематогенный;
- восходящий - проникновение возбудителя из влагалища и цервикального канала в плодные оболочки, затем в околоплодные воды;
- нисходящий - инфицирование плодного яйца при проникновении инфекции в полость матки через маточные трубы при сальпингите инфекционного происхождения или из брюшной полости при наличии в ней очага инфекции;
- контактный (интранатальный) – плод проходит через родовые пути.

**Факторы риска:**

- патологическое течение беременности;
- недоношенный ребёнок;
- многоводие;
- заболевание мочеполовой системы у матери;
- различные респираторные заболевания – вирусные инфекции, обострение хронических заболеваний;
- различные заболевания различных органов;
- иммунодефицит;
- состояние после трансплантации (ЭКО);
- манипуляции в ходе родовой деятельности.

**ПАТОГЕНЕЗ:**

Инфицирование происходит в первый триместр беременности. Риск составляет около 13%. Ведёт к инфицированию пузыря, тяжёлым осложнениям и раннему выкидышу, либо лежит в основе дальнейшей патологии и порокам развития плода.

В том случае, если инфицирование происходит во втором триместре, основные проявления инфекции:

- наблюдается со стороны последа и родовых оболочек;
- затрагивается плод, у которого проявляется признаки бронхопневмонии, генерализованной инфекции. Беременность заканчивается преждевременными родами, пороки развития. Наблюдается трансплцентарная недостаточность. Риск инфицирования во втором триместре 45%.

Третий триместр: возникают поздние фетопатии – нарушения развития. Плод отвечает собственной реакцией (компенсаторные реакции). Родается живой.

Инфицирование во время родов или после родов. Клинические проявления через определённое время после рождения.

**ВОЗБУДИТЕЛИ:**

Этиология весьма разнообразна:

- бактерии: энтеробактерии (*E. coli*), стафилококки (*S. aureus*), листерии, *Streptococcus agalactiae*. Реже другие энтеробактерии, НГОБ.;
- внутриклеточные: хламидии, микоплазмы;
- простейшие: токсоплазмы, трихомонады
- грибы: очень редко *Candida*;

- вирусы.

#### 4.1. Алгоритм обследования новорождённых при подозрении на ВУИ, вызванные возбудителями, которые трудно/невозможно выделить культуральным методом.

Возбудитель	Материал	Метод исследования
Хламидии	Соскобы с глаз, половых органов, задней стенки глотки, «грязная моча» и др. материал	ПЦР, РИФ, ИФА (обнар. АТ), культуральный метод
Цитомегаловирусы	Соскобы с половых органов, задней стенки глотки, «грязная моча» и др. материал	ПЦР, РИФ, ИФА (обнар. АТ), ИФА (обнар. АТ)
Вирус простого герпеса	Соскобы с глаз, половых органов, задней стенки глотки, «грязная моча» и др. материал	ПЦР, РИФ, ИФА (обнар. АТ), ИФА (обнар. АТ)
Микоплазмы ( <i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticus</i> )	Соскобы с глаз, половых органов, задней стенки глотки, «грязная моча» и др. материал	ПЦР, РИФ, ИФА (обнар. АТ), культуральный метод
<i>M. pneumoniae</i>	Соскобы из носа, задней стенки глотки, БАЛ	ПЦР, РИФ, культуральный метод
Пневмоцисты	Мокрота, БАЛ	РИФ, окраска анилиновыми красителями
Токсоплазмы	Ликвор, кровь, отделяемое глаз, др. материал	ПЦР, РИФ, ИФА (обнар. АТ)

#### ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ И ПРАВИЛА СБОРА:

**Материал:** смыв с внутреннего прохода уха, кожа подмышек – с того места, где не касалась рука акушера. Материал собирается на тампон. Материалом будет служить содержимое желудка, с помощью отсоса для получения желудочного содержимого. Послед берётся не менее 2 кусочков пуповины и 2 кус. Плаценты. Околоплодные воды при не вскрывшемся пузыре. Кровь от новорождённого и матери.

#### Пуповинная кровь:

После рождения ребёнка акушерка перевязывает и пересекает пуповину. Затем материнский конец пуповины обрабатывают стерильным раствором и с помощью иглы забирают из пупочной вены кровь в специальный стерильный контейнер с антикоагулянтом. Пуповинной крови обычно немного, около 80 мл, поэтому целесообразно дополнительно извлекать из плаценты всю имеющуюся в ней кровь.

Капиллярную кровь берут из пяточки. Кровь берут из яремной вены и височной вены.

#### ТРАНСПОРТИРОВКА:

- Материал не должен быть контаминирован;
- Достаточное количество материала;
- Материал доставляют в максимально короткие сроки (для большинства образцов не позднее 1,5-2 часов). Допускается хранение материала в холодильнике при 4°C (это не относится к крови и ликвору);
- При исследовании на анаэробы биологический материал необходимо помещать в анаэробные условия;
- К материалу прилагают сопроводительный документ, где указывает наименование, источник, способ получения материала, дату, время взятия. ФИО, пол и т.д.

#### ПРИНЦИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ:

При обследовании новорождённых и детей первых месяцев жизни должно включать методы, направленные как на выявление возбудителя заболевания, его генома или Аг («прямые» методы диагностики), так и на обнаружение маркёров специфического иммунного ответа («непрямые» методы диагностики).

К «прямым» методам диагностики относят

- вирусологический,
- бактериологический и
- молекулярно-биологический методы (ПЦР, ДНК-гибридизация) и иммунофлюоресценцию.

#### БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ:

#### 4.3. Схема микробиологической диагностики инфекций новорождённых.



Кожа, послед, содержимое желудка высевают на КА количественным методом. Инкубация 37<sup>0</sup>С, 48 часов аэробно.

Кровь из пуп. Раны, материал из очага поражения на ср. Сабуро. На ср. Оксфорд-агар - *Listeria monocytogenes*.

На ср. шоколадный агар - *Haemophilus influenzae*.

Используют сывороточный агар – *Neisseria* (могут быть УПМ).

Температура 22<sup>0</sup>С до 5 суток для Сабуро.

Оксфорд агар – мезофильные психрофиллы.

Шоколадный, сывороточный агар – 37<sup>0</sup>С 48 ч аэробно.

Этиологические значимые являются титры:

10<sup>2</sup> КОЕ/мл для околоплодных вод и содержимого желудка.

Колонизация в первые 2 дня концентрация 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> КОЕ/мл

Ставят б/х тесты.

В последнее время для выявления возбудителя в биологическом материале всё чаще используют ПЦР. Материалом может служить любая биологическая среда организма (пуповинная кровь, слюна, моча, смывы трахеи, ротоглотки, мазки с конъюнктивы, из уретры и т.д.). Если этиология заболевания связана с вирусными агентами, критерием активного периода ВУИ считают обнаружение возбудителя в крови или СМЖ (при поражении ЦНС).

Из «непрямых» методов диагностики (на практике их, как правило, называют серологическими) наиболее широко используют ИФА, при помощи которого в сыворотке крови ребёнка определяют специфические АТ к Аг возбудителя.

На клиническую информативность лабораторных исследований существенно влияют условия забора, хранения и транспортировки биологического материала, что может быть причиной как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов, поэтому следует строго соблюдать все регламентирующие положения по проведению диагностических исследований.

**Выявление специфических IgM** в пуповинной крови и в крови ребёнка первых недель жизни — один из важных критериев ВУИ. Подтверждением активного периода врождённой инфекции служит также выявление низкоавидных специфических АТ IgG с нарастанием их титров в динамике. При этом обязательно сопоставление полученных данных с результатами параллельного серологического обследования матери. Следует помнить, что выявление специфических IgM или повышение титра низкоавидных АТ в пуповинной крови свидетельствует о внутриутробном контакте плода с соответствующим микроорганизмом, но не доказывает того, что данный микроорганизм — причина инфекционного заболевания. Иными словами, на основании результата исследования можно утверждать лишь о внутриутробном инфицировании плода, но не обязательно о внутриутробной инфекционной болезни.

Для уточнения фазы и остроты инфекционного процесса показано проведение серологического исследования методом ИФА с количественным определением специфических АТ классов IgM, IgG и оценкой уровня их авидности. Авидность — понятие, характеризующее скорость и прочность связывания Аг с АТ, косвенный признак функциональной активности АТ. В острый период развития инфекции сначала происходит образование специфических АТ к IgM, затем — специфических низкоавидных АТ к IgG. Таким образом, их можно считать маркером активного периода заболевания.

Если титры специфических АТ к IgG у ребёнка при рождении равны материнским, а при повторном обследовании отмечают их снижение, то высока вероятность, что они имеют материнское происхождение.

**35. Возбудители TORCH-инфекций: определение понятия TORCH-инфекции; методы лабораторной диагностики этих инфекций.**

**TORCH** — комплекс, объединяет инфекции, которые оказывают негативное влияние не только внутриутробно на плод, но и на оплодотворение, беременность и новорожденных детей. Аббревиатура TORCH составлена из первых букв таких слов:

- T (toxoplasmosis) – токсоплазмоз;
- (others) – другие: сифилис, хламидиоз, энтеровирусная инфекция, гонорея, листериоз, гепатиты А и В; вероятно, к этой же группе относятся вирус папилломы человека (ВПЧ), грипп, лимфоцитарный хориоменингит;

- R (rubeola) – краснуха;

- С (cytomegalia) – цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция;

- H (herpes) – герпес.

**Токсоплазмоз** — паразитарная инфекция, протекающая в латентной или хронической форме. Проявления многообразны, но общими являются хориоретинит и увеит. При пренатальных инфекциях возможны значительные поражения головного мозга и глаз или смертельный исход. Возбудитель — простейшее *Toxoplasma gondii*. Внутриклеточный паразит размером 4-7 мкм, морфологически напоминает дольку апельсина или лук с натянутой тетивой (греч. *toxon* — лук). Существует в виде

вегетативной формы и цист. При окраске по Романовскому—Гимзе вегетативная форма выглядит как полумесяц с голубой цитоплазмой и рубиново-красным ядром.

#### Лабораторная диагностика

В гемограмме, особенно при хроническом токсоплазмозе, можно отметить лейкопению, нейтропению, относительный лимфоцитоз и нормальные показатели СОЭ.

Для определения специфических АТ ставят **РСК с токсоплазменным Аг, РНИФ и ИФА**. Положительные результаты лабораторных реакций могут подтвердить диагноз острого или хронического токсоплазмоза **только в сочетании с клиническими проявлениями**. При интаппарантной форме заболевания особое значение имеет **определение специфических IgM и IgG** в динамике. Отрицательные результаты позволяют исключить токсоплазмоз.

Наиболее доказательным, но редко применяемым в практике, является обнаружение токсоплазм в препаратах, приготовленных из биологических жидкостей и сред организма: крови, ликвора, пунктатов лимфатических узлов и миндалин, околоплодных вод, плаценты и др. Положительный результат исследования является абсолютным подтверждением инвазии.

Наиболее доступный способ диагностики — **кожная проба с токсоплазмином**. Проба положительна начиная с 4-й недели заболевания и сохраняется в течение многих лет. Положительный результат не является свидетельством болезни, а лишь указывает на заражение в прошлом и необходимость более тщательного обследования.

**Краснуха («германская корь»)** — антропонозная вирусная инфекция с генерализованной лимфаденопатией и мелкопятнистой экзантемой. Возбудитель — РНК-геномный вирус рода **Rubivirus** семейства **Togaviridae**.

#### Лабораторная диагностика

В гемограмме при краснухе часто выявляют лейкопению, лимфоцитоз, повышение СОЭ. У взрослых иногда обнаруживают плазматические клетки. В целом изменения гемограммы подвержены значительным колебаниям в зависимости от возраста больных и тяжести заболевания.

Серологическую диагностику краснухи проводят с применением **РТГА, РСК, ИФА и РИА в парных сыворотках с интервалом не менее 10 дней**. Однако результаты представляют ценность лишь для ретроспективного подтверждения диагноза. **Желательно определять концентрацию противовирусных IgM и IgG**. У беременных эти исследования, а также постановку **реакции бласттрансформации** лимфоцитов необходимо проводить для установления инфицированности и возможности передачи вируса плоду. Первое исследование сыворотки крови беременной, контактировавшей с больным краснухой, проводят как можно раньше, но не позднее 12-го дня после контакта. В этом случае выявление АТ, преимущественно IgG, говорит о перенесённом ранее заболевании и возможности сохранения беременности. Отсутствие АТ в первой сыворотке и их появление в крови (преимущественно IgM) при повторном исследовании через 10-12 дней свидетельствует об активной инфекции с опасностью поражения плода.

**Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ-инфекция)** — антропонозная оппортунистическая инфекция, протекающая обычно латентно или легко. Представляет опасность при различных иммунодефицитных состояниях и беременности (вследствие риска внутриутробного заражения плода). Возбудитель — ДНК-геномный вирус рода **Cytomegalovirus** подсемейства **Be-taherpesvirinae** семейства **Herpesviridae**.

#### Лабораторная диагностика

Наиболее простые методы исследования — цитоскопия слюны и мочи, а также материала, полученного при биопсии и аутопсии для выявления специфических цитомегалических клеток. В исследуемых образцах с помощью **ПЦР** можно выявить вирусную ДНК (в настоящее время расценивают как наиболее достоверный диагностический тест).

Серологические методы (**ИФА, РИА, РИФ и иммуноблоттинг**) направлены на выявление АТ различных классов. При первичной ЦМВ-инфекции обнаруживают IgM, при реактивации процесса — одновременно IgM и IgG. Поскольку при врождённой ЦМВ-инфекции титры IgM быстро снижаются, уже во втором году жизни ребёнка они могут отсутствовать.

Вирусологические методы (изоляция вируса на культуре фибробластов человека, определение Аг вируса в исследуемом материале с помощью моноклональных АТ) в клинической практике не получили распространения из-за сложности.

**Герпес. Простой герпес** — антропонозное вирусное заболевание с появлением болезненных пузырьков на коже, слизистых оболочках или роговице, склонное к генерализации с развитием энцефалитов и пневмоний. Возбудители — ДНК-геномные вирусы рода **Simplexvirus**, разделяемые на 1 и 2 типы (ВПГ-1 и ВПГ-2).

#### Лабораторная диагностика

Вирусологическая диагностика включает исследование содержимого везикул, соскобов с эрозий, смывов из носоглотки, крови, спинномозговой жидкости, мочи, слюны, спермы, биоптатов мозга (при летальных исходах). Вирус выращивают **в культуре тканей или на куриных эмбрионах**. По современным данным, выделение культуры вируса герпеса не даёт представления об активности процесса.

Возможно исследование при помощи **РНИФ мазков-отпечатков** с очагов поражений с обнаружением в них гигантских многоядерных клеток с тельцами включений Коудри типа А. В ряде случаев ставят **РСК, РН, ИФА в парных сыворотках**; при этом нарастание титра IgM в 4 раза и более говорит о первичной герпетической инфекции, а IgG — о рецидивирующей. В настоящее время всё большее распространение находит **ПЦР** (исследование крови, спинномозговой жидкости при герпетическом энцефалите).

**OTHER – другие.**

**Сифилис** - хроническое системное венерическое инфекционное заболевание с поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей, нервной системы с последовательной сменой стадий болезни. Бледная трепонема (*Treponema pallidum*) – микроорганизм спиралевидной формы с одинаковыми по высоте завитками и расстоянием между ними.

**Лабораторная диагностика**

1. Обнаружение бледных трепонем в биологическом материале.

