**Занятие 1**

Медицинская микробиология и иммунология, ее цель и задачи, этапы развития. Систематика и классификация микроорганизмов. Морфология и классификация бактерий. Микробиологическая лаборатория, режим работы в ней. Методы микробиологического исследования. Микроскопический метод исследования. Микроскопы. Правила работы с иммерсионным объективом. Приготовление мазков из патологического материала и культуры микробов. Простой метод окраски.

**Предмет микробиология.** Микробиология - (греч. mikros-малый, лат. bios-жизнь, logos-наука) -это наука, изучающая закономерности жизнедеятельности микроорганизмов, невидимых невооружённым глазом.

Общая микробиология – изучает морфологию (форму и строение), физиологию (питание, метаболизм, дыхание и размножение), генетику (наследственность и изменчивость) микроорганизмов.

**Частная микробиология** – изучает особенности отдельных микроорганизмов. В связи с этим она делится на такие разделы, как бактериология, вирусология, микология, протозоология.

Объектами исследования микробиологии являются прокариоты (бактерии, спирохеты, риккетсии, хламидии, микоплазмы, актиномицеты), эукариоты (микроскопические грибы и простейшие), имеющие клеточное строение, а также вирусы, вироиды и прионы, не имеющие клеточного строения.

**Классификация прокариот.** Современная классификация прокариот была предложена американским бактериологом в 1923 году. Она регулярно обновляется Международным Комитетом по Систематике бактерий. В последней 9-ой публикации прокариоты по строению клеточной стенки подразделяются на четыре категории. Каждая категория состоит из многочисленных групп.

**Современная классификация прокариот по Берджи**

* Грамотрицательные, имеющие клеточную стенку эубактерии
* Грамположительные, имеющие клеточную стенку эубактерии
* Эубактерии, не имеющие клеточную стенку
* Архебактерии

В современной классификации прокариот имеется

* 24 типа, 33 класса
* 1.Эубактерии с тонкой Грам-отрицательной клеточной стенкой - Gracilicutes 16 групп
* 2.Эубактерии с толстой Грам-положительной клеточной стенкой– Firmicutes 13 групп
* 3.Эубактерии, не имеющие клеточной стенки – микоплазмы -Tenericutes класс Mollicutes – 1 группа
* 4.У архебактерий клеточная стенка и пептидогликан отсутствуют. Не вызывают болезней у человека. Включают 5 групп

ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ

|  |  |
| --- | --- |
| Царство | Prokaryotae |
| Тип | Gracilicutes |
| Класс | Scotobacteria |
| Порядок | Eubacteriales |
| Семейство | Enterobacteriaceae |
| Род | Escherichia |
| Вид | Coli |
| Подвид | Escherichia coli O157:H7 |

Считается, что для таксонов высокого ранга больше подходит название не «Отдел», а «Тип» (Phylum).

Идентификация микроорганизмов:

* морфологическая
* тинкториальная
* культуральная
* биохимическая
* антигенная
* По процентному соотношению Г+ Ц
* По гибридизации ДНК,
* Секвенирование,
* По действию фермента рестриктазы.
* По полиморфизму в цепочке ДНК
* Консерватизм рибосомы 16S
* Гены, кодирующие RNT и рибосомные белки

**Номенклатура микроорганизмов.** Применяется номенклатура микроорганизмов, созданная К.Линнеем для обозначения их названий (кроме вирусов). В этом случае первое слово обозначает род, оно пишется с заглавной буквы, второе слово означает вид и пишется с маленькой буквы. Например, Mycobacterium tuberculosis, Francisella tularensis, Staphylococcus aureus.

* Вид – это микроорганизмы, имеющие общее происхождение и похожие морфо-биологические свойства.
* Штамм – это чистая культура одного вида микроорганизмов, полученных из различных (или одного) источников в разное время.
* Клон – культура, выращенная из одной микробной клетки.
* Колония – это скопление (популяция), образуемая бактериями на твёрдых питательных средах.
* Чистая культура микроба– имеется ввиду популяция, образованная одним видом микроорганизма на плотной питательной среде.

