

Микробиология, вирусология

Руководство к практическим занятиям

Учебное пособие

**Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева
и проф. М.Н. Бойченко**

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
последипломного образования» Министерства здравоохранения
Российской Федерации в качестве учебного пособия к использованию в
образовательных учреждениях, реализующих образовательные программы
высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по
специальности 060101 «Лечебное дело»

Регистрационный номер рецензии 052 от 21 февраля 2015 года
ФГАУ «Федеральный институт развития образования»



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	10
Список сокращений	11
Часть I. Общая микробиология и вирусология	13
Модуль 1. Микробиологические лаборатории, их оборудование.	
Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории	15
1.1. Характеристика микробиологической и вирусологической лабораторий	15
1.2. Оснащение микробиологических и иммунологических лабораторий	17
1.3. Правила работы в микробиологической лаборатории	19
Вопросы для самоконтроля	19
Модуль 2. Микроскопические методы исследования, используемые в микробиологии. Морфология микроорганизмов. Способы окраски ...	20
2.1. Мир, классификация и принципы таксономии микроорганизмов	20
2.2. Структура бактериальной клетки. Простые и сложные методы окраски бактерий	22
2.2.1. Классификация бактерий по морфологии. Техника приготовления мазка из чистой культуры бактерий. Простые методы окраски бактерий	22
2.2.2. Строение бактериальной клетки	27
2.2.3. Дифференциальные методы окраски бактерий (окраска по Граму и методу Циля–Нильсена)	31
2.2.4. Дополнительные структуры бактерий и их выявление. ...	34
2.3. Морфология грибов. Принципы классификации грибов и методы изучения их морфологии	39
2.4. Морфология и принципы классификации простейших	42
2.5. Морфология вирусов. Принципы классификации и методы изучения морфологии вирусов	44
2.6. Методы микроскопического исследования. Техника световой микроскопии с масляной иммерсией	46
Вопросы для самоконтроля	51
Модуль 3. Физиология микроорганизмов. Бактериологический метод исследования	52
3.1. Условия культивирования бактерий	52
3.2. Питательные среды	53

3.2.1. Основные требования, предъявляемые к питательным средам	53
3.2.2. Классификация питательных сред	54
3.3. Методы посевов на питательные среды	56
3.4. Ферменты бактерий. Дифференциально-диагностические среды	58
3.5. Выделение чистой культуры бактерий	66
3.6. Культивирование анаэробов	69
3.6.1. Физические методы	69
3.6.2. Химические методы	70
3.6.3. Биологический метод (метод Фортнера).	71
Вопросы для самоконтроля	71
Модуль 4. Бактериофаги. Молекулярно-генетические методы исследования	72
4.1. Бактериофаги	72
4.1.1. Получение фаголизатов	72
4.1.2. Определение титра фага методом агаровых слоев по Грацию	73
4.2. Методы внутривидовой идентификации бактерий (эпидемиологического маркирования)	74
4.2.1. Фаготипирование	74
4.2.2. Определение продукции колицинов по Фредерику	75
4.2.3. Исследование плазмидного профиля бактерий.	75
4.2.4. Рестрикционный анализ (метод «отпечатков пальцев»)	77
4.2.5. Риботипирование	78
4.2.6. Мультилокусное секвенирование-типирование	78
4.3. Методы обнаружения возбудителя без выделения чистой культуры	79
4.3.1. Полимеразная цепная реакция	79
4.3.2. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	83
4.3.3. Лигазная цепная реакция.	84
Вопросы для самоконтроля	86
Модуль 5. Методы культивирования, индикации и идентификации вирусов	87
5.1. Методы культивирования вирусов.	87
5.2. Методы индикации вирусов	89
Вопросы для самоконтроля	94
Модуль 6. Экология микроорганизмов. Распространение микроорганизмов в окружающей среде. Санитарно- показательные микроорганизмы, их обнаружение	95

6.1. Санитарно-бактериологическое исследование воды, почвы и воздуха	95
6.1.1. Санитарно-микробиологический анализ воды	96
6.1.2. Санитарно-микробиологический анализ почвы	98
6.1.3. Санитарно-микробиологический анализ воздуха	98
6.2. Методы санитарно-бактериологического исследования воды и воздуха	99
6.2.1. Санитарно-бактериологический анализ воды	99
6.2.2. Санитарно-бактериологический анализ воздуха	101
6.3. Микрофлора организма человека.	102
6.4. Микробиологические исследования микрофлоры тела человека	105
6.4.1. Исследование микрофлоры зубного налета	105
6.4.2. Исследование микрофлоры зева и носа	107
6.4.3. Исследование микрофлоры кишечника	107
6.4.4. Микробиологическая диагностика бактериального вагиноза	111
Вопросы для самоконтроля	114
Модуль 7. Действие на микроорганизмы физических и химических факторов. Антибиотики	115
7.1. Понятие о стерилизации и дезинфекции	117
7.1.1. Стерилизация.	117
7.1.2. Дезинфекция	118
7.2. Понятие об асептике и антисептике. Методы асептики и антисептики	119
7.3. Санитарно-микробиологическое исследование смывов с рук персонала и поверхностей предметов	121
7.3.1. Определение общего количества микроорганизмов.	122
7.3.2. Определение количества бактерий группы кишечной палочки.	122
7.3.3. Определение эффективности дезинфекции.	122
7.4. антибактериальные химиопрепараты.	123
7.4.1. Химиотерапия инфекционных заболеваний	123
7.4.2. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам	127
Вопросы для самоконтроля	131
Модуль 8. Учение об инфекции. Инфекционный процесс. Свойства патогенных микроорганизмов. Биологический метод исследования.	132