**А) Темнопольная микроскопия.** Наиболее убедительным доказательством трепонемной природы заболевания является прямая визуализация трепонем. При первичном сифилисе на бледную трепонему исследуется отделяемая эрозивно-язвенных папулезных элементов в области половых органов, полости рта, в пунктате из регионарных лимфатических узлов. При вторичном сифилисе используется материал из различных поражений кожи и слизистых оболочек. Для диагностики врожденного сифилиса может быть использована амниотическая жидкость. При микроскопическом исследовании бледные трепонемы имеют вид тонкой спирали с 8 -12 равномерными завитками. В тёмном поле зрения можно наблюдать поступательное вращение трепонемы вокруг оси, ротационное и сгибательное.

**Б) Полимеразная цепная реакция.** Применяется для определения специфических последовательностей ДНК.

2. **Нетрепонемные тесты.** Нетрепонемные тесты определяют антитела класса IgG и IgM к липидам (фосфолипидам), липопротеидам, высвобождаемых из поврежденных клеток хозяина, вследствие сифилитической инфекции и липидам, входящим в состав мембраны бледной трепонемы.

**А) Тест быстрых плазменных реактивов (RPR).** RPR (RapidPlasmaReagins) - тест быстрых плазменных реактивов и его автоматизированная модификация - автоматизированный реактивный тест (ART, AutomatedReaginTest). Эти тесты могут считываться визуально из-за наличия окрашенных веществ в приготовленном антигене.

**Б) VDRL-тест.** VDRL (по названию лаборатории-разработчика — VenerealDiseaseResearchLaboratory). В данном тесте свежеприготовленный антиген и инактивированная сыворотка смешиваются в стеклянной лунке механическим вращением. Если в сыворотке присутствуют антитела к кардиолипиновому антигену, образуются агрегаты в виде коротких стержневидных структур, выявляемые микроскопически.

**В) Реакция связывания комплемента (РСК, реакция Вассермана).** Реакция Вассермана основана на феномене связывания комплемента. В постановке реакции используют как специфические антигены из бледных трепонем, так и неспецифические антигены (кардиолипиновый - экстракт из мышцы бычьего сердца). Степень позитивности реакции Вассермана оценивают числом плюсов: +++++ (резко положительная) +++ (положительная) ++ (слабоположительная) + (сомнительная) - (отрицательная).

3. **Трепонемные тесты.** Как и при нетрепонемных тестах при проведении трепонемных тестов используется иммунологическая реакция антиген-антитела. Но в качестве антигенов применяются трепонемные антигены - либо интактные трепонемы, либо очищенные и ультразвученные трепонемы, либо рекомбинантные антигены.

**А) Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).** Принцип РИФ основан на выявлении флюоресцирующих антител, так как меченые флюорохромом антитела не теряют способности соединяться с соответствующим антигеном и тем самым обуславливают свечение препаратов в сине- фиолетовых лучах ртутно-кварцевой лампы.

**Б) Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).**

**В) Иммуноферментный анализ (ИФА).**

**Г) Иммуноблоттинг.**

**Хламидиоз** — это инфекционное заболевание, вызванное хламидиями. Хламидиоз является одной из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем.

**Лабораторная диагностика хламидиоза**

Инкубационный период хламидиоза у женщин составляет 28-30 дней (скрытый период развития от момента заражения до возможного выявления). Таким образом, достоверное установление факта заражения хламидиями ранее 28 дней от момента возможного заражения в настоящее время представляется сомнительным (маловероятным).

К современным методам диагностики урогенитального хламидиоза относят

• **культуральный метод** — посев на хламидии с определением чувствительности к антибиотикам.

Является «золотым стандартом» исследования, наиболее точный метод при определении персистирующей (длительной и вялотекущей) хламидийной инфекции. Точность выявления достигает 100%. Для этого используются клетки HL, McCoу и др.

• **молекулярно-биологический метод** — полимеразная цепная реакция (ПЦР). Определение ДНК хламидий в крови, соскобе клеток слизистой оболочки мочеиспускательного и цервикального каналов, сводов влагалища. Чувствительность (точность метода) ПЦР составляет 98%; ПЦР является наиболее современным методом диагностики хламидиоза.

• **иммуноферментный анализ (ИФА)**: определение в крови антител классов А, М, G к хламидии. Чувствительность выявления хламидий методом ИФА (точность метода) составляет 50-60%.

### **36. Возбудители госпитальных инфекций новорожденных: характеристика; источники инфекции; факторы риска развития инфекции; материал для исследования; схема микробиологической диагностики инфекций новорожденных.**

Возбудители: наиболее значимые E. coli, S. aureus, Strep. agalactiae, C. Albicans, реже др. энтеробактерии, НГОБ и др. МО.

Источники госпитальных инфекций новорождённых: мед. персонал и объекты окр. ср. (путь передачи: конт-быт, возд-кап)

#### Основные причины развития ВБИ у новорожденных (факторы риска):

- малый гестационный возраст (особенно менее 32 нед.);
- морфофункциональная незрелость и наличие перинатальной патологии;
- длительный период госпитализации;
- применение медицинского инструментария (сосудистые катетеры, интубационные трубки, назальные канюли, мочевые катетеры и др.) и оборудования (аппараты ИВЛ, мониторы, электроды, манжетки, ингаляторы, отсосы и др.);
- медикаментозная терапия (антибактериальная, иммуносупрессивная, трансфузии кровезаменителей, плазмы, препаратов для парентерального питания);
- врожденные пороки;
- расстройства энтерального питания;
- хирургические вмешательства.

К факторам, способствующим развитию ВБИ, относится низкий вес новорожденного. Так, на каждые 500 г снижения массы тела наблюдается возрастание уровня ВБИ на 3%. Кроме того, отмечен рост частоты ВБИ в 2,2 раза у младенцев с массой тела менее 1500 г по сравнению с детьми, имеющими большую.

Летальность новорожденных при развитии ВБИ может превышать 25%.

Материал для исследования, транспортировка, хранение, схема микробиологической диагностики:

### **СМОТРИТЕ В ВОПРОСЕ 34!**

### **37. Возможные возбудители СПИД-ассоциированных заболеваний: эпидемиология вызываемых патологий; принципы детекции, выделения и идентификации.**

Из большого числа известных оппортунистических инфекций в стандартный перечень СПИД - индикаторных включено 13 нозологических форм, относящихся к вызываемым простейшими (*Toxoplasma gondii*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp., *Pneumocystis carinii* - пневмоцисты отнесены к бластомицетам - почкующимся дрожжеподобным грибам), грибам (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*), бактериями (*Salmonella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex), вирусами (*Herpes simplex*, *Cytomegalovirus hominis*). По данным многих авторов примерно у половины больных СПИДом в клинике доминирует пневмоцистная пневмония, у четверти - саркома Капоши (предположительно вызывается вирусом герпеса человека 8 типа - ВГЧ8). Часто встречаются инфекции, вызываемые различными герпес-вирусами, кандидоз.

#### Вирусы семейства Herpesviridae.

Значительная часть герпесвирусов вызывает острые и латентные инфекции, а также обладает онкогенным потенциалом (ВПГ2 может вызывать аденокарциному шейки матки, вирус ЭБ- саркому Беркитта, ВПГ8- саркому Капоши и др.). Вирусы этого семейства относятся к числу наиболее распространенных патогенов человека. Антитела к ВПГ выявлены у 70-100% взрослого населения, к вирусу Эпштейн- Барр - у 95%, ЦМВ - у 60%.

#### Основные герпесвирусы.

1. *ВПГ типа 1* присутствует в организме человека чаще, чем любой другой вирус. Инфицирование происходит в раннем детском возрасте (чаще через слюну), латенция вируса чаще наблюдается в тройничном нервном узле, инфекция протекает по типу рецидивов, вирус обладает дермонеотропным действием.

2. *ВПГ типа 2* передается половым путем или новорожденному при родах от больной матери, чаще вызывает генитальные поражения и герпес новорожденных.. Мигрируя из первичного очага размножения в эпителии слизистых (чаще генитально - ректальный герпес), ВПГ проникает в поясничные ган-

глизные узлы, где может сохраняться в латентном состоянии, иногда обуславливает кресцовый радикулит.

3. *Вирус ветряной оспы (V-Z)* может вызывать высококонтагиозное инфекционное заболевание - ветряную оспу (при первичном контакте вируса с организмом), а также опоясывающий лишай (зостер), сопровождающийся воспалительной реакцией в задних корешках спинного мозга и в ганглиях и высыпанием везикул на коже по ходу зоны иннервации (ответ иммунного хозяина на реактивацию вируса в ганглиях).

4. *Цитомегаловирус (ЦМВ)* обладает способностью образовывать гигантские (*цитомегалия*) клетки, содержащие тельца включений. ЦМВ способен вызывать врожденную (внутриутробное заражение) и приобретенную цитомегалию, способен поражать различные органы и ткани, вызывать бессимптомное носительство и клинически выраженные формы инфекции. Вирус обладает выраженным иммунодепрессивным действием, способен инфицировать иммунокомпетентные клетки и латентно персистировать в них. Вирус может поражать печень, легкие, головной мозг, сердце, мочеполовые органы, слизистые оболочки желудочно - кишечного тракта.

5. *Вирус Эпштейн- Барр (ЭБ)* вызывает в подростковом возрасте *инфекционный мононуклеоз*, способен вызывать хроническую ВЭБ инфекцию, лимфому Беркитта, карциному носоглотки. Вирус передается воздушно - капельным путем, реже - половым. Он специфически связывается с В- лимфоцитами, размножается в них, вызывая их поликлональную активацию и дифференцировку в плазматические клетки, секретирующие гетерофильные антитела с низкой активностью к ВЭБ, но реагирующие с различными антигенами, в т.ч. антигенами эритроцитов различных животных.

6-7. *Вирусы герпеса человека типа 6 и 7 (ВГЧ6 и ВГЧ7)*. Оба вируса поражают лимфоциты и могут вызывать лимфопролиферативные заболевания. ВГЧ6 может вызывать В- клеточные лимфомы, ложную краснуху (острую вирусную инфекцию детей младшего возраста с розеолезной сыпью), возможно - *синдром хронической усталости*. ВГЧ7 может вызывать экзантемы у детей.

8. *ВГЧ8* признают возможным фактором развития саркомы Капоши.

Лабораторная диагностика. Используют три основных подхода - ПЦР- диагностику, ИФА (прежде всего выявление антител класса IgM), МФА с моноклональными антителами.

#### Вирус краснухи.

У человека вызывает острую вирусную инфекцию, чаще наблюдаемую у детей - краснуху. Наиболее опасна эта инфекция для беременных, особенно в первом триместре беременности. Чаще наблюдают пороки сердца, микроцефалию, множественные пороки развития.

Краснуха - высококонтагиозная инфекция, возможны крупные эпидемические вспышки, при выздоровлении формируется пожизненная невосприимчивость к инфекции. При иммунопрофилактике можно использовать живую аттенуированную вакцину.

#### Протозойные инвазии.

К СПИД- ассоциированным относят токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*) и ряд простейших, вызывающих поражение желудочно - кишечного тракта, преимущественно в виде диарейного синдрома (криптоспоридии, микроспоридии и изоспоры).

*Toxoplasma gondii* вызывает *токсоплазмоз* - инвазию приобретенного или врожденного генеза, являющуюся причиной разнообразной патологии. Относится к споровикам (Sporozoa). Токсоплазма - внутриклеточный паразит. Заражение происходит алиментарным путем ооцитами или тканевыми цистами, чаще через мясные продукты, овощи. Ооциты выделяются с испражнениями основного хозяина - кошек и диких кошачьих, хорошо сохраняются в почве.

Человек - промежуточный хозяин, в котором развитие токсоплазм до тканевых цист, в которых осуществляется бесполое размножение. Для острого токсоплазмоза характерно образование псевдоцист - скоплений токсоплазм в пораженных клетках и токсоплазмемия. При хроническом токсоплазмозе формируются истинные цисты.

Токсоплазмы могут поражать различные органы и ткани, чаще выделяют следующие формы: лимфаденопатическую, экзантемную, поражение центральной нервной системы, преимущественное поражение глаз (хориоретинит, увеит, иридоциклит), поражение сердечно - сосудистой системы.

Наиболее тяжелая инвазия наблюдается при заражении матери и трансплацентарно - плода в первом триместре беременности - врожденный токсоплазмоз, проявляющийся гидро- и микроцефалией, хориоретинитом, образованием кальцинатов в мозге. У больных СПИДом токсоплазмоз развивается преимущественно в виде патологии центральной нервной системы (токсоплазменный энцефалит).

#### Лабораторная диагностика.

1. МФА (метод флуоресцирующих антител)- диагностика.

2. Серологическая диагностика - РСК, РНИФ, ИФА.

#### Микозы.

Грибы - эукариотические одно- и многоклеточные организмы, в большинстве случаев - сапрофиты. Они вызывают заболевания - микозы. Выделяют два типа роста грибов - дрожжевой и гифальный (плесневой).. (См ниже)

### **38. СПИД-ассоциированные заболевания, вызванные грибами: эпидемиология, характеристика возбудителей, принципы лабораторной диагностики.**

#### Оппортунистические микозы.

Их возбудители - преимущественно сапрофиты из внешней среды (*Aspergillus*, *Mucor*) или эндоинфекция (*Candida*). Оппортунистические микозы чаще развиваются при иммунодефицитах (при СПИДе), при нарушениях местной резистентности (ожоги), сахарном диабете. Среди СПИД - ассоциированных микозов чаще отмечают *пневмоцистоз*, *криптококкоз*, *гистоплазмоз*, *кандидоз*, *мукооромикоз*.

#### Пневмоцистоз.

*Pneumocystis carinii* имеет тонкую капсулу, круглой или серповидной формы. Инфекционная форма - *спорозоит*, который в ткани легкого превращается в *трофозоит*, который размножается делением. Пневмоцистоз чаще развивается у детей в возрасте до одного года с врожденными дефектами иммунитета, у взрослых наиболее часто связан с ВИЧ- инфекцией. Пневмоциста - внеклеточный паразит со строгим тропизмом к легочной ткани, в просвете альвеол она осуществляет жизненный цикл. Основной путь передачи - воздушно - капельный (со слюной или мокротой), иногда - трансплацентарный. Основные источники (кроме человека) - овцы, собаки, грызуны.

Клинически характерна интерстициальная пневмония с поражением межальвеолярных перегородок, нарушениями дыхания и газообмена, развитием гипоксии. У лиц с тяжелыми иммунодефицитами пневмоцистоз носит фатальный характер.

Лабораторная диагностика. На питательных средах пневмоциста не растет. Используют :

- выявление возбудителя в окрашенных мазках мокроты и слизи (бронхоальвеолярный лаваж, ларингоскопия) - наиболее типичны восьмиядерные цисты (розетки), вегетативные формы выявить трудно;
- МФА (метод флуоресцирующих антител);
- ИФА, однако необходимо учитывать частое выявление антител у здоровых лиц.

#### Кандидоз.

Род *Candida* относят к группе условно - патогенных дрожжевых грибов. Увеличение кандид связан с применением антибиотиков и развитием дисбактериозов, поскольку некоторые виды (*Candida albicans*, например) входят в состав нормальной микробной флоры организма человека.

*Candida*- диморфные грибы, представленные дрожжевой фазой овальной формы и мицелиальной фазой (псевдо- и истинные гифы). Псевдомицелий (цепочки из удлинённых клеток) встречается у большинства видов, некоторые виды (*C.albicans*) образуют терминальные хламидоспоры.

Наиболее типичные клинические проявления - молочница (чаще ротовой полости), вульвовагинит, диссеминированный кандидоз.

*Candida* выделяют на среде Сабуро, кровяном и глюкозном агаре, пивном сусле, растительных отварах. Колонии мягкие, кремоватые, напоминают "капли майонеза".

