

Занятие 1

Введение в медицинскую микробиологию и иммунологию, значение предмета.
Микробиологическая лаборатория, режим работы в лаборатории. Методы
микробиологического исследования. Микроскопический метод исследования.
Микроскопы. Правила работы с иммерсионным объективом. Классификация,
морфология и ультраструктура бактерий. Приготовление мазков из патологического
материала и чистых культур микробов. Анилиновые красители. Простой метод
окраски

План занятия:

Ознакомить студентов с режимом работы в лабораториях кафедры микробиологии, дать информацию о литературе, используемой на лекциях и лабораторных занятиях.

1. Введение в предмет «Медицинская микробиология и иммунология», ее место в медицинском образовании, значение во врачебной деятельности, разделы, цель и задачи предмета.
2. Современные принципы классификации микроорганизмов. Основные группы микроорганизмов. Прокариоты (бактерии, спирохеты, актиномицеты, риккетсии, хламидии, микоплазмы), эукариоты (простейшие, грибы) и вирусы.
3. Таксономия и таксономические категории: царство-отдел-класс-порядок-семейство-род-вид-подвид. Вид - как основная таксономическая категория. Понятия о категориях подвида: биовар, серовар, фаговар. Понятия «культура», «штамм», «клон». Номенклатура микроорганизмов.
4. Классификация прокариот по Берджи.
5. Морфология бактерий (кокки, палочковидные, извитые и нитевидные бактерии).
6. Виды (бактериологическая, микологическая, паразитологическая, вирусологическая, иммунологическая, молекулярно-генетическая, особого режима) и оборудование микробиологических лабораторий. Оснащение и приборы лабораторий.
7. Методы микробиологической диагностики:
*а)Микроскопический; б)Культуральный; с)Биологический (экспериментальный);
d)Иммунологический (серологические реакции, кожно-аллергические реакции);
е)Молекулярно-генетический.*
8. Микроскопический метод исследования.
- 9.Типы микроскопов (световой, темнопольный, фазово-контрастный, люминесцентный, электронный, сканирующий), техника микроскопирования. Увеличительная способность микроскопа.
- 10.Типы объективов. Правила работы с иммерсионным микроскопом.
11. Этапы приготовления мазка.
12. Приготовление мазка из гноя, мокроты, крови и культуры микробов.
13. Высушивание мазка.
14. Фиксация мазка (физическая, химическая, смешанная).
15. Анилиновые красители, их классификация по химическому составу и цвету.
16. Простой метод окраски.

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.

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

Методы микробиологической диагностики

Основная цель микробиологического исследования — установление или исключение этиологической роли микроорганизмов при возникновении заболевания. Важными показателями лабораторной диагностики являются чувствительность и специфичность методов.

Микроскопический метод

Материал, полученный от больного, исследуют под микроскопом. При этом возможно использование различных микроскопических техник: световой, фазово-контрастной, темнопольной, люминесцентной и электронной. Световая микроскопия применяется наиболее часто.

С помощью микроскопического метода можно определить морфологические признаки возбудителей, а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в изучаемых образцах. При микроскопии бактерий (*бактериоскопический* метод) их окрашивают и изучают морфологические и тинкториальные свойства. При этом определяют форму, размер и взаимное расположение бактериальных клеток (например, кокки могут располагаться цепочками (стрептококки), в виде виноградной грозди (стафилококки), парами (диплококки) и др.). Используя различные методы окраски, выявляют тинкториальные особенности и отдельные структуры бактериальной клетки (при окраске по Граму — свойства клеточных стенок, по Бурри–Гинсу — наличие капсулы, по Аuesки — споры, при серебрении по Морозову и окраске по Леффлеру — жгутики, по Нейссеру — зерна волютина и др.). В связи с тем, что многие бактерии имеют сходную морфологию и тинкториальные свойства, метод не позволяет точно идентифицировать возбудитель и в большинстве случаев его результат носит лишь ориентировочный характер. Специфичность метода всего 20–80%.

При микроскопии вирусов (*вирусоскопический* метод) чаще используют электронный микроскоп, реже — люминесцентный. Световая микроскопия из-за ничтожно малых размеров вирусов практически не применяется. С помощью светового микроскопа

можно выявить цитопатическое действие вируса и внутриклеточные включения (внутриядерные и внутрицитоплазматические), которые образуются в пораженных клетках при некоторых вирусных инфекциях.

Микроскопический метод наиболее эффективен при паразитарных заболеваниях (*паразитоскопический* метод). Этот метод является основным при подтверждении диагноза заболеваний, вызванных простейшими (малярия, амебиаз, лямблиоз и др.) и гельминтами. Микроскопическое исследование патологического материала заключается в приготовлении нативных препаратов и мазков, окрашенных по методу Романовского–Гимзы.