8.1. Понятие об инфекционном процессе и инфекционном заболевании. формы инфекционного процесса	132
8.2. Понятие о патогенности и вирулентности микроорганизмов	134
8.2.1. Определение степени вирулентности бактерий (LD_{50}) . . .	135
8.2.2. Факторы патогенности.	135
8.2.3. Определение факторов патогенности микроорганизмов	136
8.3. Биологический метод исследования	138
Вопросы для самоконтроля	139
Модуль 9. Серологический метод исследования в диагностике инфекционных заболеваний	140
9.1. Реакции иммунитета.	140
9.2. Реакция агглютинации.	143
9.2.1. Развернутая агглютинация в пробирках	144
9.2.2. Агглютинация на предметном стекле	146
9.3. Реакция Кумбса.	147
9.4. Реакция пассивной гемагглютинации.	147
9.5. Реакция преципитации	150
9.6. Реакция лизиса	155
9.7. Реакция связывания комплемента	156
9.8. Реакции с использованием меченых антител или антигенов	158
9.8.1. Реакция иммунофлюоресценции	159
9.8.2. Иммуноферментный анализ	162
9.8.3. Определение avidности IgG	169
9.8.4. Радиоиммунологический анализ	173
9.8.5. Иммуноблоттинг	173
9.8.6. Иммунохроматографический анализ.	176
9.9. Реакция торможения гемагглютинации	180
9.10. Реакция биологической нейтрализации	181
Вопросы для самоконтроля	184
Модуль 10. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний	185
10.1. Методы микробиологической диагностики инфекционных заболеваний	185
10.2. Сбор, хранение и транспортировка материала для исследования.	190
Вопросы для самоконтроля	192

Часть II. Частная медицинская микробиология и вирусология	193
Модуль 11. Возбудители бактериальных кишечных инфекций:	
основные биологические свойства, принципы лабораторной	
диагностики	195
11.1. Диагностика острых кишечных инфекций	195
11.1.1. Диагностика брюшного тифа и паратифов	203
11.1.2. Диагностика сальмонеллезов	207
11.1.3. Диагностика шигеллезов	207
11.1.4. Диагностика кишечного эшерихиоза	211
11.2. Диагностика холеры	212
11.3. Диагностика иерсиниозов	215
11.4. Диагностика кампилобактериоза	217
11.5. Диагностика хеликобактер-инфекции	220
11.6. Диагностика лептоспироза	220
11.7. Диагностика листериоза	221
11.8. Диагностика ботулизма	223
Вопросы для самоконтроля	225
Модуль 12. Возбудители респираторных бактериальных инфекций:	
основные биологические свойства, принципы лабораторной	
диагностики	226
12.1. Диагностика специфических инфекций дыхательных путей.	228
12.1.1. Диагностика дифтерии	228
12.1.2. Диагностика коклюша	233
12.1.3. Диагностика туберкулеза	239
12.1.4. Диагностика скарлатины	243
12.1.5. Диагностика эпидемического цереброспинального менингита.	244
12.2. Диагностика неспецифических инфекций дыхательных путей	247
12.2.1. Бактериологическая диагностика неспецифических инфекций органов дыхания	247
12.2.2. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных бактериями рода <i>Haemophilus</i>	250
12.3. Диагностика легионеллезов и атипичных пневмоний	251
12.3.1. Легионеллез	251
12.3.2. Ку-лихорадка	253
12.3.3. Респираторный хламидиоз	254
12.3.4. Орнитоз	255
12.3.5. Респираторный микоплазмоз	255
Вопросы для самоконтроля	256

Модуль 13. Возбудители раневой инфекции: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	258
13.1. Диагностика раневой инфекции, вызванной кислородорезистентными бактериями	259
13.2. Диагностика инфекций, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями	264
13.3. Диагностика клостридиальных инфекций	266
Вопросы для самоконтроля	269
Модуль 14. Возбудители зоонозных инфекций (чумы, туляремии, сибирской язвы): основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	270
14.1. Диагностика чумы	270
14.2. Диагностика туляремии	273
14.3. Диагностика сибирской язвы	275
14.4. Диагностика бруцеллеза.	280
Вопросы для самоконтроля	284
Модуль 15. Возбудители инфекций мочеполовой системы: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	285
15.1. Диагностика инфекций мочевыводящей системы	286
15.2. Диагностика бактериальных инфекций, передаваемых половым путем.	289
15.2.1. Диагностика сифилиса.	289
15.2.2. Диагностика гонореи	292
15.2.3. Диагностика мягкого шанкра	294
15.2.4. Лабораторная диагностика урогенитальных хламидиозов.	294
15.2.5. Диагностика микоплазмозов.	298
Вопросы для самоконтроля	300
Модуль 16. Возбудители бактериальных кровяных инфекций: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	301
16.1. Диагностика риккетсиозов	301
16.2. Диагностика боррелиозов	304
Вопросы для самоконтроля	308
Модуль 17. Возбудители респираторных вирусных инфекций: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	309
17.1. Диагностика гриппа	309
17.2. Диагностика краснухи	314
17.2.1. Лабораторная диагностика краснухи.	314