Диагностика- микроскопическая (в т.ч. МФА), бактериологическая, серологическая (РСК, ИФА).

#### Криптококкоз.

Из представителей рода *Cryptococcus* основное значение имеет *C.neoformans*, чаще выделяемый из птичьего помета и преимущественно попадающий в организм воздушно - пылевым путем. Возбудитель - оппортунист, развивается в организме на фоне Т- клеточного иммунодефицита. *C.neoformans* существует в несовершенной (дрожжевой) и совершенной (половой) фазах. В первом случае выявляют сферические клетки, окруженные слизистой капсулой, в совершенной фазе криптококк имеет гифы с большим количеством концевых базидий.

На микологических средах образует блестящие сочные колонии, на среде Сабуро - кремово-коричневые.

Капсула - основной фактор патогенности. Первичный очаг чаще образуется в легких, возможно вовлечение в процесс регионарных лимфатических узлов. Основная форма поражений при ВИЧ- инфекции - менингит. Нейротропизм криптококка объясняется отсутствием в спинномозговой жидкости антикриптококкового и фунгиостатических факторов, имеющих в крови, наличием в спинномозговой жидкости ряда питательных веществ для размножения этого гриба. При ВИЧ- инфекции криптококк может поражать легкие, криптококкоз может также быть в глазной, кожной и диссеминированной формах.

Диагностика криптококкоза включает микологическое исследование патологического материала, цитологическое (выявляют капсулированные дрожжевые клетки) и биохимическое исследование спинномозговой жидкости, выявление антигена и антител в ликворе и сыворотке крови (ИФА).

#### Гистоплазмоз

Воротами инфекции чаще являются органы дыхания. Споры гриба с пылью попадают в бронхи и альвеолы, там они превращаются в паразитические дрожжеподобные формы, внедряются в ткани и обуславливают возникновение первичного легочного очага. С током лимфы возбудитель проникает в регионарные лимфатические узлы, вызывая в них воспалительный процесс. Наличие гриба в ткани приводит к формированию гранулематозного процесса, который разрешается некрозом, изъязвлением или петрификацией легочной ткани и лимфатических узлов

Гистоплазмоз у ВИЧ-инфицированных протекает как гематогенно диссеминированный процесс и характеризуется высокой лихорадкой, лимфаденопатией, значительным увеличением печени и селезенки,

постоянными проявлениями служат кашель и инфильтраты в легких. При исследовании крови отмечается лейкопения и анемия. Протекает тяжело, даже в начальных стадиях

При ВИЧ-инфекции летальность свыше 80% (при отсутствии терапии), при раннем назначении противомикозных препаратов летальность снижается до 15%. У больных СПИДом летальность достигает 100%, и даже большие дозы амфотерицина В не предупреждают рецидивов болезни.

Диагностика затрудняется отрицательными результатами как внутрикожной пробы с гистоплазмином, так и серологических реакций.

### **39. Понятие оппортунистических инфекций. Роль возможных возбудителей на разных стадиях развития ВИЧ-инфекции.**

Оппортунистические инфекции – это заболевания, вызванные различными возбудителями, в большинстве случаев представителями условно-патогенной микрофлоры организма человека, вследствие значительного снижения функциональной активности иммунитета (иммунодефицит). Эта группа заболеваний не развивается у людей с достаточным иммунитетом. Часто они развиваются у людей инфицированных ВИЧ, на стадии развития выраженного иммунодефицита (СПИД).

**Острая инфекция** (первичная инфекция или острый ретровирусный синдром) — это результат начальной супрессии Т-клеток. Стадия развивается у большинства ВИЧ-инфицированных людей имеет клиническую картину инфекционного мононуклеоза или признаки, которые имеют сходство с гриппом. Проявлениями острого ретровирусного синдрома являются лихорадка, боли в горле, головная боль, миалгии и артралгии, тошнота, рвота, диарея, лимфаденопатия.

**Латентная инфекция** (асимптомная инфекция) Период, когда компенсаторные возможности макроорганизма способны поддерживать уровень иммунитета, достаточный для защиты от вторичных заболеваний, называют латентным. Асимптомная инфекция (АИ) может длиться от 2 до 10 лет. В этот период, несмотря на инфицированность, человек остается клинически здоровым, у него отсутствуют признаки иммунодефицита. На этой стадии единственным клиническим проявлением ВИЧ-инфекции может быть увеличение лимфатических узлов.

**Стадия вторичных заболеваний (Фаза 4А)** характеризуется развитием на фоне нарушенного иммунитета бактериальных, вирусных, грибковых, протозойных инфекций и (или) опухолевых процессов. Данная фаза заболевания протекает без значимых оппортунистических инфекций и инвазий, а также без развития саркомы Капоши и других злокачественных опухолей. Как правило, их предвестники в виде умеренно выраженных клинических проявлений наблюдаются на коже и слизистых оболочках (стафилококковая пиодермия, синегнойная инфекция, рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей, включая бактериальные фарингиты и синуситы; инфекциивиром простого герпеса первого и второго типов (ВПГ1 и ВПГ2), герпеса третьего типа (Varicella Zoster), вирусом папилломы человека (бородавки и остроконечные кондиломы), контагиозного моллюска; кандидозные поражения (кандидоз полости рта, вагинальный кандидоз, кандидоз кожи), руброфития; ксероз, себорейный дерматит, рецидивирующий афтозный стоматит). В целом, частота кожных поражений у больных ВИЧ-инфекцией регистрируется приблизительно в 90% случаев на разных стадиях болезни. При этом у одного больного может быть одновременно по меньшей мере два и более кожных поражений. Последние нередко принимают хроническое рецидивирующее течение и склонны к обширному распространению.

**Фаза 4Б** (умеренно выраженная, "промежуточные" признаки) При этом имеются какие-либо общие симптомы или признаки СПИДа без генерализации оппортунистических инфекций или опухолей, встречающихся на более поздних стадиях заболевания. Характерны: необъяснимая пролонгированная лихорадка перемежающегося или постоянного типа более 1 месяца, необъяснимая хроническая диарея более 1 месяца, потеря веса более 10% массы тела. Отмечаются более глубокие изменения на коже и слизистых оболочках, имеющие склонность к распространению и повторному рецидивированию (опоясывающий лишай, волосатая лейкоплакия, некротический гингивит и периодонтит, бациллярный ангиоматоз, локализованная саркома Капоши).

В данной фазе ВИЧ-инфекции могут наблюдаться бактериальные, грибковые, вирусные, протозойные поражения внутренних органов, но без диссеминации инфекционного процесса. Среди них наиболее часто развиваются бактериальные или грибковые поражения легких. Возбудителями бактериальных пневмоний у ВИЧ-инфицированных больных чаще всего бывают Streptococcus pneumoniae и Haemophilus influenzae. Кроме того, пневмонию могут вызывать стафилококки, кокардии, легионеллы, микоплазмы, родококки, стрептококки группы В, клебсиеллы, протей, эшерихии, синегнойная палочка и некоторые анаэробные бактерии. Нередко возникают микробные, вирусно-микробные и микробно-протозойные ассоциации. Особое место занимает туберкулез легких, который и сам по себе остается очень важной проблемой, в особенности для России. Считается, что наличие ВИЧ у ранее переболевших туберкулезом в 30% случаев приводит к рецидиву туберкулеза. Грибковые поражения (кандидоз, криптококкоз, реже - аспергиллез, споротрихоз, мукормикоз, эндемичные микозы - гистоплазмоз, кокцидиоидомикоз, бластомикоз, пенициллиоз) у ВИЧ-инфицированных больных также встречаются довольно часто. Входными воротами инфекции чаще всего являются легкие. Проникшие сюда

грибы создают первичный очаг инфекции. При этом активация латентной инфекции происходит по мере развития иммунодефицита.

**Фаза 4B** болезни (выраженная, поздние признаки) соответствует стадии развернутого СПИДа. Как правило, она развивается при длительности инфекционного процесса более 5 лет. Нарастающая несостоятельность иммунной системы приводит к развитию двух основных клинических проявлений СПИДа - оппортунистических инфекций и новообразований, которые принимают генерализованный диссеминированный характер и являются смертельно опасными. Кроме этого, необходимо помнить, что любые патогенные микроорганизмы вызывают необычно тяжелые клинические состояния.

Среди *бактериальных инфекций* наибольшую актуальность приобретают туберкулез (как легочный, так и внелегочный), атипичный микобактериоз, возвратные пневмонии и генерализованный сальмонеллез. Среди *грибковых инфекций* прежде всего следует выделить грибы рода *Candida*, которые распространены повсеместно и у больных ВИЧ-инфекцией могут вызывать поражение любого органа, начиная с кожи и заканчивая тяжелыми проявлениями эзофагита или кандидемией. К наиболее важным повсеместно распространенным оппортунистическим грибковым инфекциям относится и криптококкоз (экстрапульмональный), проявляющийся, как правило, менингитом или менингоэнцефалитом и диссеминацией вплоть до сепсиса. Среди *вирусных поражений* чаще всего манифестируют инфекции, вызываемые семейством герпесвирусов (вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, *Varicella Zoster*, цитомегаловирус), а также прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия (один из паповавирусов – вирус полиомы JC (Якоба-Крейцфельта)). Основными среди *протозойных оппортунистических инвазий* при ВИЧ-инфекции являются пневмоцистоз, токсоплазмоз, криптоспоридиоз, изоспороз. В последние годы у больных СПИДом все чаще выявляют микроспоридиоз, циклоспороз, бластоцистоз, акантамебиоз

К наиболее значимым *новообразованиям*, которые встречаются при ВИЧ-инфекции на фоне глубокого иммунодефицита, относятся саркома Капоши и неходжкинские лимфомы (с более частой локализацией в ЦНС). У ВИЧ-инфицированных женщин на стадии развернутого СПИДа нередко обнаруживается злокачественная карцинома шейки матки, связанная с вирусом папилломы человека 16, 18 или 31 типа.

#### **40. Понятие об антибиотикограмме. Роль бактериолога в рациональном использовании антибиотиков.**

**Антибиотикограмма** — это определение чувствительности возбудителя инфекционно-воспалительного заболевания к антимикробным препаратам. В процессе эволюции появляются антибиотикоустойчивые виды микроорганизмов. Таким образом, установленный при разработке препарата спектр антимикробной эффективности антибактериального вещества может существенно измениться в процессе его широкой эксплуатации. В этой ситуации использование малоэффективного препарата не только не приведет к желаемому результату, но и может нанести непоправимый вред больному — прогрессирование воспалительного процесса, нарушение нормального микробного пейзажа человеческого организма, дисбактериоз. Поэтому идеальным требованием для рациональной и целенаправленной терапии бактериальных инфекций является тщательная бактериологическая диагностика заболевания с выделением возбудителя и определением его чувствительности к назначаемому препарату.

Для решения этой задачи наибольшее распространение имеют биологические методы. При этом выделенный возбудитель засеивается на твердую питательную среду — мясо-пептонный агар. Затем на поверхность агара помещаются специальные бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Метод основан на том, что неэффективное антимикробное вещество не мешает свободному росту бактерий, в то время как эффективный препарат подавляет рост микроорганизмов. Методика достаточно специфична и позволяет выявить спектр чувствительности каждого из членов микробного сообщества, вызвавшего воспалительный процесс.

#### **Роль бактериолога в рациональном использовании антибиотиков**

На сегодняшний день, несмотря на высокую эффективность антибиотиков в отношении уничтожения различных возбудителей бактериальных инфекций и появления новых видов этих препаратов, все большее количество микроорганизмов приобретают устойчивость к ним. В связи с этим были разработаны основы рационального применения этой группы препаратов, которые позволяют свести к минимуму возможность появления устойчивых видов бактерий. Рациональная антибиотикотерапия необходима в первую очередь для уменьшения количества резистентных (устойчивых) форм бактерий, которые требуют разработки все более мощных препаратов, которые также могут быть токсичными для человека.

• Перед началом приема антибиотиков желательно точно определить вид бактериального возбудителя и его чувствительность к основным препаратам – для этого проводится **бактериологическое исследование**, при котором в условиях лаборатории из материала выделяется культура возбудителя, проводится ее идентификация и определение чувствительности к основным группам препаратов.

#### **41. Методы определения чувствительности к антибиотикам (серийных разведений, пограничных концентраций, Е-тест, диско-диффузионный): характеристика, основные этапы;**

### **критерии интерпретации результата.**

#### **Метод серийных разведений**

Методом серийных разведений МИК (*Минимальная ингибирующая концентрация*) определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающей видимый рост микроорганизма в пробирках (макротест), лунках планшета (микротест) или на чашках с питательной средой, содержащих убывающие концентрации антибиотика.

Например, для определения МИК тетрациклина в отношении культуры *Staphylococcus aureus*, выделенной от больного, готовят двукратно убывающие концентрации этого антибиотика в стандартном питательном бульоне (Бульон Мюллера-Хинтона). Контролями культуры и антибиотика являются, соответственно, бульон без антибиотика и бульон с первым разведением антибиотика. В опытные и контрольные пробирки вносят стандартизованную суспензию молодой агаровой культуры *S. aureus* и после суточной инкубации учитывают результат.

Учетным признаком является наличие или отсутствие мутности бульона (роста культуры) в пробирках. В контроле культуры должна быть мутность, в контроле антибиотика - нет. Величина МИК соответствует той минимальной концентрации тетрациклина, при которой отсутствует мутность (бульон в пробирке прозрачен).

Метод серийных разведений нередко считают наиболее точным, хотя и относительно трудоемким, дорогим. В действительности, при правильной постановке и соответствующих контролях диффузионные методы в ряде случаев не уступают ему по точности. Вместе с тем методом серийных разведений можно тестировать чувствительность более широкого круга микроорганизмов (включая анаэробные, медленно-растущие и прехотливые).

**Метод пограничных концентраций** можно считать усеченным методом серийных разведений. В соответствии с ним испытуемую культуру вносят только в две лунки (пробирки), где находятся высокая (С) и низкая (с) концентрации антибиотика. Концентрация «С» соответствует границе между устойчивыми и умеренно-устойчивыми штаммами, а концентрация «с» - границе между умеренно-устойчивыми и чувствительными штаммами. Если после инкубирования рост отсутствует в обеих лунках, штамм относят к чувствительным, если только в лунке с концентрацией «С» - к умеренно-устойчивым штаммам, а если в обеих лунках имеется рост, штамм относят к устойчивым. Результат этого исследования имеет качественное (полуколичественное) выражение, но само исследование отличается простотой и экономичностью. Иногда вместо 2 концентраций используют одну или более 2 (неполный ряд разведений).

Метод определения чувствительности с помощью **Е-тестов (E-test)**, представляют собой бумажные полоски, пропитанные не одной, а рядом убывающих концентраций определенного антибиотика (128, 64, 32, 16, 8, 4, ...мкг/мл). Е-тесты, подобно дискам при диско-диффузионном методе, укладывают на поверхность стандартного питательного агара, засеянного испытуемой культурой в виде «газона». В результате диффузии антибиотик формирует в агаре эллипсоидную зону градиента концентраций: более широкую в области высоких концентраций и более узкую — в области низких. После инкубирования вокруг полоски формируется эллипсоидная зона задержки роста, которая, сужаясь в области малых концентраций и «пересекает» полоску на уровне, соответствующем величине МИК

#### **Диско-диффузионный метод**

При определении чувствительности методом диффузии в агар чистую культуру возбудителя засевают «газоном» на питательный агар в чашке, например, тампоном, смоченном в суспензии микроорганизма. Затем на поверхность агара укладывают стандартные бумажные диски, пропитанные антибиотиками, которые диффундируют в агар, создавая градиент концентрации. На чашку диаметром 90 мм равномерно укладывают 6-7 дисков на расстоянии др от др 15 мм. От края чашки не менее 2 см. После инкубирования в термостате (24 ч. 36 С) измеряют диаметры зон задержки роста вокруг дисков и по специальным таблицам определяют степень чувствительности к тому или иному антибиотику

Поскольку для получения результатов методом диффузии в агаре используют стандартизованные условия (состав и количество среды, количество засеваемых микробов, температура и сроки инкубирования, стандартные диски и др.), каждому значению диаметра зоны вокруг диска с антибиотиком соответствует определенное значение МИК. Исходя из значения МИК, можно определить терапевтический индекс:  $T = \text{МИК}/K$  (см. выше). Следовательно, по диаметру зоны можно определить степень чувствительности к тому или иному антибиотику: чувствительные (S), умеренно-устойчивые (I) и устойчивые (R).