**Внутривидовые варианты**

* Морфовар – вариант, отличающийся от основного вида по морфологическим свойствам.
* биовар – отличие по нескольким биологическим свойствам
* серовар – отличие по антигенной структуре
* фаговар – по чувствительности к определённому фагу
* хемовар – отличие по биохимическим свойствам
* резистовар – отличие по чувствительности к антимикробным препаратам

Роль микробиологической лаборатории в диагностике заболеваний. Исследования микробиологических лабораторий играют важную роль в ранней и точной диагностике инфекционных заболеваний. Микробиологические лаборатории функционируют в:

* Центрах гигиены и эпидемиологии
* поликлиниках
* больницах и
* научно-исследовательских институтах

**Структура микробиологической лаборатории.**

Микробиологическая лаборатория состоит из следующих помещений:

1. Комната отбора проб для исследования

2. Препараторская – для приготовления питательных сред, материалов, красителей для проведения исследования

3. Автоклавная – для размещения стерилизационного оборудования (автоклав, паровой стерилизатор)

4. Моечная – для дезинфекции и мытья чашек Петри, пробирок, колб, использованных пипеток.

5. Комната для проведения исследований – для исследования проб пациентов – гноя, мокроты, крови, мочи, кала, спинномозговой жидкости различными методами

6. Вивариум– для содержания экспериментальных животных

**Приборы, применяемые в микробиологическрой лаборатории**

1. Микроскопы
2. Автоклав
3. Паровой стерилизатор
4. Термостат
5. Водяная баня
6. Холодильный шкаф
7. Центрифуга

**Режим работы микробиологической лаборатории.**

В микробиологических лабораториях лечебных учреждений, работающих с патогенными микроорганизмами для предупреждения повторного инфицирования и распространения микробов необходимо соблюдать следующие правила (т.н. режим работы лаборатории):

1. В лабораторию нельзя заходить без халата и колпака. В случае необходимости нужно использовать маску.
2. Нельзя заходить в лабораторию в верхней одежде, много передвигаться и много разговаривать.
3. В лаборатории нельзя кушать, пить чай и курить
4. В случае попадания патологического материала на халат, стол или на пол, необходимо немедленно обработать дезинфицирующим средством.
5. Использованные пипетки, шпатели, пробирки, чашки Петри необходимо замочить в дезинфицирующем растворе.
6. В конце работы рабочий стол необходимо убрать, дезинфицировать, засеянные чашки Петри поместить в термостат, музейные штаммы и неиспользованные питательные среды поместить в холодильник.
7. Предметный столик микроскопа и объектив с увеличением 90 необходимо очистить от масла и положить под объектив кусочек марли. Для предотвращения попадания пыли микроскоп необходимо накрывать специальным покрытием.
8. По окончании работы нужно протереть руки салфеткой, пропитанной дезинфицирующим раствором и вымыть с мылом.

**При проведении микробиологических лабораторных исследований необходимо соблюдать следующие правила:**

1. Работать с инфицированным материалом только с помощью инструментов (пинцет, петля и др.)
2. Прикасаться к культуре микроба в чашке Петри и конденсату запрещается
3. До начала работы необходимо проверить целость стеклянной посуды, проводимость игл, надёжность шприцов.
4. Во время посева материала на чашку Петри, колбу, флаконы нанести дату и номер анализа.
5. На пробирку, чашку Петри материал переносится над пламенем горелки, щпатель, края пробирки нужно провести через пламя, а петлю прокалить в пламени.
6. Во время работы чашки Петри должны быть в кювете либо на подносе, а пробирки- в штативе.
7. Суспензия патогенных микроорганизмов нужно переносить пипеткой Пастера с резиновым баллончиком.
8. Пипетировать ртом и переносить в посуду рядом с другой посудой запрещается
9. По окончанию работы оставлять на столе фиксированные препараты, чашки Петри, пробирки, другую зараженную посуду запрещается.