17.2.2. Лабораторная диагностика врожденной краснухи	316
17.2.3. Антенатальная диагностика краснухи	316
17.3. Диагностика натуральной оспы	317
Вопросы для самоконтроля	321
Модуль 18. Возбудители полиомиелита: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики.	322
18.1. Сбор проб для выделения вируса	323
18.2. Выделение полиовируса из клинических проб	323
18.3. Идентификация выделенного полиовируса	324
18.4. Сероконверсия.	325
Вопросы для самоконтроля	325
Модуль 19. Возбудители ВИЧ-инфекции: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики.	326
Вопросы для самоконтроля	332
Модуль 20. Возбудители вирусных гепатитов: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	333
20.1. Лабораторная диагностика вирусного гепатита В	334
20.2. Лабораторная диагностика вирусного гепатита D	336
20.3. Лабораторная диагностика вирусного гепатита С	337
20.4. Лабораторная диагностика вирусного гепатита А	337
20.5. Лабораторная диагностика вирусного гепатита Е	338
Вопросы для самоконтроля	338
Модуль 21. Возбудители нейровирусных инфекций: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	339
21.1. Вирус клещевого энцефалита: основные биологические свойства, принципы лабораторной диагностики	339
21.2. Бешенство.	343
Вопросы для самоконтроля	347
Прописи питательных сред	348
Ответы на вопросы для самоконтроля.	352
Список литературы	355
Предметный указатель	356

Модуль 7

ДЕЙСТВИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ. АНТИБИОТИКИ

Цели модуля

- **Знать:** механизмы действия на микроорганизмы факторов окружающей среды и антибактериальных средств.
- **Уметь:** определять степень чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии антибиотика в агар (методом бумажных дисков), проводить санитарно-бактериологическое исследование поверхности предметов и рук.
- **Владеть:** навыками условий применения методов стерилизации и дезинфекции по отношению к определенному объекту.

Жизнь микроорганизмов находится в тесной взаимосвязи с окружающей средой. Факторы внешней среды могут способствовать жизнедеятельности микроорганизмов и оказывать на них губительное действие, подавляя размножение и рост бактериальных клеток.

Из **физических факторов** наибольшее влияние на микроорганизмы оказывают температура, влажность, pH среды, а также излучение.

Температура. Жизнедеятельность каждого микроорганизма ограничена определенными температурными границами. К действию низких температур микроорганизмы, как правило, весьма устойчивы. При температуре 0 °С и ниже замедляются процессы жизнедеятельности и прекращается размножение. Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность при высушивании в вакууме при температуре –180 °С (лиофилизация) и при помещении в благоприятные условия способны размножаться.

При действии высоких температур происходят денатурация белков и повреждение структур клеток.

- Вегетативные формы бактерий погибают при температуре 60 °С в течение 30–60 мин, при 80–100 °С — через 1–2 мин.

- Споры бактерий гораздо более устойчивы к высоким температурам, выдерживая кипячение от 30 мин (возбудители сибирской язвы) до 6 ч (возбудители ботулизма). Для уничтожения спор необходима температура 120–180 °С.

Большинство вирусов быстро погибают под действием высоких температур. Однако вирус гепатита В выдерживает кипячение до 20 мин.

Влажность. Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов необходима вода. При недостатке влаги происходит обезвоживание цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, что приводит к прекращению размножения большинства микроорганизмов. Однако при помещении микроорганизмов во влажную среду они возобновляют свою жизнедеятельность. Особой устойчивостью к высушиванию обладают споры.

Влияние рН среды. Большинство бактерий обитает при реакции среды, близкой к 7,0. Вместе с тем существуют микроорганизмы, предпочитающие щелочную (возбудитель холеры) или кислую (ацидофильные бактерии) среду. При низких (<3,0) или высоких (>9,0) значениях рН микроорганизмы прекращают размножение и погибают. Отрицательное воздействие кислой и щелочной среды используют при применении дезинфицирующих и антисептических средств.

Излучение. Излучение оказывает повреждающее действие на микроорганизмы.

- **Ионизирующее излучение** (γ -лучи и энергия ускоренных электронов) разрушает нуклеиновые кислоты, белки и липиды и приводит к гибели бактериальных клетки. Наиболее чувствительны к этому виду излучений вегетативные формы. Возможно применение ионизирующего излучения для стерилизации инструментария, лабораторной посуды и др.
- **Неионизирующее излучение** — инфракрасное и ультрафиолетовое. Ультрафиолетовые лучи вызывают повреждения нуклеиновых кислот, а также инактивируют клеточные ферменты, что делает бактериальные клетки нежизнеспособными. Ультрафиолетовое облучение используют главным образом для обеззараживания помещений, воздуха, а также воды (бактерицидные лампы).

Химические факторы на микроорганизмы действуют неспецифически. Мишени, на которые воздействуют химические вещества, аналогичны тем, что находятся в клетках человека. В связи с этим химические вещества можно применять вне макроорганизма, их используют для уничтожения болезнетворных микроорганизмов во

внешней среде (дезинфектанты). Химиотерапевтические препараты используют для лечения, поскольку они обладают избирательностью действия.