К категории S (от англ. sensitive, чувствительный) относят те, для которых использование средних терапевтических доз будет достаточным для трехкратного превышения МИК.

В категорию I (от англ. intermediate, промежуточный) относят те микробы, для подавления которых потребуются максимальные терапевтические дозы.

Категорию R (от англ. resistant, устойчивый) составляют те микроорганизмы, в отношении которых данный антибиотик будет неэффективным *in vivo*

#### **42. Антибиотикорезистентность: типы по генетическому признаку, по времени проявления, специфичности, числу механизмов, биохимическому механизму. Примеры.**

Антибиотикорезистентность – свойство микроорганизмов сохранять способность к пролиферации при концентрации АБ-препарата подавляющих рост основной части его популяции или большинства видов других м/о.

##### **По генетическому признаку**

Могут локализоваться в хромосоме:

- Природная резистентность
- Приобретенная резистентность

Локализация мб на плазидах (наиболее часто встречающаяся)

Передача происходит в результате трансдукции, конъюгации

Возможна природная резистентность встречается у 100 % штаммов

Приобретенная возникает при мутации или при приобретении генетического материала

##### **По времени проявления**

- Первичная устойчивость - до начала АБ-терапии
- Вторичная устойчивость – возникающая или возрастающая в процессе лечения АБ

##### **По специфичности**

- Специфическая устойчивость - в отношении отдельного АБ-препарата
- Перекрестная устойчивость - резистентность к группе препаратов
- Полная перекрестная резистентность – (устойчивость к тетрациклину изоксозолинпенициллинам, цефалоспорином I поколения)
- Частичная перекрестная резистентность – Устойчивость к определенным препаратам (резистентность к 14-15 членным макролидам, но сохранение чувствительности к 16-ти членным макролидам у Staph.)

##### **По числу механизмов**

- Единичная устойчивость – один механизм (напр: у Staph к бета-лактамам)
- Множественная устойчивость – развивается несколькими независимыми механизмами (S.aureus - резистентность ко всем бета-лактамам путем синтеза бета-лактамаз и модификации мишеней)

##### **По Б/Х механизмам**

- изменение проницаемости внешних структур
- Активное выведение АБ из клетки
- Ферментативная инактивация АБ
- Изменение структуры мишени АБ
- Формирование метаболического шунта

#### **43. Механизмы резистентности к бета-лактамам: биохимический механизм, свойства бета-лактамаз, модификация мишени, изменение проницаемости внешних структур, эффлюкс; клиническое значение.**

##### **Ферментативная инактивация**

Наиболее распространенный актуальный механизм устойчивости

М/о приобретают способность синтезировать фермент бета-лактамазу, который способен гидролизовать лактамное кольцо с образованием пеницилановой кислоты, которая не обладает ингибирующим свойством.

К настоящему времени описано более 500 ферментов, различающихся по следующим практически важным свойствам:

- Субстратный профиль (способность к преимущественному гидролизу тех или иных β-лактамов, например пенициллинов или цефалоспоринов, или тех и других в равной степени).
- Локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Эта характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, при хромосомной - наблюдают распространение резистентного клона.
- Чувствительность к применяющимся в медицинской практике ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму.

(Остальное см в след вопросе)

**Снижение проницаемости внешних структур грамотрицательных бактерий.** Внешняя мембрана грамотрицательных микроорганизмов является препятствием для проникновения β-лактамов внутрь клетки. Транспорт антибиотика через внешнюю мембрану к чувствительным мишеням осуществляется через воронкообразные белковые структуры, получившие название "порины" или "пориновые ка-

налы". В результате мутаций возможна полная или частичная утрата поринов, приводящая к выраженному в различной степени снижению чувствительности к  $\beta$ -лактамам. Указанный механизм устойчивости встречается практически среди всех грамотрицательных бактерий, обычно в сочетании с другими механизмами.

**Активное выведение  $\beta$ -лактамов из микробной клетки (Эффлюкс).** Ранее считалось, что  $\beta$ -лактамы активно не выводятся из микробной клетки, однако в последние годы появились сообщения о наличии у *P.aeruginosa* транспортных систем, осуществляющих активное выведение ряда из них и, прежде всего, карбапенемов.

**Модификация мишени действия.** Мишенями действия  $\beta$ -лактамов являются ферменты - **ПСБ** (Пенициллинсвязывающий белок), участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых **ПСБ** уменьшается сродство к  $\beta$ -лактамам, что проявляется в повышении **МПК** (Минимальная подавляющая концентрация) этих препаратов и снижении клинической эффективности. Реальное клиническое значение имеет устойчивость среди стафилококков и пневмококков. Гены модифицированных **ПСБ** локализованы на хромосомах.

- **Устойчивость стафилококков** (*S.aureus* и КНС) обусловлена появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ (ПСБ2а).

- Маркером наличия ПСБ2а является устойчивость к метицилину или оксациллину.

- Независимо от результатов оценки *in vitro* при инфекциях, вызываемых MRSA, все  $\beta$ -лактамы следует считать клинически неэффективными и не использовать в терапии.

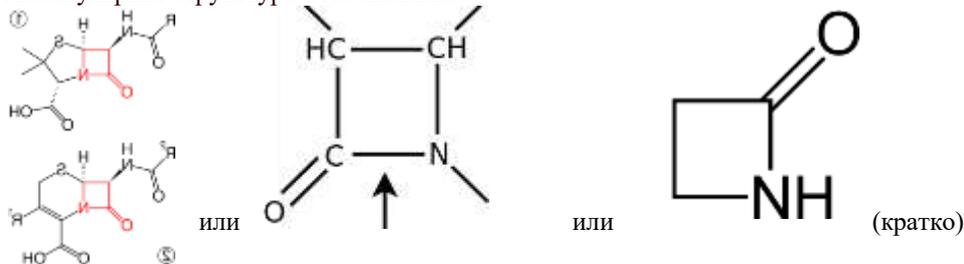
- Частота распространения MRSA в некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии в России превышает 50-60%, что создает крайне серьезные проблемы для терапии.

- **Устойчивость пневмококков** обусловлена появлением в генах, кодирующих ПСБ, чужеродной ДНК, происхождение которой связывают с зелеными стрептококками. При этом перекрестная устойчивость между отдельными  $\beta$ -лактамами неполная. Значительная часть штаммов, устойчивых к пенициллину, сохраняет чувствительность к цефалоспорином III поколения и карбапенемам.

- Среди **грамотрицательных бактерий** устойчивость, связанная с модификацией ПСБ встречается редко. Определенное значение этот механизм устойчивости имеет у *H.influenzae* и *N.gonorrhoeae*. Микроорганизмы, проявляют устойчивость не только к природным и полусинтетическим пенициллинам, но и к ингибиторозащищенным препаратам.

- **44. Бета-лактамазы: молекулярная структура, субстратный профиль, чувствительность к ингибиторам, локализация генов и тип экспрессии, методы детекции у энтеробактерий.**

- Молекулярная структура бета-лактамаз



- Следующим фактором, ограничивающим доступ БЛА (бета-лактамазные антибиотики) к мишени действия, являются ферменты бета-лактамазы, гидролизующие антибиотики. Бета-лактамазы, вероятно, впервые появились у микроорганизмов одновременно со способностью к продукции БЛА как факторы нейтрализующие действие синтезируемых антибиотических веществ. В результате межвидового генного переноса бета-лактамазы получили широкое распространение среди различных микроорганизмов, в том числе и патогенных. У грамотрицательных микроорганизмов бета-лактамазы локализуются в периплазматическом пространстве, у грамположительных они свободно диффундируют в окружающую среду.

- К практически важным свойствам бета-лактамаз относятся:

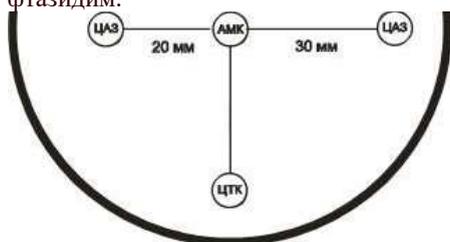
- Субстратный профиль (способность к преимущественному гидролизу тех или иных БЛА, например пенициллинов или цефалоспоринов или тех и других в равной степени).

- Локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Эта характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, при хромосомной наблюдают распространение резистентного клона.

- Тип экспрессии (конститутивный или индуцибельный). При конститутивном типе микроорганизмы синтезируют бета-лактамазы с постоянной скоростью, при индуцибельном количество синтезируемого фермента резко возрастает после контакта с антибиотиком (индукции).

- Чувствительность к ингибиторам. К ингибиторам относятся вещества бета-лактамой природы, обладающие минимальной антибактериальной активностью, но способные необратимо связываться с бета-лактамазами и, таким образом, ингибировать их активность (суицидное ингибирование). В результате при одновременном применении БЛА и ингибиторов бета-лактамаз последние защищают антибиотики от гидролиза. Лекарственные формы, в которых соединены антибиотики и ингибиторы бета-лактамаз, получили название комбинированных, или защищенных, бета-лактамов. В клиническую практику внедрены три ингибитора: клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам. К сожалению, далеко не все известные бета-лактамазы чувствительны к их действию.
- **(Приобретенная резистентность формируется при изменении одного из параметров, определяющих уровень природной чувствительности микроорганизма. Ее механизмами могут быть:**
  - Снижение аффинности ПСБ к антибиотикам.
  - Снижение проницаемости внешних структур микроорганизма.
  - Появление новых бета-лактамаз или изменение характера экспрессии имеющихся.

Перечисленные эффекты являются результатом различных генетических событий: мутаций в существующих генах или приобретением новых.)
- Методы детекции БЛРС у Энтеробактерий:
- 1) Высев на селективную хромогенную среду (CHROMagar™ESBL)
- 2) Методом «двойных дисков» Набор дисков предназначен для подтверждения продукции энтеробактериями бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) и может быть использован для штаммов *Klebsiella* spp. и *E.coli*, а также других энтеробактерий. Среди них могут быть устойчивые, умеренно-устойчивые или чувствительные к цефалоспорином 3, 4 поколения или азтреонаму штаммы, диаметр зоны подавления роста которых, по данным предварительного тестирования, соответствуют показателям для штаммов, подозрительных на продукцию БЛРС.
- **Принцип метода**
- Метод основан на выявлении продукции БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином 3 поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту (синергизм отмечается на участке пересечения зон диффузии препаратов с двух дисков, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга). Параллельно с анализом исследуемых культур тестируют контрольные штаммы: отрицательный контроль - штамм *E.coli* ATCC 25922, не продуцирующий БЛРС; положительный контроль - штамм *K.pneumoniae* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС.
- **Постановка теста**
- Методика приготовления микробной взвеси и инокуляция чашек с агаром стандартные.
- Через 5 - 10 мин. после инокулирования на подсыхшую поверхность агара накладывают диски согласно следующей схеме: в центр чашки - диск, содержащий клавулановую кислоту (амоксициллин/клавуланат), по бокам от него на расстоянии 20 мм (с одной стороны) и 30 мм (с другой стороны) между центрами дисков - диски с цефотаксимом и цефтазидимом. При этом линии, соединяющие центры дисков цефотаксим-амоксициллин/клавуланат-цефотаксим и цефтазидим-амоксициллин/клавуланат-цефтазидим, должны быть перпендикулярны друг другу (см. рис. 1). Использование двух дисков каждого АБП, расположенных на разном расстоянии от диска с амоксициллином/клавуланатом, позволяет повысить эффективность обнаружения БЛРС.
- Чашки инкубируют в термостате при температуре 35 °С в течение 18 - 20 ч.
- Рис. 1. Схема расположения дисков при постановке теста по выявлению продукции БЛРС методом "двойных дисков". Обозначения дисков: АМК - амоксициллин/клавуланат; ЦТК - цефотаксим; ЦАЗ - цефтазидим.



- **Учет и интерпретация результатов**

- Если тестируемый микроорганизм вырабатывает БЛРС, то зона подавления вокруг дисков с цефалоспоридами III поколения окажется "вытянутой" в сторону диска с амоксициллином/клавуланатом за счет дополнительного подавления роста микроорганизма в той зоне, куда диффундируют и клавуланат, и цефалоспорин III поколения.
- Независимо от абсолютных значений диаметров зон подавления роста штаммы, продуцирующие БЛРС, рассматриваются как устойчивые ко всем пенициллинам, цефалоспоридам и монобактамам. Результат считается положительным, если указанные различия получены хотя бы для одной пары дисков.
- 3) Метод ПЦР
- 4) MALDI (масс-спектрометрия)

#### 45. Требования к взятию клинического материала для микробиологических исследований (культуральный, ПЦР, ИФА).

##### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СБОРУ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Сбор биологического материала целесообразно производить до начала антимикробной терапии;
2. Перед сбором пробы, особенно при применении инвазивных методов, учитывать вероятность риска и пользы для пациента, а также значимость именно данного вида биоматериала для объективизации клинического диагноза и оценки проводимых (планируемых) лечебных мероприятий;
3. Правила соблюдения асептики ->избегать контаминации биологического материала посторонней -> может привести к получению ошибочных результатов анализа;
4. Материал - брать непосредственно из очага инфекции или исследовать клинически значимый материал;
5. Проба должна быть отобрана в количестве (вес, объем), достаточном для выполнения анализа. Недостаточное количество образца может привести к некорректным результатам исследования;
6. Медицинский работник, осуществляющий сбор и доставку образца в бактериологическую лабораторию, должен свести к минимуму непосредственный контакт с пробой биологического материала;
7. Соблюдать щадящие методы и асептические условия для предотвращения нанесения вреда пациенту в процессе получения биологического материала инвазивными методами;
8. Собирать образец биологического материала в стерильную емкость (желательно одноразовую), не загрязненную биоматериалом, без трещин, сколов и других дефектов. При подозрении на анаэробную инфекцию: **биологический материал берут в строго анаэробных условиях, исключительно из пораженных инфекционным процессом зон. Содержимое замкнутых полостей пунктируют стерильным шприцем и 3–5 мл материала вносят, путём прокола резиновой пробки, во флакон с бескислородной газовой смесью (80% азота, 10% водорода, 10% углекислого газа) либо в специальную транспортную среду для анаэробов;**
9. Транспортировка в максимально короткие сроки (1,5 – 2 ч.). При невозможности осуществить доставку в указанный период следует использовать специальные транспортные системы, способные пролонгировать время транспортировки до 48ч.
10. К пробе биоматериала следует прилагать сопроводительный документ (направление), содержащий следующую информацию об образце:

наименование, источник и метод получения биологического материала, дату и время взятия, цель и метод исследования; ФИО, пол и возраст больного; название учреждения, отделения, номер палаты, номер истории болезни (амбулаторной карты); предполагаемый диагноз инфекционной патологии и предшествующую антибактериальную и/или иммунотерапию; ФИО и подпись врача, направившего материал для бактериологического исследования; при направлении биоматериалов, полученных при вскрытии, указывают отделение, в котором умер больной.