**Методы микробиологического исследования:**

1.Микроскопический метод

2.Культуральный (бактериологический, вирусологический, микологический, паразитологический) метод

3. Биологический метод

4. Иммунологический метод

- серологический

- кожно-аллергические пробы

5. Молекулярно-генетический метод

**Метод микроскопии.** С помощью микроскопического метода в исследуемом материале определяют наличие микроорганизмов и их морфологию.Поскольку многие микроорганизмы невозможно определить на основании морфологии и тинкториальных свойств, поэтому микроскопический метод считается приблизительным диагностическим методом.

**Культуральный (бактериологический) метод.** При проведении исследования этим методом производится посев патологического материала на соответствующие питательные среды, инкубация, получение «чистой культуры» и идентификация. Будучи «золотым стандартом» микробиологической диагностики, метод позволяет правильно определить возбудителя.

**Биологический и экспериментальный метод.** Производится заражение лабораторных животных патологическим материалом**.** Биологический метод применяют, если невозможно получить чистую культуру бактериологическим методом.Изучается патогенность, вирулентность и токсигенность микроба. Проводятся экспериментальные исследования новых лекарственных препаратов.

**Иммунологический метод.** Серологический метод – в сыворотке крови определяют антигены возбудителя, либо антитела против возбудителя, а так же с помощью известной иммунной сыворотки определяют вид и серовар неизвестного микроба (серологическая идентификация).

**Молекулярно-генетический метод**

* Полимеразная цепная реакция. Основана на принципе приумножения (амплификации) и определения нуклеиновой кислоты возбудителя в патологическом материале либо в чистой культуре.
* ДНК и молекулярная гибридизация РНК. Основаны на определении геномных фрагментов, характерных для возбудителя.

Основное преимущество молекулярно-генетического метода – высокая чувствительность и специфичность..

**Микроскопы**. В микробиологических лабораториях для исследования микроорганизмов применяется микроскоп. Микроскоп (lat. mikro — малый,  skopid — смотрю) — служит для увеличения изображения объекта, в том числе измерения невидимых частей объекта. Современный биологический микроскоп – это сложный оптический прибор, который помогает изучить объекты, проводящие световые лучи в светлом и тёмном поле. Для изучения формы, строения, размеров и других свойств бактерий размером более 0,2 мкм применяется световой микроскоп.

Предметный столик. Предметный столик относится к механической части микроскопа. Это часть микроскопа, на которую помещается препарат для исследования. На нём располагаются зажимы. Эти зажимы эластичные, они прижимают исследуемый предмет к предметному столику.

Тубус

* Между окуляром и револьвером находиться тубус, или смотровая трубка.
* Тубус несёт направляю-щую функцию. Другими словами, он направляет лучи от изображения до глаза.
* Расстояние между объективом и окуляром называется оптической длиной тубуса.

Окуляр

* Слово окуляр образовано от слова «окулус» , что означает «глаз». Окуляр расположен в верхней части тубуса. Окуляр выполняет функцию линзы, является одной из двух частей, увеличивающих изображение . Для изучения препарата под микроскопом прислоняемся глазами к окуляру. Окуляр состоит из двух линз и придерживающей их рамки. Линза, расположенная дальше от тубуса, называется «верхней» или «глазной» линзой, а другая- «нижней» линзой.

**Типы объективов.** Объектив состоит из двояковыпуклых линз и относится к оптической части микроскопа

- фронтальная линза находится спереди

- корректирующая линза находится сверху-сзади

**Биологические микроскопы**

(x8, 10, 40, 60) - сухой

(x90, x100) – снабжен иммерсионным объективом

**Увеличительная способность микроскопа**

* Увеличение микроскопа равно произведению увеличений объектива и окуляра

Объектив X окуляр = полное увеличение

Если объектив увеличен в 100 раз, а окуляра в 10 раз, общее увеличение микроскопа будет 100x10 = 1000 раз.Биологические световые микроскопы позволяют увеличить объект до 2000-3000 раз.