7.1. ПОНЯТИЕ О СТЕРИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ

7.1.1. Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* — «бесплодный») — полное освобождение объектов от микроорганизмов и их спор. Существуют физические, химические и механические способы стерилизации. В лабораторной практике обычно применяют физические способы стерилизации. Выбор метода стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта, эффективности воздействия на микроорганизмы, возможности образования токсических продуктов в процессе стерилизации. Различают стерилизацию с использованием высоких температур и холодную стерилизацию.

Виды стерилизации

Стерилизация паром под давлением в автоклавах. Этот метод стерилизации основан на воздействии на стерилизуемые объекты насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного, при этом повышается температура кипения воды, а следовательно, и пара. Автоклав — герметически закрывающаяся стерилизационная камера, в которую помещают стерилизуемые объекты. В эту камеру поступает водяной пар из другой камеры, в которой кипит вода. Для определения давления, создающегося в стерилизационной камере, служит манометр. Стерилизацию в автоклаве проводят в следующих режимах:

- 0,5 атм — 110 °С;
- 1,0 атм — 120 °С;
- 1,5 атм — 127 °С;
- 2,0 атм — 132 °С.

Время воздействия — 15–30 мин. В автоклавах стерилизуют лабораторную посуду, питательные среды (не теряющие своих свойств при высокой температуре), операционное белье и перевязочный материал, инъекционные растворы, некоторые виды медицинского инструментария. **Дробная стерилизация текучим паром.** Этот способ применяют в тех случаях, когда стерилизуемый объект изменяется при температуре выше 110 °С. Нагревание до температуры 100 °С проводят 3 раза с интервалом 24 ч, в течение которого споры, не погибающие при температуре 100 °С,

переходят в вегетативные формы, которые уничтожаются при последующей обработке паром. Дробную стерилизацию при нагревании до температуры 60 °С в течение 5–6 дней называют *тиндализацией*.

Стерилизация горячим воздухом (сухожаровая стерилизация). В сухожаровых шкафах (печах Пастера) при температуре 160–180 °С стерилизуют лабораторную посуду, металлический инструментарий, другие термостойкие вещества.

Стерилизация ионизирующим излучением. Гамма-лучами и энергией ускоренных электронов стерилизуют объекты, разрушающиеся под действием высоких температур, — изделия из полимерных материалов (одноразовые шприцы, катетеры, системы для внутривенных вливаний), некоторые лекарственные средства (ЛС).

Стерилизация прокаливанием. На огне спиртовки при температуре до 400 °С стерилизуют бактериологические петли, иглы.

Химическую стерилизацию проводят с помощью токсичных газов — окиси этилена, формальдегида, глутарового альдегида. Эти вещества разрушают нуклеиновые кислоты и ферментные системы микроорганизмов и приводят их к гибели. Данный вид стерилизации применяют для обработки изделий из термолабильных материалов. Недостаток этого метода стерилизации заключается в том, что частицы токсических химических веществ остаются на обрабатываемых объектах.

Фильтрацию (механический способ стерилизации) применяют для обработки жидкостей, совершенно не выдерживающих нагревания (питательные среды, ЛС), а также для очистки бактериальных токсинов, бактериофагов от бактерий. Для этого используют мембранные фильтры, диаметр пор которых меньше размера бактериальных клеток.

Лучевая, химическая стерилизация и фильтрование — методы холодной стерилизации.

7.1.2. Дезинфекция

Дезинфекция (от лат. *des* — «отрицание», *infectio* — «инфекция») — комплекс мероприятий, направленных на уничтожение во внешней среде не всех микроорганизмов, а только определенных возбудителей инфекционных заболеваний.

Виды дезинфекции

Различают механические, физические и химические способы дезинфекции.

Механическая дезинфекция приводит к значительному уменьшению числа патогенных микроорганизмов, однако не позволяет достигнуть полного обеззараживания обрабатываемых объектов. Механическую дезинфекцию осуществляют путем встряхивания, влажной уборки, вентиляции помещений и др.

Физическую дезинфекцию осуществляют с помощью высокой температуры, ультрафиолетовых лучей.

Кипячением при температуре 100 °С дезинфицируют хирургические инструменты, иглы.

Пастеризация — уничтожение бесспорных форм микроорганизмов нагреванием до температуры 65–70 °С в течение 15–30 мин. Пастеризуют пищевые продукты (молоко, вино и др.) в целях освобождения от патогенных бесспорных форм микроорганизмов и микроорганизмов, вызывающих порчу продукта.

Ультрафиолетовое излучение применяют для обеззараживания воздуха в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях.

Химическая дезинфекция — применение сильнодействующих химических веществ, называемых дезинфектантами, которые действуют неизбирательно. С их помощью обеззараживают выделения больного (гной, кал, мокроту и др.), лабораторную посуду перед дальнейшей обработкой, рабочее место после окончания работы с заразным материалом, т.е. вне живого организма.

Различают дезинфекцию:

- **текущую** (в течение рабочего дня, всего времени пребывания больного в помещении);
- **заключительную** (проводимую по окончании работы, после удаления больного из данного помещения).