**Культуральный метод:** Для выявления и определения возбудителя инфекционного заболевания проводят посев материала от больного на питательные среды. После выделения культуры (чистых колоний микроорганизма) проводят лабораторное изучение свойств и определение возбудителя. Для проведения бактериологического посева необходимы сведения о предварительном диагнозе. Материал от больного сеют на питательную среду и помещают в определенные условия (температура, доступ или отсутствие кислорода и др.). Условия выращивания культуры и питательные среды подбирают в зависимости от возбудителя, который предположительно собираются получить на основании предварительного диагноза. По возможности используют элективные питательные среды, на которых растет только определенный вид микроорганизмов. Недостатком этого метода являются особые требования к забору материала от больного, в качестве которого выступают кровь, кал, моча, соскобы с кожи и слизистых. Требования описаны выше.

##### Способы взятия биоматериала для исследований методом пцр

**Соскобы.** Для соскобов используются одноразовые стерильные зонды, имеющие ватный тампон с повышенной адсорбцией или «щеточки», реже - ложки Фолькмана, малые ушные ложки или аналогич-

ные инструменты со слегка затупленными краями. Поскабливающими движениями собрать материал. Исследуемый материал должен содержать возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи, примесей крови и экссудата. Внести материал в стерильную пробирку типа эппендорф с буферным раствором.

**Соскоб из цервикального канала:** перед взятием соскоба необходимо удалить избыток слизи стерильным ватным тампоном, обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором. Зонд ввести в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см, избегая соприкосновения со стенками влагалища, и поскабливающим движением (не до крови) собрать материал. Небольшое количество эритроцитов в пробе не влияет на результат анализа. При наличии эрозии шейки матки материал берут с границы здоровой и измененной ткани.

**Соскоб из уретры:** зонд ввести в уретру (у мужчин - на глубину 2-4 см) и несколькими вращательными движениями собрать материал. Накануне перед взятием материала допускается провокация (острая пища, алкоголь и др.). Рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1-2-х часов перед взятием пробы. При наличии обильных гнойных выделений соскоб надо брать не позже, чем через 15 минут после мочеиспускания.

**Соскоб с конъюнктивы** берут, предварительно проведя анестезию глаза 0,5% раствором дикаина. Вывернув веко, зондом с ватным тампоном (либо глазным скальпелем) собрать эпителиальные клетки с конъюнктивы.

**Соскоб из прямой кишки:** зонд ввести в анальное отверстие на глубину 3-4 см и вращательным движением собрать материал.

1.2.2. **Мазки.** Одноразовым стерильным зондом с ватным тампоном или щеточкой взять небольшое количество отделяемого (со сводов влагалища, из зева, носоглотки и др.) и перенести в стерильную пробирку типа эппендорф с буферным раствором.

1.2.3. **Кровь.** Для исследований методом ПЦР кровь должна быть *нативной* (не свернувшейся).

Кровь собирать асептически, путем венопункции - в фирменную пробирку (2-3 мл) с антикоагулянтом ЭДТА (*гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!*), аккуратно перемешать, плавно переворачивая пробирку.

Кровь с ЭДТА является биоматериалом для следующих групп исследований:

- *генетические исследования* (момент забора крови значения не имеет).

- *выявление возбудителей инфекций* (наиболее информативными являются пробы, взятые при ознобе, повышенной температуре, т. е. предположительно во время вирусемии или бактериемии).

1.2.4. **Моча.** В пустой стерильный контейнер с плотно завинчивающейся крышкой собирают утреннюю первую или среднюю порцию мочи в количестве минимум 10 мл. Если забор мочи проводят днем, то перед этим пациент не должен мочиться 1,5-3 часа.

1.2.5. **Мокрота.** Утром провести санацию ротовой полости и горла (прополоскать раствором питьевой соды). Собрать мокроту в пустой стерильный широкогорлый флакон.

1.2.6. **Биоптат.** Взятие материала осуществлять из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или пограничного с повреждением участка. Поместить биоптат в стерильную пробирку типа эппендорф с буферным раствором.

1.2.7. **Слюна, желудочный сок, ликвор, синовиальная жидкость.** Слюна (1-5 мл), желудочный сок (1-5 мл), ликвор (1-1,5 мл) - поместить в пустую стерильную пробирку (контейнер).

1.2.8. **Сок предстательной железы.** После массажа предстательной железы сок собирают в количестве 0,5-1 мл в пустую стерильную пробирку (контейнер). При невозможности получить сок, сразу после массажа собирают первую порцию мочи в количестве не более 10 мл (в этой порции содержится сок предстательной железы).

1.2.9. **Смывы, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).** Стерильным ватным тампоном и 5-7 мл физиологического раствора проводят смыв, например, с наконечника эндоскопа или бронхоскопа, и помещают 0,5-5 мл смыва в пустую стерильную пробирку (контейнер).

1.2.10. **Фекалии.** Зонд с ватным тампоном помещают внутрь каловых масс и слегка проворачивают, захватывая небольшое количество материала. Затем материал помещают в стерильную пробирку типа эппендорф с буферным раствором.

## ИФА

Наиболее распространенный материал для реакции ИФА – это сыворотка крови пациента, взятая натощак. Материалом также могут служить спинномозговая жидкость, околоплодные воды, содержимое стекловидного тела, слизь цервикального канала и уретры, мазки. Правила забора материала те же.

## 46. Методы индикации микробов в исследуемом материале.

**ИНДИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ** (лат. indicatio, от indicare указывать, определять) — комплекс микробиологических методов исследования для определения в объектах окружающей среды (воздух, вода, почва, поверхности различных предметов и др.) патогенных для людей и животных грибов, бактерий, риккетсий, вирусов.

При И. м. используют средства и методы исследований, которые применяются для лабораторной диагностики инфекционных заболеваний и сан.-микробиол. исследований.

Патогенная микрофлора сконцентрирована в выделениях больного (фекальные массы, мокрота и т. д.). Попадание выделений в воду, почву, воздух ведет к уменьшению концентрации патогенных микроорганизмов в объекте. К микрофлоре выделений присоединяются сапрофиты. Это затрудняет И. м. в объектах окружающей среды.

1) Подготовка проб к исследованию преследует цель повысить вероятность обнаружения в исследуемом материале соответствующих микроорганизмов. Микрофлору воды концентрируют. Для этой цели применяют физ. методы, в частности фильтрацию через свечи Беркефельда, Шамберлана или, чаще всего, через нитроцеллюлозные мембранные фильтры; физ.-хим. способы — осаждение коагулянтами, агглютинирующими сыворотками, метод флотации, а также комбинацию перечисленных способов.

Подготовка проб почвы к исследованию начинается с разбавления микрофлоры, т. е. приготовления суспензии в разведении 1:2, 1:3.

2) Большое значение приобрёл люминесцентно-серологический метод, который заключается в обработке препарата с исходным материалом флуоресцирующими *иммуноглобулинами*. Последние, адсорбируясь соответствующими микробами, обуславливают их свечение при рассматривании в люминесцентный микроскоп.

#### **47. Методы экспресс диагностики, применяемые в бактериологической лаборатории.**

Имуносерологические (РИФ,ИФА)

Молекулярно-генетические (ПЦР и др.)

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**- основана на амплификации (увеличения кол-ва копий)специфического гена возбудителя. Для этого двухнитевую ДНК вырезают из исследуемого материала, денатурируют и достраивают (при охлаждении) к расплетенным нитям ДНК новые комплиментарные нити. В результате данных операций из одного гена образуется 2. Этот процесс многократно повторяется при заданных температурных режимах до образования нужного количества копий необходимого гена.

**Имуноферментный анализ (ИФА).** В основе метода лежит выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой. Специфический антиген адсорбируют на поверхности лунок в пластинках из полимерного материала, фиксированный на пластинке антиген инкубируют с испытуемыми человеческими сыворотками. После отмывания от несвязавшихся белков связанные иммобилизованными антигенами Ig выявляют с помощью антивидовой иммуноблоттинговой сыворотки, антителам которой прикреплён фермент (пероксидаза). После инкубации с субстратом и индикатором (диаминобензидином) оценивают ферментативную активность по интенсивности окраски.

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ, метод Кунса)** используется в диагностике заболеваний, вызванных бактериями (брюшной тиф и паратифы, шигеллез, бруцеллез, чума, холера и др.), простейшими (малярия, амебиаз), вирусами (грипп, аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка).

Различают разновидности методов:

1. **Прямой** – основан на том, что антигены тканей или микробов способны светиться под УФ-излучением после обработки иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами. Бактерии в мазке после обработки такой люминесцентной сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зелёного цвета.

2. **Непрямой** метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген-антитело с помощью антиглобулиновой сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем, антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой сывороткой, меченной флюорохромами.

**Радиоиммунный анализ (РИА)** Высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген-антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом. После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике: интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

**Имуноблоттинг** – высокочувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИФ. Используют, как метод диагностики при ВИЧ. Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в геле, затем переносят их из геля на активированную бумагу и проявляют с помощью ИФА. Выпускаются такие полоски с «блотами» антигенов. На эту полоску наносят сыворотку больного, затем, после инкубации, отмывают и наносят сыворотку против Ig человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс выявляют добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента.

**Реакции иммобилизации** (трепонем, холерных вибрионов) применяется при диагностике

заболеваний, возбудителем которых являются подвижные бактерии. Для этого материал, взятый у больного обрабатывают специфическими сыворотками – если реакция положительнонаблюдается иммобилизация бактерий на стекле.

**Газожидкостная хроматография (ГЖХ)** Этот метод является высокоэффективным методом обнаружения анаэробных бактерий, которые в процессе своей жизнедеятельности выделяют летучие жирные кислоты (изомасляная, масляная, валериановая, изовалериановая, капроновая). Для проведения этого анализа проводят экстракцию ЛЖК летучим органическим растворителем, после чего полученный экстракт вводят в хроматограф.

**Реакция агглютинации** бактерий с использованием соответствующей антибактериальной сыворотки относится к наиболее простым серологическим реакциям. Взвесь бактерий добавляют к образцам испытуемой сыворотки крови в различных разведениях и через определенное время контакта при температуре 37 °С регистрируют, при каком наибольшем разведении сыворотки крови происходит агглютинация. Реакцию агглютинации бактерий используют для диагностики многих инфекционных заболеваний: бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и паратифов, шигеллеза, сыпного тифа.

**Реакция преципитации (РП)** является чувствительным, высоко специфическим и относительно простым методом в диагностике менингококковой инфекции, трипаносомоза, полиомиелита, сибирской язвы, малярии, вирусного гепатита В. РП в жидкой фазе протекает очень быстро (1–3 мин), в геле — значительно медленнее (положительный результат можно получить через 2–10 дней).

#### **48. Основные питательные среды для выделения УПБ: наименования, назначение, принцип работы сред, интерпретация результатов роста.**

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Например, бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO<sub>2</sub> и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO<sub>2</sub>, органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *E.coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются факторами роста.

Выбор питательной среды зависит в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их следующих особенностей.

По составу питательные среды делятся на натуральные и синтетические.

**Натуральными** называют среды, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения, имеющих неопределенный химический состав. Примерами питательных сред такого типа являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, мышц млекопитающих), образующихся при их гидролизе. Кислотный (НСI) гидролиз белков используется для приготовления полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина, панкреатина, папаина приводит к неполному гидролизу белков, в результате чего образуются **пептоны**. Как правило, на пептонных питательных средах микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. При ферментативном гидролизе, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих 7 небольшие пептиды, потому что их они могут усваивать непосредственно, а отсутствующие аминокислоты – нет.

К питательным средам неопределенного состава можно отнести и среды, полученные на основе растительного сырья: картофельный агар, томатный агар, отвары злаков, дрожжей, пивное сусло, настои сена и др. К числу сред неопределенного состава относят и среды **полусинтетические**. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; а также добавляют небольшое количество дрожжевого или кукурузного экстракта (или любого другого природного продукта) для обеспечения неизвестных потребностей роста. Основное назначение таких питательных сред – выделение, культивирование, получение биомассы и поддержание культур микроорганизмов.

**Синтетические среды** – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Обязательными компонентами таких сред являются неорганические соли и углерод- и азотсодержащие вещества (типичными представителями являются глюкоза и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. Основное назначение таких питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетических рекомбинантов и т. д.

**По назначению** среды разделяют на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

К основным относятся среды, применяемые для выращивания многих бактерий. Например, это триптические гидролизаты рыбных продуктов или казеина, из которых готовят жидкую среду (питательный бульон) и плотную (питательный агар). К ним относят и мясопептонный агар (МПА), который применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, и солодовый агар (СА) – применяют для культивирования дрожжей и плесневых грибов. Такие среды служат основой для приготовления более сложных питательных сред. В качестве основных иногда используют синтетические питательные среды, к которым добавляют аминокислоты, витамины, пептон, дрожжевой экстракт и т.д.

**Элективные среды** обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду 8 трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

**Дифференциально-диагностические** среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и т.д. Принцип построения таких сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды.

В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Например, среда Левина в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий, исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Данная среда позволяет отличать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*. Для этой же цели на практике часто используют среду Эндо.

По консистенции среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими.

#### **49. Методы идентификации УПБ: ручные (изучение биохимических свойств в питательных средах, в планшетных системах, на хромогенных средах); автоматизированные системы.**

Для идентификации выделяемых культур по биохимическим свойствам в состав сред обычно вводят дифференцирующие субстраты и соответствующие индикаторы. В классическом варианте это углеводы (лактоза, сорбит, сахароза и т. д.), мочевины или другие субстраты, при расщеплении которых микробными ферментами образуются вещества, изменяющие рН или окислительно-восстановительный потенциал среды. В результате появления продуктов ферментации индикатор окрашивает, например, колонии микробов и среду вокруг, помогая отличить их от бесцветных (неокрашенных) колоний микробов, не ферментирующих данный субстрат.

Дифференциация при таком подходе осложняется тем, что сахаролитические и протеолитические ферменты Рост лактозо-положительных бактерий на среде Эндо 13 микроорганизмов весьма многообразны и универсальны (часто встречаются у представителей разных видов). Это обуславливает относительно невысокие дифференцирующие свойства традиционных сред.

Различные виды и даже разновидности микробов относятся поразному к одним и тем же сахарам. Для обнаружения **сахаролитических** ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса, «пестрый ряд» — дифференциально - диагностические среды. Среду Гисса выпускают полужидкой с индикатором ВР (смесь водного голубого и розоловой кислоты). В качестве углеводов используют пентозы (арабинозу, ксилозу, рамнозу), гексозы (глюкозу, левулезу, маннозу, галактозу), дисахариды (мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, целлобиозу, мелибиозу), трисахариды (раффинозу, мелицитозу), полисахариды (инулин, декстрин, растворимый крахмал, гликоген), высокоатомные спирты (глицерин, эритрит, адонит, арабит, маннит, дульцит, сорбит, инозит), глюкозиды (салицин, эскулин, кониферин, арбутин). Исследуемую культуру засевают уколом петли в столбик среды, и инкубируют в термостате при 37°C сутки или более в зависимости от идентифицируемого вида. По изменению цвета индикатора после посева судят об образовании кислых продуктов; заполнение поплавка газом или разрыв агара указывает на образование газа из углевода. Если культура не ферментирует углевод, цвет индикатора не изменяется и образования газа не наблюдается.

#### **Протеолитические свойства микроорганизмов**

При посеве бактерий проколом в мясо-пептонную желатину, «столбиком» в случае расщепления белка наблюдают разжижение среды. При посеве на среду со свернутой сывороткой расщепление белка определяют по разжижению среды и образованию углублений на ее поверхности. Расщепление микробом молока выявляется просветлением или растворением первоначально свернувшегося молока.