**Темнопольный микроскоп.** У биологического микроскопа вместо конденсора имеется паралоид -или кордиоид-конденсор. У верхней линзы края закруглённые и бесцветные, а середина чёрного цвета. Специальный конденсор создаёт тёмное поле микроскопии, на котором видны светящиеся исследуемые частицы. Эти микроскопы позволяют увидеть не поддающиеся окраске такие микробы, как спирохеты, без окрашивания

**Фазово-контрастный микроскоп.** Лучи света, проходящие через область высокой оптической плотности любого объекта, отстают от других областей по фазе. Такие области не видны под микроскопом, потому что они прозрачны. Поэтому, с помощью устройства контрастной фазы для получения контрастного изображения фазовая изменчивость световых лучей, проходящих через объект, преобразуется в амплитудную изменчивость, и прозрачные объекты видны под микроскопом. Устройство преобразует длину волны в длину фазы.Это сделано путем размещения специальной диафрагмы на световом микроскопе и дифракционной пластинки перед ним.Органеллы освещаются по-разному и могут быть легко идентифицированы под микроскопом**.** Позволяет изучать структурные элементы бактерий, их размножение, споруляцию, действие химических веществ.

**Люминeсцентный(флюоресцентный ) микроскоп.** Люминисценция (lat. lumen – означает свет) основана на превращении поглощённой потенциальной энергии в световую и свечении при охлаждении. Применяется УФИ. Поскольку эти лучи невидимы для человеческого глаза, препарат сначала окрашивают флюоресцентными красителями (акридин, аурамин, нейтральный красный, флюоресцеин и др.)**.**Микроорганизмы видны как флюоресцирующие частицы в тёмном поле.

**Электронный микроскоп.** В электронном микроскопе вместо световых лучей используется поток электронов.Электронный микроскоп позволяет увидеть очень мелкие объекты, такие как структурные элементы вирусов, бактерий и других микроорганизмов, макромолекулы и другие субмикроскопические частицы**.** Длина волны электронного излучения примерно 0,005 nm, в 200000-300000 короче длины волны светового излучения. Так как длина волны электронного излучения короче длины волны света, поэтому полезное увеличение достигает самого верхнего предела и обеспечивает увеличение в 1000 больше (х1 000 000), чем световой микроскоп.

**Сканирующий электронный микроскоп.** Сканирующий электронный микроскоп (ing. Scanning Electron Microscope - SEM) – это прибор из класса электронные микроскопы.Это прибор для изображения крупных объектов (до 0,4 нанометра), поверхности объекта , а так же состава и строения поверхностного слоя, и для получения информации о других особенностях. Основан на принципе взаимодействия электронного излучения и исследуемого объекта. Полученную информацию компьютер выдаёт в виде картинки.

**Правила работы с иммерсионным объективом**

* Для микробиологических исследований, в основном применяется влажная (иммерсионная) (immersio - lat. погружение) система с высокой степенью увеличения (в 90раз).
* Во время микроскопии лучи, попадающие на препарат, проходят через стекло и попадают в воздух, некоторые из них рассеиваются и не падают на линзу, снижая способность к изображению. Поэтому для предотвращения рассеивания лучей используется иммерсионное масло (показатель преломления -1,52), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.
* Иммерсионное масло заполняет промежуток между линзой и препара- том, все лучи, проходящие через препарат, попадают в объектив, усиливая увеличение микроскопа
* Объективы, в зависимости от сухого и влажного способа (масло, иммерсия - immersio (lat.заморозить)) делятся на две системы.
* Иммерсионный объектив опускают в каплю масла.
* Коэффициент преломления иммерсионного масла примерно равен коэффициенту преломления стекла -1,52, поэтому все лучи, проходящие через препарат не рассеиваются, а попадают в объектив.