7.2. ПОНЯТИЕ ОБ АСЕПТИКЕ И АНТИСЕПТИКЕ. МЕТОДЫ АСЕПТИКИ И АНТИСЕПТИКИ

Асептика — система профилактических мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов и их спор в рану, ткани больного при хирургических операциях, перевязках, эндоскопических манипуляциях и др.

Асептика включает:

- стерилизацию инструментов, материалов, соприкасающихся с раной;
- специальную обработку рук медицинского персонала;

- соблюдение специальных правил и приемов работы при проведении операций и др.;
- осуществление специальных санитарно-гигиенических мероприятий в лечебных учреждениях.

Антисептика — комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, а также на предупреждение или ликвидацию инфекционного процесса. Для антисептических мероприятий применяют, как правило, химические антибактериальные средства неспецифического действия. Различают механическую, физическую, химическую и биологическую антисептику.

- **Механическая антисептика** — механическое удаление инфицированных и нежизнеспособных тканей, хирургическая обработка ран.
- К **физическим методам антисептики** относят применение гигроскопических повязок, дренажей.
- **Биологическая антисептика** — применение антибиотиков, бактериофагов, протеолитических ферментов.
- **Химическую антисептику** проводят с помощью специальных антисептических средств, обладающих микробоцидным или микростатическим действием. Эти средства наносят на кожу, слизистые оболочки, раневую поверхность для предупреждения развития местных инфекционных поражений, а также применяют для обработки инструментов, оборудования, помещений и др. Антисептики действуют на микроорганизмы неизбирательно, их применяют на поверхности живых тканей, так как из-за токсичности их нельзя применять системно (внутри, парентерально).
 - **Микробоцидные** антисептики вызывают гибель бактерий (бактерицидные), грибов (фунгицидные) и других форм микроорганизмов.
 - **Микростатические** антисептики полностью или частично приостанавливают рост бактериальных клеток.

Антисептические препараты должны обладать высокой антибактериальной активностью, быть нетоксичными для макроорганизма, удобны в применении, растворимы в воде.

По **химической структуре** выделяют следующие группы антисептиков.

- **Поверхностно-активные вещества** (ПАВ) — мыла, катионные (дегмин), анионные (сульфанол) ПАВ, гуанидины (хлоргексидин). ПАВ вызывают необратимые повреждения клеточной стенки ми-

кроорганизмов, изменение проницаемости мембран. Используют для обработки помещений, а также рук персонала.

- **Спирты** — 70% этиловый*, 70% изопропиловый — вызывают коагуляцию белков бактериальной клетки. Применяют для обработки рук, инструментария.
- **Окислители** — пероксид водорода, перманганат калия — выделяют атомарный кислород, вызывающий нарушения ферментативных процессов в клетках.
- **Хлорсодержащие соединения** — хлорамин, гипохлорит натрия — выделяют атомарный хлор, вызывающий повреждения белков.
- **Йодосодержащие препараты** — 3–5% спиртовой раствор йода, йодофоры (йодиол*, йодонат*) — вызывают коагуляцию белков бактериальной клетки, применяют для обработки операционного поля, мелких травм, лечения поверхностных повреждений кожи и слизистых оболочек.
- **Препараты серебра** — протаргол*, колларгол* — также вызывают коагуляцию клеточных белков и применяют для обработки слизистых оболочек, раневых поверхностей.
- **Альдегиды** (формалин*), **фенолы** (лизол) действуют на ферментные системы бактериальной клетки и вызывают денатурацию белков, весьма токсичны, применяют в настоящее время редко.

7.3. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СМЫВОВ С РУК ПЕРСОНАЛА И ПОВЕРХНОСТЕЙ ПРЕДМЕТОВ

Основа санитарно-микробиологического метода исследования смывов с рук персонала и поверхности предметов — обнаружение бактерий группы кишечной палочки, показателей фекального загрязнения. Также определяют общее количество микроорганизмов (бактериальную обсемененность) в 1 см² исследуемой площади.

При взятии смыва пользуются стерильным ватным тампоном, смоченным в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. Смывы с поверхностей предметов делают с помощью трафаретов из проволоки, имеющих площадь 25 см². Обычно смыв берут с площади 100 см², накладывая трафарет на четыре различных участка исследуемой поверхности.

При исследовании смыва с рук тщательно протирают тампоном тыл кисти, ладонную поверхность, межпальцевые промежутки и подногтевые пространства сначала с левой, а затем с правой руки.

7.3.1. Определение общего количества микроорганизмов

Проводят смыв тампоном с поверхности площадью 25 см². Тампон опускают с пробирку с 2 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида и тщательно ополаскивают. Добавляют 8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, в итоге получая разведение 1:10, из которого готовят разведения 1:100 и 1:1000. Затем по 1 мл каждого разведения вносят на стерильную чашку Петри и заливают 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45 °С агара. Общее количество бактерий в 1 см² поверхности предмета определяют по формуле:

$$n \times 10 / s,$$

где n — количество бактерий в 1 мл исходного смыва; 10 — количество изотонического раствора натрия хлорида, используемого для сорбции микроорганизмов с тампона, мл; s — площадь, с которой был сделан смыв.