**Биохимическая идентификация бактерий в планшетах** Среды тест-системы вносят в планшеты в день исследования по 100 мкл (выдавливая по 4 капли из капельниц) в лунки. Среды для изучения одной культуры размещают в одном из горизонтальных рядов из 12 лунок в постоянной последовательности: на триптофандезаминазу, с маннозой, уреазой, сероводород, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, ацетонин, на индол, с лактозой, на ферментацию маннита и нитратредуктазу, мальтозы, арабинозы, адонита. Агаровую культуру изучаемых бактерий вносят полной стандартной петлей в каждую лунку со средой и размещивают. Петлю прожигают только в начале и конце посева на весь ряд. На поверхности сред с мочевиной, лизином и орнитином (вертикальные ряды 3, 5 и 6) после 22 посева вносят по 2 капли стерильного вазелинового масла из флакона. Закрытые крышками планшеты инкубируют при температуре 37 °С. Результаты учитывают визуально во временной последовательности, указанной в таблице и вносят в бланк учета результатов. По полученной комбинации результатов с помощью таблицы определяют род и вид энтеробактерий в исследуемых пробах.

**"Хромогенные" питательные среды** В последнее время широко используют "хромогенные" питательные среды, позволяющие уже на первом этапе микробиологического исследования, через 24 часов получить видовое название возбудителей. Такие хромогенные питательные среды разработаны, как для бактериальных культур, так и микроскопических грибов. Это дифференциальные среды нового поколения, принцип действия которых основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов. К таким ферментам относятся, например, /J-D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или /S-D-глюкозидаза энтерококков. Для 29 обнаружения уникального фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма, в состав среды вводят хромогенный субстрат вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные и/или флюоресцирующие продукты. В результате микробный рост окрашивается в определенный цвет или приобретает способность к флюоресценции при ультрафиолетовом облучении.

[https://www.amursma.ru/upload/iblock/433/Metody\\_identifikacii\\_bakterij.\\_Metodicheskoe\\_posobie\\_dlya\\_samo\\_podgotovki\\_studentov.pdf](https://www.amursma.ru/upload/iblock/433/Metody_identifikacii_bakterij._Metodicheskoe_posobie_dlya_samo_podgotovki_studentov.pdf)

#### **Автоматические системы:**

Метод масс-спектрометрии позволяет значительно сократить время идентификации бактериальной микрофлоры.

Используемое оборудование — анализатор bioMérieux Vitek MS (пр-во Франция).

ключевые термины MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия – метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии.

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – ионизация вещества с помощью матрицы и лазерного излучения.

TOF MS (Time of Flight Mass-Spectrometry) – время пролетная масс-спектрометрия. Масса молекулы оценивается по времени пролета от источника ионизации до детектора.

Для каждого вида микроорганизмов сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 50 масс-спектров этого вида. При этом образцы получены из различных источников (больниц, лабораторий, микробиологических коллекций), а каждый образец тщательно идентифицирован с помощью сиквенса РНК или других сертифицированных методов анализа. Структурированная таким образом база данных позволяет быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы. Вся методика идентификации на VITEK MS состоит из 2-х этапов:

Этап 1: Подготовка образца

Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксибензойная кислота). Этот раствор уже готов к использованию и устойчив к свету. Затраты по времени для подготовки 24 изолятов – 10 минут, для 96 изолятов – 33 минуты.

Этап 2: Идентификация

Образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс- спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных и на основании сведений о массах происходит идентификация микроорганизмов. Затраты по времени для идентификации 24 изолятов – 12 минут, для 96 изолятов – 43 минуты.

Антибактериальный спектр определяется более чем к 40 лекарственным препаратам и имеет свыше 30 различных профилей. Программное обеспечение дает возможность выбирать эффективный препарат с учетом доз, путей введения и фармакокинетики.

. Система бактериологического анализа **Vactec 9050** сконструирована специально для быстрого обнаружения бактерий и грибов в клинических образцах крови. Образцы крови забираются от пациентов и вносятся в специальные бутылочки, содержащие микробиологические среды. Бутылочки затем вставляются в прибор, по возможности незамедлительно, для более эффективного выделения микроорганизмов. Возможность диагностики сепсиса в максимально короткие сроки — 90% положительных результатов выявляются в течение первых суток. Максимальное время протокола исследования занимает 5 дней.

Бутылочки помимо питательной среды содержат специальные добавки – нейтрализующие антибиотики, что позволяет диагностировать наличие бактериемии даже у больных после проведенной антибиотикотерапии. Кроме того, в состав содержимого бутылочки входят добавки для лизиса лейкоцитов крови и высвобождения фагоцитированных микроорганизмов.

Прибор работает с баркодированными пробирками, что исключает необходимость ручной обработки и сводит к нулю ошибки, связанные с человеческим фактором. Сканер штрихового кода расположен на внутренней части инструмента, чтобы обеспечить способность активизировать команды штрихового кода и просматривать ярлыки бутылочки для идентификации экземпляра.

Количество крови, необходимое для исследования одного образца составляет для взрослых и детей составляет 8 мл и 3 мл соответственно.

#### **50. Эшерихии – возбудители оппортунистических инфекций (эшерихии, клебсиеллы, энтеробактеры, цитробактеры): характеристика; методы выделения и идентификации.**

Непатогенные виды *Escherichia coli* в норме обитают в толстом кишечнике и являются представителями нормальной микрофлоры. Но при изменении ан- 8 тигенной структуры (ОКН – антигены) этот микроб способен стать условно-патогенным и инвазивным.

*Citrobacter* является этиологическим фактором тяжелых гнойно-воспалительных, урологических и кишечных инфекций. В последние годы установлено, что бактериальные инфекции, вызванные энтеробактериями родов *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Proteus*, являются причиной гибели больных лейкозами. Интересным представляется тот факт, когда условно-патогенные энтеробактерии вступают в симбиотические связи и формируют ассоциацию микробов при микстинфекциях. Бактерии различных родов семейства *Enterobacteriaceae* выделяют антилизозимный фактор, который инактивирует тканевой лизоцим.

##### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

Первичная идентификация с использованием комбинированных сред позволяет определить лишь 4-5 признаков, на основании которых однозначное решение об отнесении культуры к определенному роду невозможно. Поэтому результаты первичной идентификации являются

ориентировочными. Спектр биохимических признаков считается достаточно надежным признаком и представлен минимальным дифференцирующим рядом:

- оксидазный тест;
- ферментация углеводов;
- восстановление нитратов;
- реакция Фогеса-Проскауэра;
- образование сероводорода, тест на подвижность.

Для изучения антибиотикоустойчивости условно- патогенных энтеробактерий используются традиционные методы: качественный (бумажных дисков) и количественный (серийных разведений).

**Эшерихии** – это основная аэробная микрофлора толстого кишечника человека. В санитарной эпидемиологии кишечная палочка является санитарно – показательным микроорганизмом при анализе воды и пищевых продуктов.

Цель бактериологического исследования при эшерихиозах, вызываемых условно-патогенными штаммами, это определение антигенных свойств бактерий. Изучение биохимических признаков проводится дополнительно для установления родовой принадлежности с помощью стандартных наборов или минимального дифференцирующего ряда. I этап. Посев материала методом Дригальского на дифференциально-диагностические среды Эндо или Левина. Чашку инкубируют в термостате 24 часа при 37°C. II этап. Выделение чистой культуры. Макро-и микроскопическое изучение колоний: на среде Эндо малиново-красных с металлическим блеском, на среде Левина темно-синих, для дифференциации патогенных кишечных палочек от непатогенных. Постановка реакции агглютинации на предметном стекле со смесью сывороток ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОKE. Из агглютинабельной колонии пересев на

скошенный агар для выделения чистой культуры. III этап. Идентификация выделенной культуры: а) по морфологическим признакам; б) по биохимическим признакам (среды Гисса с углеводами)

лактоза →КГ  
сахароза→ нет  
глюкоза →КГ  
манит →КГ  
мальтоза →КГ

в) по антигенной структуре.

Постановка реакции агглютинация на стекле с чистой культурой *E. coli* и иммунными ОВ-сыворотками (O55, O111, O124 и др.) для ориентировочного определения серогруппы. Постановка развернутой реакции агглютинации в пробирках с гретой культурой, содержащей только О-антиген. Учет реакции через 24 часа после инкубации в термостате.

**Род *Klebsiella*.** Заболевания, вызываемые клебсиеллами, выделены в самостоятельную нозологическую единицу – клебсиеллез. К этому роду относятся *K. pneumoniae*, выделенная из мокроты, *K. aerogenes*, выделенная из мочи, испражнений, отделяемого ран. Общие признаки это: - наличие капсулы; - порядковый номер капсульного антигена. Идентификация проводится по сероварам, фаговарам и биоварам. Биохимическое исследование включает 3 тест – субстрата: дульцит, сорбозу и Д- тартрат. Таким образом, дифференцирующим признаком является: наличие полисахаридной капсулы, отличающей *Klebsiella* от других представителей *Enterobacteriaceae*.

**Род *Citrobacter*.** Встречается у практически здоровых людей, а также выделяется при кишечных инфекциях (67,2%), гнойно-воспалительных процессах (23,5%) и урологических заболеваниях (11,9%). Был сконструирован молекулярный зонд для обнаружения энтеротоксигенных штаммов в опытах гибридизации. Электронномикроскопическое исследование ультраструктуры бактериальных колоний

**Род *Enterobacter*.** бактерии рода *Enterobacter* могут быть причиной сепсиса и менингитов у детей в 46% случаев, а при воспалительных процессах верхних дыхательных путей по частоте выделения занимают третье место после клебсиелл и эшерихий. Для идентификации энтеробактеров традиционно используют биохимические тесты. Идентификация бактерий рода *Enterobacter* проводится по сероводороду, желатину, реакции Фогеса-Проскауэра и другим тестам. Весьма актуальным является изучение факторов патогенности

бактерий рода *Enterobacter*:

- адгезивности
- энтеротоксигенности
- гемолитической активности
- лецитиназной активности
- ДНК-азной активности.

Бактерии рода *Enterobacter* обладают множественной лекарственной устойчивостью, которая связана с конъюгативными плазмидами.

Для обнаружения антибиотико-резистентных штаммов рекомендуется использовать современные методы экспресс - диагностики: ИФА и ПЦР.

**51. Методы окраски анилиновыми красителями: характеристика методов, принцип методов, значение в ходе лабораторной диагностики оппортунистических инфекций.**

*Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей хромофором является катион. Примерами кислых красителей служат эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители - метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристалл-виолет, сафранин — интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.*

Различают **простое** и **дифференциальное** окрашивание микроорганизмов. В первом случае прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определенные структуры клетки и запасные вещества.

Для **простого окрашивания** клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные палочки, лежащие над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают в нем в течение 1 - 3 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в случае необходимости добавляют новую порцию красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом 100х. Для

получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо раствора красителя заранее пропитанную им фильтровальную бумагу. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки.

Фиксировать и окрашивать можно также и препараты-«отпечатки». Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Форму клеток и их расположение (цепочки, розетки, пакеты, тетрады и т.д.) выявляют, как правило, на препаратах «раздавленная капля» при светло-полюсной или фазово-контрастной микроскопии. Для определения формы клеток мелких палочковидных бактерий, таких как *Serratia marcescens*, готовят препарат фиксированных клеток и применяют простое окрашивание. Клетки мелких бактерий, имеющих выросты - простеки (роды *Caulobacter*, *Labrys*, *Prosthecomicrobium*, *Stellai* некоторые другие), целесообразно исследовать методом фазового контраста или в темном поле. Естественное расположение клеток в колонии микроорганизмов, а также спор и спораносцев у актиномицетов и мицелиальных грибов изучают на препарате «отпечаток».

Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

**Окраска по Граму** (сложное окрашивание микроорганизмов) и ее использование для дифференциации бактерий с различным строением клеточной стенки.

Данный сложный (использующий более одного действующего вещества) метод окраски впервые был предложен в 1884г. датским ученым Х. Грамом (Ch.Gram) для окрашивания тканей, а позднее получил широкое распространение при окраске прокариот и был назван именем его разработчика.

Важное значение **метода окраски по Граму** в микробиологии определяется тем, что результаты окрашивания бактерий оказываются напрямую связанными с особенностями строения их клеточных стенок. Объяснением этого являются выраженные различия в строении клеточных стенок **грамположительных** (по данному методу окрашивающихся в фиолетовый цвет) и **грамотрицательных** (по данному методу окрашивающихся в красный цвет) бактерий. Первые из них имеют достаточно толстые слои из муреина (у эубактерий) или псевдомуреина (у архебактерий), удерживающие образующийся в протопласте комплекс «кристаллический фиолетовый + иод» и препятствующие его вымыванию из клетки при последующей обработке спиртом.

В свою очередь грамотрицательные бактерии не образуют подобных гетерополисахаридов или содержат их в небольших количествах, недостаточных для предотвращения экстрагирования комплекса красителя с йодом из протопласта при его обработке спиртом. Сказанное объясняет, почему несмотря на кажущуюся простоту метода Грама, именно он получил наибольшее распространение в качестве важного таксономически значимого теста, с результатами которого хорошо коррелируют многие прочие свойства прокариот.

Процедура окрашивания по Граму начинается с обработки фиксированных бактериальных клеток красителем кристаллическим фиолетовым, за чем следует обработка клеток раствором иода. Эти два компонента вместе образуют крупномолекулярный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в спирте. Поэтому, используя спирт, клетки дифференцируют: при промывании в нем «грамположительные» клетки удерживают комплекс «кристаллический фиолетовый + иод» и остаются синими, а «грамотрицательные» обесцвечиваются. Для того же, чтобы также сделать их видимыми, образцы дополнительно окрашивают каким-либо контрастным красным красителем – обычно фуксином.

**Процедура сложного окрашивания микроорганизмов:**

- 1) на предметном стекле готовят мазок бактериальной культуры, который фиксируют над пламенем горелки;
- 2) на мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, пропитанной раствором кристаллического фиолетового, на который наносят 2-3 капли воды и выдерживают в течение 2 мин;
- 3) снимают фильтровальную бумагу;
- 4) не смывая водой (!) на препарат наносят 2-3 капли раствора Люголя и выдерживают в течение 1 мин;
- 5) сливают раствор Люголя;
- 6) опускают предметное стекло в стаканчик с 95 % спиртом, где тщательно прополаскивают препарат в течение 0,5-1 мин, пока не перестанет отходить краситель;
- 7) тщательно промывают препарат водой;
- 8) наносят на предметное стекло раствор водного фуксина и прокрашивают препарат в течение 0,5-1 минут;
- 9) краситель сливают, тщательно промывают препарат водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Считается, что в большинстве случаев интерпретация результатов окраски мазка по Граму не представляет трудностей, однако некоторые грамположительные микроорганизмы, в частности представители рода *Bacillus*, могут иметь грамотрицательную окраску. Напротив, некоторые штаммы

грамотрицательных родов *Acinetobacter* и *Moraxella* проявляют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, поэтому выглядят грамположительными.

### **52. Люминесцентная микроскопия: характеристика, принцип метода, ход исследования, интерпретация результатов, роль в диагностике инфекционных заболеваний.**

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ светиться под действием коротковолновых лучей света. При этом длина волны излучаемого при люминесценции света всегда будет больше, чем длина волны света, возбуждающего люминесценцию. Так, если освещать объект синим светом, то он будет испускать лучи красного, оранжевого, желтого или зеленого цветов.