**Микроскопический метод исследования.** Микроскопический метод –основывается на распознавании возбудителей по их морфологическим признакам. Метод позволяет выявлять возбудителей в патологических материалах, полученных от больных, в нативных или окрашенных мазках путем их микроскопирования. В нативных или окрашенных мазках, приготовленных из микробных культур морфологические свойства возбудителей изучают с помощью микроскопирования (морфологическая идентификация)

**Этапы приготовления мазка:**

* Обезжиривание предметного стекла. Новое предметное стекло кипятят в 1% растворе соды, промывают водой, выдерживают в слабом растворе хлорной кислоты и вновь промывают. Использованные предметные стекла выдерживают два часа в концентрированном растворе серной кислоты или водном растворе бихромата калия (100:50:1000), промывают водой, кипятят в растворе соды, промывают водой и протирают. Обезжиривание возможно с использованием сухого мыла и дальнейшим протиранием маревой салфеткой. При приготовлении мазка для обезжиривания предметного стекла используют пламя горелки
* Приготовление мазка из гноя и мокроты. Для приготовления мазка из гноя и мокроты обезжиривается оба предметных стекла. На одно стекло петлёй наносится одна капля материала и накрывается сверху вторым предметным стеклом, слегка придавливается, ткани и материал раздавливаются и мазок готовится движением в обратном направлении. Из крови готовится два вида мазка:

-Препарат «толстой» капли –для его приготовления на предметное стекло наносят 1-2 капли крови и размазывают петлёй мазок диаметром 1 см. Применяется для обнаружения в крови паразитов.

-Тонкий“ мазок крови– на одну сторону обезжиренного предметного стекла наносят 1 каплю крови, затем распреде- ляют вторым стеклом под углом 45°. Позволяет определить вид возбудителя.

* Бактериологическая петля, которую держат в правой руке, раскаляют в пламени.
* На обезжиренное предметное стекло наносится 1 капля физиологического раствора.
* Пробирку с микробной культурой держа в левой руке (при условии, что поверхность питательной среды видна), при помощи указательного пальца и ладони правой руки снимается пробка, и пробирку с пробкой пропускают через пламя горелки.
* При помощи Петли берется материал из пробирки.
* Пробирку с пробкой пропускают через пламя, закрывают.
* Микробную культуру на конце петли смешивают с физиологическим раствором в диаметре 1 см на поверхности покровного стекла.
* Бактериологическая петля стерилизуется в пламени

**Высушивание мазков**

* Мазки, в основном, высушивают открыто при комнатной температуре
* Толстые мазки высушивают в термостате либо над пламенем горелки.
* Мазок нужно держать большим и указательным пальцами правой руки поверхностью вверх.
* При пересушивании клеточные структуры разрушаются
* Препараты, приготовленные из крови нужно высушивать при комнатной температуре.

**Фиксация мазка** (физическая, химическая, смешанная)

* Мазок фиксируют на предметное стекло, чтобы он не удалился при смывании и окрашивании.
* Для обезвреживания микробов. Кроме того, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.
* Становятся безопасными для лаборанта и окружающих
* Физико-термическая фиксация - мазок трижды проводят через пламя.
* Химическая фиксация: метиловый спирт--5 мин, этиловый спирт и смесь Никифорова 10 мин, на пару осмиевой кислоты – 2-3 мин, в растворе формалина несколько секунд, в ацетоне 5 минут
* Для фиксации крови и отпечатков органов..
* Физико –химическая – смешанная фиксация

**Тинкториальные свойства бактерий.** Тинкториальные свойства – способность бактерий впитывать красители. Используется для морфологической идентификации бактерий

**Растворы красителей и их приготовление.** Химические красители получают на основе угля, они называются анилиновыми красителями**.** Чаще используется основные красители. Основные красители окрашивают клеточное ядро, а кислотные – протоплазму клеток.

* Кислый фуксин
* эозин
* Метиленовая синька, фуксин, шафранин, нейтрал-рот, генциан-виолет, хризоидин.

**Простой метод окраски.** Методы окраски подразделяются на простые и сложные**.** При простом методе окраски используется всего один краситель.

- фуксин Пфейффера (водный фукцин) - 1-2 мин.

- метиленовый синий - 3-5 мин.

Такой способ подходит для изучения морфологии микробов. В исследуемом материале определяется наличие микроба, его количество и расположение