7.3.2. Определение количества бактерий группы кишечной палочки

Количество бактерий группы кишечной палочки определяют трехэтапным бродильным методом путем посева смыва в среду Кесслера, подрачивая в течение суток при температуре 37 °С. При брожении в среде Кесслера или появлении мути делают пересев на среду Эндо. Подозрительные колонии, выросшие на среде Эндо, подвергают идентификации.

7.3.3. Определение эффективности дезинфекции

На исследуемую поверхность накладывают трафарет площадью 100 см². Проводят смыв с поверхности и посев. Затем трафарет накладывают на поверхность рядом с местом проведения смыва и обрабатывают дезинфицирующим веществом. Дезинфектанту дают высохнуть, после чего проводят смыв с обработанного дезинфектантом участка и высевают (как указано в разделе 7.3.1). Посевы инкубируют при температуре 37 °С. По окончании инкубации подсчитывают количество колоний, выросших на необработанном и обработанных дезинфектантами участках поверхности. Результаты вносят в таблицу (табл. 7.1).

Таблица 7.1. Форма таблицы для внесения результатов определения эффективности дезинфекции

Количество бактерий до обработки дезинфектантом	Количество бактерий после обработки дезинфектантом

7.4. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ХИМИОПРЕПАРАТЫ

7.4.1. Химиотерапия инфекционных заболеваний

Химиотерапия инфекционных заболеваний — лечение бактериальных, вирусных, грибковых, протозойных инфекций с помощью химиотерапевтических препаратов, которые избирательно подавляют жизнедеятельность соответствующих инфекционных агентов в организме человека.

Избирательность действия химиотерапевтических препаратов заключается в губительном воздействии только на микроорганизмы, не затрагивая (или затрагивая минимально) клетки макроорганизма.

Антибактериальные химиотерапевтические препараты разделяют на:

- **антибиотики**, которые получены на основе продуктов метаболизма микроорганизмов и избирательно подавляют жизнедеятельность других микроорганизмов, а также некоторых опухолей;
- **синтетические антибактериальные препараты** разного химического строения, не встречающиеся в живой природе, сходные с антибиотиками по антибактериальной активности.

Химиопрепараты могут оказывать на микроорганизмы микробицидное и микробостатическое действие:

- **микробицидные** препараты вызывают гибель бактериальных клеток;
- **микробостатические** препараты подавляют или задерживают их рост или размножение бактериальных клеток.

Для каждого препарата характерен спектр действия. По спектру действия различают антибактериальные, противогрибковые, противопротозойные, противовирусные препараты, а также противоопухолевые антибиотики. Среди них выделяют препараты:

- **узкого спектра** — действуют на небольшое количество разновидностей только грамположительных или грамотрицательных бактерий;

- **широкого спектра** — активны в отношении различных групп микроорганизмов.

Механизмы действия химиотерапевтических препаратов

Избирательность действия антибактериальных препаратов объясняется тем, что в макроорганизме отсутствуют мишени, на которые воздействуют эти ЛС. Таким образом, сохраняется жизнеспособность клеток человека, и антибактериальный препарат действует не на все, а на определенные микроорганизмы. При этом ингибируются жизненно важные структуры и процессы в бактериальной клетке. По механизму действия различают следующие группы химиотерапевтических препаратов.

- **Ингибиторы синтеза клеточной стенки бактерий** — β -лактамы, гликопептиды, липопептиды.
- **Ингибиторы синтеза белка на рибосомах бактерий.** Рибосомы бактериальных клеток отличаются от рибосом человека, что обеспечивает избирательность действия этой группы препаратов. К ним относят аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, оксалиндиноны, левомицетин[▲].
- **Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны** — полиены, полипептиды, липопептиды.
- **Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот** — рифамицины, аминохинолины.

Синтетические химиотерапевтические препараты

Среди синтетических химиотерапевтических препаратов выделяют следующие группы.

- **Сульфаниламиды** — сульфадиметоксин, сульфадимидин и другие, а также комбинированные с триметопримом [ко-тримоксазол (бисептол[▲])] — препараты широкого спектра действия. По механизму действия эти ЛС — антиметаболиты, т.е. вещества, имеющие сходную с нормальными метаболитами структуру. Антиметаболиты могут ошибочно включаться в структуру микроорганизмов, в различные метаболические процессы, что приводит к угнетению роста и гибели клетки. Под действием сульфаниламидов нарушается ДНК, что приводит к подавлению роста и размножения бактериальной клетки.
- **Нитрофураны** — фурацилин[▲], фуразолидон — препараты широкого спектра действия. Механизм действия этих препаратов — наруше-

ние энергетических процессов, а также повреждение ДНК бактериальной клетки.

- **Оксихинолины** — нитроксолин (5-НОК^{*}) и другие — препараты широкого антибактериального и антипротозойного спектра действия. Механизм действия — нарушение процессов клеточного дыхания.
- **Аминохинолины** — хлорохин и другие — антипротозойные препараты. Механизм действия — нарушение процессов синтеза ДНК.
- **Хинолоны** — налидиксиновая кислота (невиграмон^{*}), ципрофлоксацин, левофлоксацин и другие — большая группа, включающая препараты, действующие на грамотрицательные бактерии, а также препараты широкого спектра действия (только антибактериальные). Механизм антибактериального действия хинолонов — нарушение действия фермента ДНК-гиразы, формирующей суперспираль нитей ДНК, что приводит к гибели бактериальных клеток.
- **Производные азолов**
 - **Нитроимидазолы** — метронидазол (трихопол^{*}) и другие — препараты, обладающие антипротозойным действием, а также активностью в отношении анаэробных бактерий. Механизм действия — нарушение метаболизма клеток и структуры ДНК.
 - **Производные имидазола** (клотримазол и др.) и **триазола** (флуконазол) — противогрибковые препараты. Механизм действия — нарушение клеточной мембраны, что приводит к гибели грибковой клетки.
- **Аллиламины**. Ламизил^{*} — противогрибковый препарат. Механизм действия — нарушение синтеза клеточной мембраны грибов.
- **Оксазалидиноны**. Линезолид — препарат широкого спектра действия. Механизм действия — нарушение синтеза белков на рибосомах.