Препараты для люминесцентной микроскопии окрашивают специальными (светящимися) люминесцентными красителями - флуорохромами (например, раствор акридинового оранжевого 1:5000 - 1:10000). Лучи света от сильного источника (обычно ртутной лампы сверхвысокого давления) пропускаются через сине-фиолетовый фильтр. Под действием этого коротковолнового излучения окрашенные акридиновым оранжевым бактерии начинают светиться красным или зеленым светом. Для того, чтобы синий свет, вызывающий люминесценцию, не мешал наблюдению, над окуляром микроскопа ставят "запирающий" желтый светофильтр, задерживающий синие, но пропускающие желтые, зеленые и красные лучи.

В результате при наблюдении в микроскопе на темном фоне будут видны микробные клетки, светящиеся желтым, зеленым или красным цветом. При окраске акридиновым оранжевым дезоксирибонуклеиновая кислота (ядерное вещество) будет светиться ярко-зеленым цветом, а находящаяся в цитоплазме рибонуклеиновая кислота - красным цветом.

Метод люминесцентной микроскопии позволяет изучать живые нефиксированные бактерии, окрашенные сильно разведенными растворами красителей, не причиняющих вреда микробным клеткам. По характеру свечения могут быть дифференцированы отдельные химические вещества, входящие в состав микробной клетки. Метод с большим эффектом может -быть использован для ускорения диагностики ряда заболеваний.

Флуоресцирующими красителями можно обрабатывать диагностические сыворотки, содержащие антитела к определенным бактериям. Краситель, например, изотиоцианат флуоресцеина, химически соединяется с глобулинами иммунной сыворотки и таким образом как бы избирательно метит антитела.

Люминесцирующие сыворотки могут быть использованы для идентификации выделенных культур бактерий и для ускоренной индикации патогенных микробов во внешней среде и в выделениях больных.

Сущность **иммунофлуоресцентного метода** исследования заключается в том, что из исследуемого материала готовят мазок и после высушивания и фиксации обрабатывают его люминесцирующей сывороткой. При наличии в исследуемом мазке гомологичных бактерий, вследствие адсорбции на них меченных флуоресцирующим красителем антител, в люминесцентном микроскопе на темном фоне препарата обнаруживается специфическое яркое желто-зеленое свечение по периферии бактериальных клеток. Центральная часть клеток не светится. Присутствующие в препарате посторонние микробные клетки не светятся.

### **53. Пробиотики, пребиотики: характеристика; значение.**

Пробиотики - живые микроорганизмы: молочнокислые бактерии, чаще бифидо - или лактобактерии, иногда дрожжи, которые, как следует из термина "пробиотик", относятся к нормальным обитателям кишечника здорового человека.

**Пробиотики** *Lactobacilli L. acidophilus L. casei L. delbrueckii subsp. Bulgaricus L. reuteri L. brevis L. cellobiosus L. curvatus L. fermentum L. plantarum Gram-positive cocci Lactococcus lactis subsp. cremoris Streptococcus salivarius subsp. thermophilus Enterococcus faecium S. diaacetylactis S. intermedius Bifidobacteria B. bifidum B. adolescentis B. animalis B. infantis B. longum B. thermophilum*

Препараты-пробиотики на основе этих микроорганизмов широко используются в качестве питательных добавок, а также в йогуртах и других молочных продуктах. Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, не патогенны, не токсичны, содержатся в достаточном количестве, сохраняют жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт и при хранении [15, 20]. Пробиотики не считаются лекарственными препаратами и рассматриваются как средства, полезно влияющие на состояние здоровья людей.

К основным процессам, обеспечивающим положительные эффекты пробиотиков относятся: ингибирование роста потенциально вредных микроорганизмов в результате продукции антимикробных субстанций, активации иммунокомпетентных клеток; стимуляция роста представителей микрофлоры в результате продукции витаминов и других ростостимулирующих факторов; нейтрализация токсинов и нормализация pH; изменение микробного метаболизма, проявляющееся в повышении или снижении активности ферментов.

Пробиотики могут включаться в питание в качестве диетических добавок в виде лиофилизированных порошков, содержащих бифидобактерии, лактобактерии и их комбинации, используются без назначения

врача для восстановления микробиоценоза кишечника, для поддержания хорошего состояния здоровья, поэтому разрешение на производство и применение пробиотиков в качестве диетических добавок от государственных структур, контролирующих создание лекарственных препаратов не требуется

### Пребиотики

К пребиотикам относятся неперевариваемые ингредиенты пищи, которые способствуют улучшению здоровья за счет избирательной стимуляции роста и/или метаболической активности одной или нескольких групп бактерий, обитающих в толстой кишке [21].

Чтобы компонент пищи был классифицирован как пребиотик, он не должен подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека, не должен абсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта, однако должен являться селективным субстратом для роста и/или метаболической активации одного вида или определенной группы микроорганизмов, заселяющих толстый кишечник, приводя к нормализации их соотношения [21, 35].

Ингредиенты питания, которые отвечают этим требованиям, являются низкомолекулярными углеводами. Свойства пребиотиков наиболее выражены во фруктоолигосахаридах (ФОС), инулине, галактоолигосахаридах (ГОС), лактулозе, лактитоле. Пребиотики находятся в молочных продуктах, кукурузных хлопьях, крупах, хлебе, луке репчатом, цикории полевом, чесноке, фасоли, горохе, артишоке, аспарагусе, бананах и многих других продуктах. На жизнедеятельность микрофлоры кишечника человека в среднем расходуется до 10% поступившей энергии и 20% объема принятой пищи [8].

### **54. Серологические методы: характеристика, принципы методов, значение в диагностике инфекционных патологий.**

Серологический метод диагностики предусматривает применение 2 направлений исследований: серодиагностики (выявление специфических антител в сыворотке крови обследуемых) и сероидентификация (определение антигенных свойств выделенного возбудителя с целью установления его вида и типа).

При серодиагностике применяются реакции агглютинации, преципитации, лизиса, РСК, реакции с использованием меченых антигенов или антител. Компонентами этих реакций являются: сыворотки крови обследуемых больных и стандартные антигенные препараты. Целью исследований являются определение титров антител к возбудителям инфекционных заболеваний в исследуемых сыворотках.

Выявление высоких титров специфических антител особенно если они достигают уровня так называемых «диагностических» титров, подтверждает предполагаемый диагноз. Большое значение придается исследованию парных сывороток, когда одновременно титруются сыворотки взятые в самом начале заболевания (3-4ый день) и сыворотки, полученные на 7-й - 10-й день заболевания. Диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титров антител.

При сероидентификации чаще других используется реакция агглютинации на стекле. Компоненты реакции: выращенная чистая культура возбудителя заболевания (антиген) и стандартные диагностические иммунные кроличьи сыворотки (антитела).

Достоинство серологического метода - простота, доступность, высокая чувствительность, специфичность, экспрессность.

Недостатки: необходимость дорогостоящих стандартных препаратов и аппаратуры.

Суть всех серологических реакций состоит в специфическом соединении антигенов и соответствующих им антител с образованием комплекса. Серологическая реакция возможна, если имеется иммунологическое соответствие (гомологичность) – главных компонентов – антигенов и антител. В основе иммунологической специфичности лежит структурная комплементарность антигена и антитела.

Процесс взаимодействия антигенов и антител протекает в две фазы – специфическую и неспецифическую. Первая фаза развивается быстро. Она состоит из специфического соединения активного центра антитела с детерминантными группами соответствующего (гомологичного) антигена. Более медленно развивается последующая фаза, неспецифическая – это внешнее проявление реакции антиген-антитело (выпадение хлопьев, помутнение среды и т. д.)

Серологические реакции применяются с двумя целями:

- 1) для выявления антител в исследуемой сыворотке с помощью известных антигенов (серодиагностика);
- 2) для установления неизвестного антигена с помощью известных сывороток (сероидентификация).

Определение неизвестного антигена при микробиологических исследованиях проводится с целью установления родовой, видовой, типовой принадлежности возбудителей, выделенных у обследуемого. В таких случаях из двух основных компонентов реакции (антитело, антиген) неизвестным является антиген, реакция должна проводиться с заведомо известными антителами. При этом антигеном является

чистая культура выделенных из исследуемого материала микроорганизмов. В качестве заведомо известных антител применяются иммунные диагностические сыворотки. Последние получают из крови животных (чаще всего кроликов), предварительно иммунизированных соответствующими бактериальными антигенами. Иммунные сыворотки должны содержать высокий уровень специфических антител.

Помимо этого, серологические реакции могут использоваться для определения различных небактериальных антигенов: для установления групп крови, тканевых антигенов, опухолей, для подбора пар донор – реципиент при трансплантации органов и тканей и т. д.

Серологические реакции могут применяться и для обнаружения антител в сыворотке крови. В таких случаях требуется заведомо известный антиген (диагностикум). В качестве антигенов могут быть использованы взвеси живых или убитых микробов, экстракты или изолированные химические фракции из них.

### 55. Антибиотики: определение понятия; значение в различных отраслях; история открытия.

Антибиотики (от греч. anti - против, bios - жизнь) - продукты жизнедеятельности живых организмов, способные избирательно убивать микроорганизмы или подавлять их рост.

Антибиотики - это химические вещества, образуемые микроорганизмами, которые обладают способностью подавлять рост или даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы.

Начало учения об антибиотиках положено в 1929 г., когда английский ученый А. Флеминг обнаружил на чашках с посевами золотистого стафилококка лизис колоний вблизи случайно выросшей плесени *Penicillium notatum*.

Антибиотики могут быть **синтезированы** в лаборатории или **произведены живым организмом**. Они обладают уровнем токсичности, который влияет на патогенные микроорганизмы, но не на организмы-хозяева, помимо каких-либо побочных реакций.

Каждый антибиотик обладает специфическим избирательным действием на определенные виды микробов. Благодаря такому избирательному действию многие антибиотики способны подавлять жизнедеятельность патогенных микроорганизмов в безвредных для организма концентрациях. Такие антибиотики широко используют для лечения различных инфекционных болезней.

**Таблица 29.1.** Основной механизм и характер противомикробного действия ряда антибиотиков

Группа	Антибиотики	Основной механизм противомикробного действия	Преимущественный характер противомикробного действия
Антибиотики, влияющие преимущественно на грамположительные бактерии	Препараты бензилпенициллина	Угнетение синтеза клеточной стенки	Бактерицидный
	Оксациллин	То же	*
	Эритромицин	Угнетение синтеза белка	Бактериостатический
Антибиотики, влияющие на грамотрицательные бактерии	Полимиксины	Нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны	Бактерицидный
Антибиотики широкого спектра действия	Тетрациклины	Угнетение синтеза белка	Бактериостатический
	Левомецетин	То же	*
	Аминогликозиды	* *	Бактерицидный
	Полусинтетические пенициллины широкого спектра действия	Угнетение синтеза клеточной стенки	*
	Карбапенемы	То же	*
	Цефалоспорины	* *	*
	Рифампицин	Угнетение синтеза РНК	*

Классификация антибиотиков по характеру воздействия на бактериальную клетку:

- бактериостатические препараты (останавливают рост и размножение бактерий)
  - бактерицидные препараты (уничтожают бактерии)
- По способу получения различают антибиотики:
- природные
  - синтетические
  - полусинтетические
- По направленности действия различают:
- антибактериальные

- противоопухолевые
  - противогрибковые
- По спектру действия различают:
- антибиотики широкого спектра действия
  - антибиотики узкого спектра действия

Они широко используются в медицине, в сельском хозяйстве, в пищевой и консервной промышленности, как специфические ингибиторы в биологических исследованиях.

Они нашли широкое применение при лечении многих инфекционных заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми или сопровождались высоким летальным исходом. К числу таких заболеваний необходимо отнести некоторые формы туберкулеза и прежде всего туберкулез менингитный, который до применения антибиотиков вызывал 100%-ный летальный исход, чуму, азиатскую холеру, брюшной тиф, бруцеллез, пневмонию, различные септические процессы и др.

Некоторые антибиотики способны подавлять развитие злокачественных опухолей и проявлять активность в отношении ряда вирусов.

Наряду с медицинским использованием антибиотики находят широкое применение в сельском хозяйстве. Прежде всего антибиотики используются в качестве препаратов в ветеринарии для лечения различных заболеваний сельскохозяйственных животных. В этом случае они, как и в медицине, оказались весьма эффективными средствами.

Антибиотические вещества находят все возрастающее применение в борьбе с фитопатогенными организмами — возбудителями заболеваний растений, наносящими ощутимый урон сельскохозяйственному производству.

#### **56. Методы молекулярной биологии: характеристика, принципы, значение в диагностике инфекционных заболеваний.**

- **Иммуногистохимические методы** необходимы для изучения процессов дифференцировки клеток, что является принципиальным в установлении гистогенеза опухолей, их диагностики, для определения прогноза, а также выявления различных инфекционных агентов.
- **Гибридизация *in situ* (ГИС)** — это метод прямого выявления нуклеиновых кислот непосредственно в клетках или гистологических препаратах. Преимущество метода — возможность не только идентифицировать нуклеиновые кислоты, но и устанавливать корреляцию с морфологическими данными. Применение ГИС, например, помогает диагностировать вирусную инфекцию у серонегативных больных при СПИДе, вирусных гепатитах.
- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** используется при изучении наследственной патологии и для выявления инфекционных (вирусных) антигенов. Для ПЦР достаточно иметь одну молекулу (или фрагмент) ДНК или РНК. В отличие от ГИС, ПЦР позволяет выявить уникальную нуклеотидную последовательность на сотни тысяч и миллионы клеток.

**Полимеразная цепная реакция** позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфического для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на 2 нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры, при наличии в смеси ДНК искомого гена, связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях, в случае комплементарное™ ДНК гена и праймера, происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое. Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

**Рестрикционный анализ.** Данный метод основан на применении ферментов, носящих название рестриктаз. Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута

относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК.

В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.

Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким образом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям.

Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

**Метод молекулярной гибридизации** позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения.

Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 °С) в щелочной среде денатурировать, т. е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда.

Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК, они образуют между собой двойную спираль.

**57. Нормофлора: группы; основные представители; значение для макроорганизма; органы, в норме заселенные микроорганизмами. Современное состояние проблемы.**

*Нормальная микрофлора* человека – это совокупность множества микробиоценозов, характеризующихся определенными взаимосвязями и местом обитания.

Организм человека заселен (колонизирован) примерно 500 видами микроорганизмов, составляющих его нормальную микрофлору в виде сообщества микроорганизмов (микробиоценоз). Они находятся в состоянии равновесия друг с другом и с организмом человека, являются комменсалами, не причиняющими вреда человеку. Микрофлора колонизирует поверхность тела и полости, сообщающиеся с окружающей средой. В норме микроорганизмы отсутствуют в легких, матке и во всех внутренних органах. В организме человека выделяют постоянную и транзитную микрофлору.

*Постоянная* (резидентная, индигенная, или автохтонная) микрофлора представлена микроорганизмами постоянно присутствующими в организме.

*Транзитная* (непостоянная или аллохтонная) – микрофлора не способна к длительному существованию в организме.

Постоянную микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. Облигатная микрофлора (бифидобактерии, лактобактерии, пептострептококки, кишечные палочки) является основой микробиоценоза, а факультативная микрофлора (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы) включает меньшую часть микробиоценоза. Количество микроорганизмов у взрослого человека составляет около  $10^{14}$  особей, причем преобладают в значительной степени облигатные анаэробы.

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

Факторы, влияющие на состояние нормальной микрофлоры.

1. Эндогенные:

- а) секреторная функция организма;
- б) гормональный фон;
- в) кислотно-основное состояние.

2. Экзогенные условия жизни (климатические, бытовые, экологические).