По **химической структуре** антибиотики подразделяют на следующие группы.

- **β -Лактамные**, в химической структуре которых имеется β -лактамное кольцо. К ним относят пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы. Эти группы химиотерапевтических препаратов действуют на синтез клеточной стенки бактерий.
- **Тетрациклины**, в химической структуре которых есть четыре бензольных кольца (тетрациклин, доксициклин). Механизм действия связан с нарушением синтеза белка на рибосомах бактерий.
- **Макролиды** и **азолиды** (эритромицин, азитромицин). Эти препараты ингибируют синтез белка на рибосомах.

- **Аминогликозиды** (стрептомицин, гентамицин) — ингибиторы синтеза белка на рибосомах.
- **Хлорамфеникол** (левомицетин*) — нарушает синтез белка на рибосомах.
- **Полиены** (нистатин, амфотерицин В) — повреждают клеточные мембраны.
- **Пептидные** — нарушают функции цитоплазматической мембраны микроорганизмов:
 - *полипептиды* (полимиксин);
 - *гликопептиды* (ванкомицин);
 - *липопептиды* (даптомицин).
- **Рифамицины** (рифампицин). Механизм действия связан с блокированием синтеза нуклеиновых кислот.
- **Линкозамиды** (клиндамицин) — нарушают синтез нуклеиновых кислот бактериальной клетки.

Противогрибковые препараты

Противогрибковые препараты (антимикотики) — достаточно обширный класс разнообразных химических соединений природного и синтетического происхождения, обладающих специфической активностью в отношении патогенных грибов. По химическому строению эти препараты включают следующие группы:

- полиены (нистатин, амфотерицин В);
- азолы (флуконазол);
- аллиламины (тербинафин);
- препараты разных групп.

Механизм действия этих препаратов связан с нарушением синтеза особого вещества грибковой мембраны — эргостерола, что ведет к гибели клетки, а также нарушением синтеза ДНК (гризеофульвин). Антимикотики — высокотоксичные ЛС, поэтому многие из них рекомендуют только для наружного применения.

Противопротозойные препараты

Противопротозойные препараты — различные по химической структуре соединения, применяемые при инфекциях, вызванных простейшими: малярийными плазмодиями, лямблиями, амебами и др. Эти ЛС (хлорохин, хинин, сульфадоксин и др.) блокируют синтез нуклеиновых кислот, а также нарушают синтез фолиевой кислоты плазмодия, что ведет к гибели возбудителей.

Препараты, применяемые при других протозойных инфекциях (па-ромицин, меглюмин и др.), нарушают синтез белка на рибосомах.

Противовирусные препараты

Для лечения вирусных инфекций применяют противовирусные пре-параты различных групп, которые подавляют репродукцию вирусов на различных этапах; при этом не должны повреждаться клетки макро-организма. Противовирусные препараты различаются по химической природе и механизму воздействия на вирусы:

- препараты, ингибирующие проникновение вируса в клетки и его депротенинизацию [римантадин (ремантадин[▲])];
- препараты, ингибирующие репликацию вирусных нуклеиновых кислот (ацикловир, зидовудин);
- препараты, ингибирующие процессы формирования и выход из клетки новых вирионов (метисазон, тамифлю[▲]);
- препараты, действующие на внеклеточные формы вирусов (оксо-лин[▲]).

Кроме того, в противовирусной фармакотерапии широко применя-ют интерфероны, которые блокируют в клетке репродукцию вируса. Также нашли применение индукторы интерферона — группа высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, стиму-лирующих продукцию эндогенных интерферонов (амиксин[▲]).

7.4.2. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Современные методы определения чувствительности микроорга-низмов к антибактериальным препаратам (АБП) разделяют на методы серийных разведений и диффузионные методы.

- **Методы серийных разведений** основаны на определении основного количественного показателя, характеризующего биологическую активность АБП, величины его минимальной подавляющей кон-центрации (МПК), т.е. минимальной концентрации, подавляю-щей рост исследуемого микроорганизма. Для этого определенные концентрации АБП вносят в питательную среду, в которую затем засевают исследуемый микроорганизм. После инкубации оцени-вают наличие или отсутствие видимого роста. В зависимости от типа используемой питательной среды различают методы серий-ных разведений в агаре или бульоне.

- **Диффузионные методы** определения чувствительности основаны на диффузии АБП в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК. В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и E-тест.
 - В **диско-диффузионном методе** в качестве носителя АБП используют бумажный диск, пропитанный антибиотиком. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. Величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, в результате микроорганизм относят к одной из категорий чувствительности: чувствительный, промежуточный или резистентный.
 - **E-тест** представляет собой узкую полимерную полоску, на которую нанесен градиент АБП (от минимальных до максимальных) (рис. 7.1). Подавление роста микроорганизмов вокруг полоски E-теста происходит в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из полоски, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста плотно подходит к полоске, на которой нанесены концентрации АБП.

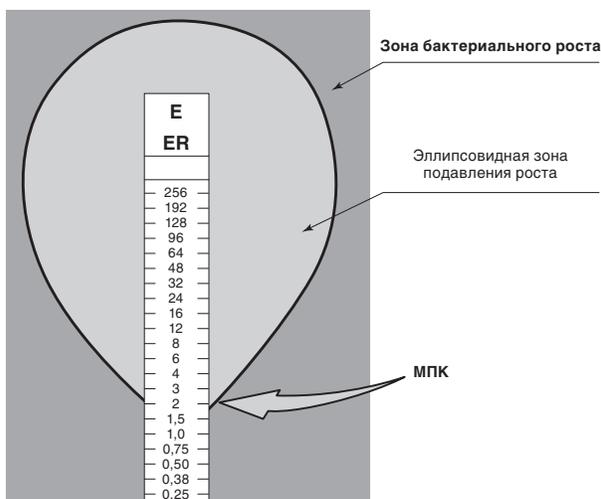


Рис. 7.1. E-тест

Постановка диско-диффузионного метода. Для оценки чувствительности необходимо использовать только специально предназначенные для этой цели среды (агар Мюллера–Хинтон).

- Перед разливом расплавленного агара чашки Петри помещают на горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Расплавленный агар разливают в чашки в таком количестве, чтобы величина его слоя в чашке составляла 4–5 мм (на чашку диаметром 10 см требуется 25 мл агара). Перед посевом чашки подсушивают в термостате.
- Посевной материал должен представлять бактериальную суспензию с концентрацией бактерий, равной $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, оптическая плотность данной концентрации соответствует стандарту мутности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Для приготовления такой суспензии отбирают несколько однотипных, четко изолированных колоний исследуемой культуры, выращенной на неселективной питательной среде. Петлей переносят незначительное количество материала с верхушки колонии в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность суспензии до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Приготовленную суспензию можно использовать в течение 15 мин после приготовления.
- Наиболее удобный способ посева — использование стерильных ватных тампонов. Тампон погружают в приготовленную суспензию исследуемого микроорганизма, избыток суспензии удаляют, отжимая тампон о стенку пробирки. Посев проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° .
- Не позднее 15 мин после посева на поверхность питательной среды наносят с помощью стерильного пинцета диски с АБП. Расстояние диска от края чашки и между дисками должно составлять 15–20 мм. На одну чашку помещают не более 6 дисков.
- После аппликации дисков чашку Петри помещают в термостат дном вверх. Инкубацию проводят при температуре 35°C в течение 18–24 ч.
- По окончании инкубации измеряют диаметр зоны ингибиции роста, выражая его в миллиметрах.
- Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный, устойчивый.
- Для интерпретации результатов на основании сопоставления результатов исследования (диаметра зоны ингибиции роста) с

пограничными значениями этого параметра, отделяющего чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых, используют специальные таблицы (табл. 7.2).

Таблица 7.2. Оценка степени чувствительности бактериальной культуры к антибиотикам

Антибактериальные препараты в диске	Диаметр зон для культур, мм		
	устойчивых (R)	промежуточных (I)	чувствительных (S)
Ампициллин	≤9	10–13	≥14
Карбенициллин 25 мкг	≤14	15–18	≥19
Цефазолин	≤14	15–18	≥19
Цефалотин	≤14	15–18	≥19
Цефуроксим	≤14	15–18	≥19
Цефотаксим	≤14	15–20	≥21
Цефтриаксон	≤14	15–20	≥21
Цефтазидим	≤14	15–17	≥18
Цефалексин	≤14	15–18	≥19
Тетрациклин	≤16	17–21	≥22
Хлорамфеникол (левомецетин*)	≤15	16–18	≥19
Канамицин	≤14	15–18	≥19
Гентамицин	≤15	–	≥16
Амикацин	≤14	15–16	≥17
Нетилмицин	≤12	13–14	≥15
Стрептомицин	≤16	17–19	≥20
Полимиксин	≤11	12–14	≥15
Нитрофурантоин (фурадонин*)	≤15	16–18	≥19
Офлоксацин	≤12	13–16	≥17
Ципрофлоксацин	≤15	16–20	≥21

Результаты проведенной работы по определению степени чувствительности к антибиотикам выделенной чистой культуры заносят в таблицу (табл. 7.3).

Таблица 7.3. Форма таблицы для внесения результатов чувствительности выделенной чистой культуры бактерий к антибиотикам

Антибиотик	Диаметр зоны ингибиции роста	Степень чувствительности

Вопросы для самоконтроля

1. Полуколичественный метод определения степени чувствительности бактерий к антибиотикам — ...
2. Оценку степени чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков проводят по ...
3. Среду Кесслера используют для определения ...
4. Пастеризация — тепловой метод ...
5. Для стерилизации питательных сред, содержащих компоненты, разрушающиеся при температуре выше 110 °С, используют ...