Микробное обсеменение характерно для всех систем, имеющих контакты с окружающей средой. В организме человека стерильными являются кровь, ликвор, суставная жидкость, плевральная жидкость, лимфа грудного протока, внутренние органы: сердце, мозг, паренхима печени, почек, селезенки, матка,

мочевой пузырь, альвеолы легких.

Нормальная микрофлора выстилает слизистые оболочки в виде биопленки. Этот полисахаридный каркас состоит из полисахаридов микробных клеток и муцина. В нем находятся микроколонии клеток нормальной микрофлоры. Толщина биопленки – 0,1–0,5 мм. В ней содержится от нескольких сотен до нескольких тысяч микроколоний.

Формирование биопленки для бактерий создает дополнительную защиту. Внутри биопленки бактерии более устойчивы к действию химических и физических факторов.

Нормальная микрофлора рассматривается как самостоятельный экстракорпоральный орган с определенной анатомической структурой и функциями.

Функции нормальной микрофлоры:

1) участие во всех видах обмена;  
2) детоксикация в отношении экзо- и эндопродуктов, трансформация и выделение лекарственных веществ;

3) участие в синтезе витаминов (группы В, Е, Н, К);

4) защита:

а) антагонистическая (связана с продукцией бактериоцинов);

б) колонизационная резистентность слизистых оболочек;

5) иммуногенная функция.

Наибольшей обсемененностью характеризуются:

1) толстый кишечник;

2) ротовая полость;

3) мочевыделительная система;

4) верхние дыхательные пути;

5) кожа.

Нормальная микрофлора кожи.

Наиболее заселены микроорганизмами места, защищенные от действия света и высыхания. Наиболее постоянен состав микрофлоры в области устьев сально- волосяных фолликулов. Чаще выявляются *Staphylococcus epidermidis* и *S. saprophyticus*, грибы рода *Candida*, реже- дифтероиды и микрококки.

Микрофлора дыхательных путей.

Слизистые оболочки гортани, трахеи, бронхов и альвеолы здорового человека не содержат микроорганизмов. Основная масса микрофлоры рото- и носоглотки приходится на зеленящего стрептококка, реже выявляются нейссерии, дифтероиды и стафилококки.

Микрофлора мочеполового тракта.

Микробный биоценоз скуден, верхние отделы обычно стерильны. Во влагалище здоровой женщины преобладают молочнокислые палочки Додерлейна (лактобактерии), создающие кислую рН, угнетающую рост грамотрицательных бактерий и стафилококков, и дифтероиды. Существует баланс между лактобактериями с одной стороны и гарднереллами и анаэробами с другой.

Микрофлора желудочно- кишечного тракта.

В полости рта обитают бактериоиды, превотеллы, порфиромонады, бифидобактерии, лактобактерии, нейссерии, стрептококки, стафилококки, грибы рода *Candida* и простейшие и др, в 1мл слюны обитает  $10^8$  бактерий; пицевод практически не содержит микроорганизмов; микрофлора желудка представлена лактобациллами и дрожжами, единичными кокками и грамотрицательными бактериями. При гастритах и язвенной болезни желудка обнаруживается хеликобактер пилори. Концентрация бактерий в 1 мл  $10^3$ . В тонкой кишке находится  $10^5$ - $10^8$  микроорганизмов на 1мл. Здесь обнаруживаются бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, энтерококки, порфиромонады, превотеллы, анаэробные кокки. В толстой кишке содержится до  $10^{12}$  микроорганизмов в 1г фекалий. Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются: бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, энтерококки, бактериоиды, кишечные палочки, цитробактер, энтеробактер.

Значение микрофлоры организма человека:

1. участие во всех видах обмена;
2. детоксикация в отношении экзо- и эндопродуктов, трансформация и выделение лекарственных веществ;
3. участие в синтезе витаминов;
4. защита: а) антагонистическая, связанная с продукцией бактериоцинов, антибиотиков, молочной и уксусной кислоты; б) колонизационная резистентность слизистых оболочек;
5. иммуногенная функция.

Представители нормальной микрофлоры при снижении сопротивляемости организма вызывают гнойно-воспалительные процессы, т.е. нормальная микрофлора может стать источником аутоинфекции. Например, бактериоиды, обитающие в норме в кишечнике, могут вызывать абсцессы, проникая в

различные ткани в результате травмы или хирургической операции. Эпидермальный стафилококк в норме часто встречающийся на коже склонен колонизировать внутривенные катетеры, вызывая нарушения кровотока. Такие комменсалы кишки, как кишечная палочка, поражают мочевую систему (цистит). Значительные ткани в резерве в кишечнике, могут вызывать абсцессы

#### **58. Антимикотики: определение понятия; природная и приобретенная резистентность к антимикотикам у кандид, механизм.**

Антимикотиками называют противогрибковые средства, которые характеризуются специфической активностью в отношении грибов и грибообразных организмов микроскопических размеров (микромикетов), вызывающих заболевания у людей. О таких препаратах еще говорят, что они обладают фунгицидным действием. Эта группа лекарственных средств включает несколько разновидностей химических соединений. Их разделяют на группы в зависимости от состава и структуры, спектра терапевтической активности, механизма всасывания в организме человека и метаболизма, лекарственной формы.

По общему эффекту, оказываемому на клетки грибов, выделяют 2 большие группы лекарств:

- фунгицидные, приводящие к полной гибели микроорганизма за счет нарушения основных жизненных функций (чаще всего путем деструкции мембраны);
- фунгистатические, замедляющие появление и рост новых клеток, останавливающие процессы, необходимые для построения их биоматериала при размножении.

Устойчивость к противогрибковому препарату неуклонно растет в связи с особенностями заболевания вызываемого грибами: часто кандидозная инфекция протекает хронически, заставляя человека терпеть свое присутствие в связи с незначительными клиническими проявлениями, при этом грибок проникает все глубже в ткани, где антимикотик не может достичь необходимой подавляющей концентрации; последнее объясняет склонность инфекции к рецидивированию, что, в свою очередь, заставляет больного обращаться к помощи уже известного ему препарата, не обращаясь к врачу. В итоге у таких пациентов развиваются высоко резистентные штаммы кандид, и излечение от такой инфекции требует больших усилий.

Также проблема резистентности грибов к антимикотикам возникает при назначении заведомо низких доз препарата с профилактической целью больным ВИЧ-инфекцией, пациентам перенесшим обширные операции, а также пациентам страдающим осложнениями сахарного диабета (диабетическая стопа) и при других иммунодефицитных состояниях!

#### **59. Масс-спектрометрия: характеристика, принцип метода, значение в диагностике инфекционных процессов.**

Масс-спектрометрия (масс-спектрокопия, масс-спектрография, масс-спектральный анализ, масс-спектрометрический анализ) — метод исследования вещества путем определения отношения массы к заряду (качества) и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином воздействии на вещество. Изотопная масс-спектрометрия углеродных атомов применяется для прямой диагностики инфекционных болезней (у человека *Helicobacter pylori*) и является самым надежным из всех существующих методов диагностики.

Масс-спектрометр — вакуумный прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях и необходимый для получения масс-спектра.

Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов может быть осуществлена двумя способами: по спектру белков микробов – белковое профилирование (MALDI-TOF MS) и по клеточным липидам – метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС).

MS получает все более широкое использование в медицине: разработка новых лекарственных средств, контроль их производства, геномная инженерия и биохимия, протеомика. В клинических лабораториях метод находит применение для масс-спектрометрического выявления большинства стероидных гормонов (включая экзогенного происхождения) и определения уровня аминокислот и ацилкарнитинов [2]. MS позволяет идентифицировать белки, определять их структурные изменения вследствие различных взаимодействий при их воспроизводстве, определять пути метаболизма лекарственных средств и других соединений и идентифицировать метаболиты, разрабатывать новые лекарственные средства.

Находит MS применение и в микробиологии. Апробация метода MALDI-TOF для идентификации возбудителей чумы свидетельствует об эффективности MALDI-TOF анализа для достоверной и эффективной межвидовой дифференциации возбудителей чумы от других представителей рода *Yersinia*, а также для внутривидовой идентификации *Y. pestis* [3]. Появились сообщения о возможности использования метода MALDI-TOF для диагностики холеры и пищевых токсикоинфекций, вызванных галофильными вибрионами [4].

Внедрение в клиническую микробиологию технологий, основанных на масс-спектрометрии MALDI-TOF MS открыло новые возможности очень точной идентификации возбудителей инфекционных заболеваний. MS наиболее эффективна при анализе нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), белков и пептидов

бактерий. MALDI-TOF MS идентификация микроорганизмов основана на определении уникального для каждого вида микроорганизмов набора белков – своеобразный «отпечаток пальца» (фингерпринтинг) микроорганизма, «протеомная дактилоскопия».

Идентификация осуществляется в основном по рибосомальным белкам, которые присутствуют во всех микроорганизмах. Сущность метода заключается в превращении (с помощью лазерных импульсов) органического вещества микроорганизмов в заряженные частицы - ионы. Этот процесс называется ионизацией. При этом молекулы вспомогательного вещества – матрицы, и изучаемого микроорганизма (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Полученные в результате ионизации ионы с помощью электрического поля переносят в газовую фазу вакуумной части масс-спектрометра.

Подготовка культуры. На подложке масс-анализатора смешивают идентифицируемые микроорганизмы (взяты из чистой культуры, отдельной колонии, среды обогащения) и раствор матрицы.

Идентификация культуры. Подготовленную культуру помещают в масс-анализатор и подвергают воздействию лазерных импульсов (ионизация). Далее процесс идентификации осуществляется с помощью масс-спектрометра автоматически, без вмешательства исследователя. Идентификация культуры одного микроорганизма завершается менее чем за 2 минуты.

**60. Вакцинопрофилактика оппортунистических инфекций: классификация вакцин; характеристика вакцин против условно-патогенных микроорганизмов; современные проблемы создания вакцин.**

**Классификация вакцин**

- 1. Живые**  
- содержат живых, но ослабленных (**аттенуированных**) возбудителей.
- 2. Инактивированные корпускулярные**  
- содержат **цельные клетки** возбудителя, **инактивированные** физическими или химическими факторами.
- 3. Химические**  
- содержат не цельные клетки, а **отдельные АГ** возбудителя, извлеченные из клеток химическим путём. Часто – **адсорбированные** (например, на частицах гидроксида Al).
- 4. Анатоксины**  
- экзотоксины бактерий, обезвреженные 0,3 - 0,4% формалином при + 37°C в течение 20 – 40 суток. Токсины теряют токсичность, но сохраняют иммуногенность. Часто – **адсорбированные** (например, на частицах гидроксида Al).

**Классификация вакцин**

- 5. Рекомбинантные**  
С помощью методов **генной инженерии** гены микроорганизмов, контролирующие синтез наиболее значимых иммуногенных АГ, встраивают в дрожжевые клетки, которые затем начинают продуцировать нужный АГ. После культивирования дрожжей из них выделяют нужный антиген, очищают и готовят вакцину.
- 6. Синтетические олигопептидные**  
Принципы их конструирования включают **синтез пептидных последовательностей**, образующих эпитопы АГ, распознаваемые нейтрализующими антителами.
- 7. Липосомальные**  
представляют собой комплексы, состоящие из **АГ и липофильных носителей** (например, фосфолипидов). Иммуногенные липосомы более эффективно стимулируют выработку антител, пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию ими ИЛ- 2.

Живые вакцины — препараты из аттенуированных (ослабленных) либо генетически изменённых патогенных микроорганизмов, а также близкородственных микробов, способных индуцировать невосприимчивость к патогенному виду (в последнем случае речь идёт о так называемых дивергентных вакцинах). Поскольку все живые вакцины содержат микробные тела, то их относят к группе корпускулярных вакцинных препаратов.

Иммунизация живой вакциной приводит к развитию вакцинального процесса, протекающего у большинства привитых без видимых клинических проявлений. Основное достоинство живых вакцин — полностью сохранённый набор Аг возбудителя, что обеспечивает развитие длительной

невосприимчивости даже после однократной иммунизации. Живые вакцины обладают и рядом недостатков. Наиболее характерный — риск развития манифестной инфекции в результате снижения аттенуации вакцинного штамма. Подобные явления более типичны для противовирусных вакцин (например, живая полиомиелитная вакцина в редких случаях может вызвать полиомиелит вплоть до развития поражения спинного мозга и паралича).

Ослабленные ( аттенуированные ) вакцины

Ослабленные (аттенуированные) вакцины изготавливают из микроорганизмов с пониженной патогенностью, но выраженной иммуногенностью. Введение вакцинного штамма в организм имитирует инфекционный процесс: микроорганизм размножается, вызывая развитие иммунных реакций. Наиболее известны вакцины для профилактики сибирской язвы, бруцеллёза, Ку-лихорадки, брюшного тифа. Однако большая часть живых вакцин — противовирусные. Наиболее известны вакцина против возбудителя жёлтой лихорадки, противополиомиелитная вакцина Сэйбина, вакцины против гриппа, кори, краснухи, паротита и аденовирусных инфекций.

Дивергентные вакцины

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

## **4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ**

### **4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации**

Промежуточная аттестация по дисциплине – экзамен, который сдается в форме ответа на вопросы в свободной форме.

### **4.2. Критерии оценивания экзамена в форме устного ответа на вопросы билета**

- «Отлично» - студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы, написания тестовых заданий.
- «Хорошо» - студент твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос, правильно применяет теоретические положения при решении практических вопросов и задач, владеет необходимыми навыками и приемами их выполнения.
- «Удовлетворительно» - студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает неполно, непоследовательно, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки.
- «Неудовлетворительно» - студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений; беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи. Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы и написания тестовых заданий.

### **4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций**

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации. Итоговый контроль по дисциплине проводится в форме экзамена. На экзамене студент отвечает на два вопроса. К сдаче экзамена допускаются студенты, которые имеют не менее 80% посещенных занятий, выполнившие рефераты по заданным темам, имеющие положительные оценки за устные ответы на практи-

ческих и лабораторных занятиях и в контрольных тестах. Студент имеет право погасить свою задолженность во время текущих консультаций или в ходе итоговой аттестации.

### Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Оценка	Критерии оценки знаний студентов
Отлично	Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии
Хорошо	Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач.
Удовлетворительно	Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности
Неудовлетворительно	Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, с большими затруднениями выполняет практические задания, отсутствуют межпредметные связи

Уровни сформированности компетенций определяется по следующим категориям.

**1. Пороговый уровень:** предполагает формирование компетенций на начальном уровне: знание содержания понятий, разнообразие микроорганизмов в природе, отличительные особенности условно-патогенных микроорганизмов, владение навыками посева микроорганизмов в питательные среды.

**2. Базовый уровень:** предполагает формирование компетенций на более высоком уровне: знания о выборе клинического материала и питательных сред для его посева, о культуральных методах выделения и идентификации клинически значимых бактерий, методах экспресс-диагностики, владение методами посева материала.

**3. Продвинутый уровень:** предполагает формирование компетенций на высоком уровне, готовность к самостоятельной профессиональной деятельности. Формируются системные знания об условно-патогенных микроорганизмах, их значении в развитии патологического процесса, принципы выделения микроорганизмов, оценка этиологической значимости выделенных микробов, решение сложных задач, знание контроля качества лабораторных исследований, нормативной документации..

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения у инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины.

**06.03.01 Направление подготовки Биология, ФОС РПД Клиническая микробиология, 2025 год набора, очная форма обучения**

Проректор по учебной работе      утверждено 24.02.2025      А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета      согласовано      Д.С. Сташкевич

**Заседанием кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии**

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой      согласовано      А. Л. Бурмистрова

Автор (составитель)      Л.И. Бахарева

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО «ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**