Микроскопия грибов. Грибы микроскопируют как в нативном, так и в окрашенном состоянии.

Культуральный метод

Микроорганизмы, находящиеся в исследуемом материале, культивируют на питательных средах, культурах клеток, куриных эмбрионах в целях выделения чистой культуры и ее идентификации. В зависимости от объекта метод получил различные названия: бактериологический метод (культивирование бактерий), вирусологический метод (культивирование вирусов), микологический метод (культивирование грибов), паразитологический метод (культивирование простейших).

К достоинствам культурального метода можно отнести высокую информативность, так как он позволяет выделить, накопить и наиболее точно идентифицировать возбудитель, а к недостаткам — трудоемкость и длительность исследования (более 2–3 дней).

Биологический метод

Данный метод основан на заражении исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных (мышей, крыс, морских свинок, кроликов и др.). Выбор животного и способ введения зависит от биологических особенностей возбудителя. Этот метод используют для выделения возбудителя, определения вирулентности микроорганизмов, типа токсина, воспроизведения клинической картины заболевания, изучения иммунного ответа, активности антимикробных и биологических препаратов. Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных используют для изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм–макроорганизм. К достоинствам этого метода можно отнести возможность культивирования некоторых микробов, для которых не удалось подобрать питательной среды (возбудители лепры, сифилиса и др.) и высокую чувствительность, а к недостаткам — невосприимчивость животных к большинству возбудителей антропонозных инфекций, высокую стоимость и необходимость содержания вивария.

Серологический метод

Серологический метод заключается в определении титров специфических антител или антигенов в сыворотке крови. Для этого используют реакцию агглютинации (РА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию нейтрализации (РН), реакцию преципитации (РП), радиоиммунный анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА) и другие реакции.

Большое значение имеет обнаружение антигенов возбудителей с помощью иммунных методов. Это возможно уже на самых ранних этапах инфекционного процесса — экспресс-диагностика, а количественное определение антигенов в динамике заболевания служит критерием эффективности проводимого лечения. Специфичность метода — 70–90%.

Аллергологический метод используют в качестве вспомогательного при небольшой группе инфекционных заболеваний. Присутствие в организме возбудителя заболевания или вакцинного штамма приводит к сенсибилизации организма и развитию ГЗТ, которую можно выявить постановкой кожно-аллергической пробы с соответствующим аллергеном. Примером могут служить внутрикожные пробы с туберкулином (туберкулез, проба Манту), бруцеллином (проба Бюрне), тулярином (туляремия), токсоплазмином (токсоплазмоз), антраксином (сибирская язва), орнитином (орнитоз) и др. Инфекционные диагностические аллергены чаще всего вводят внутрикожно в среднюю треть сгибательной поверхности предплечья, реже на кожу путем втирания в царапины (скарификационная проба). Через 48–72 ч учитывают наличие и размер инфильтрата (папулы). Используются также лабораторные аллергологические методы (реакция повреждения нейтрофилов, реакция бласттрансформации с аллергенами и др.).

Молекулярно-генетический метод

Молекулярно-генетический метод базируется на выявлении специфических нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК возбудителей непосредственно в патологическом материале.

К молекулярно-генетическим методам относят: полимеразную цепную реакцию (ПЦР), обратную транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР), рестрикционный анализ, секвенирование, саузерн-блоттинг, определение плазмидного профиля и др. Наиболее часто применяется ПЦР. С помощью этого метода находят небольшой фрагмент ДНК (мишень), строго специфичный для конкретного возбудителя. ПЦР-тест-система может дифференцировать роды, виды, серотипы и даже патогенные и непатогенные штаммы микроорганизмов одного вида. В одном клиническом образце можно одновременно определять наличие сразу нескольких возбудителей (мультиплексные исследования). Этот метод позволяет выявлять некультивируемые формы патогенов. ПЦР-методы широко используют в диагностике вирусных, паразитарных и бактериальных инфекций, чаще в качестве первичного скрининга, а также для контроля лечения в сочетании с другими методами лабораторной диагностики. С помощью ПЦР в режиме реального времени можно определить количество нуклеиновых кислот. Это высокочувствительный метод.

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 темном поле. Для изучения формы, строения, размеров и других свойств бактерий размером более 0,2 мкм применяется световой микроскоп.

Виды микроскопов: биологический (световой), электронный, темнопольный, фазово-контрастный, люминесцентный.

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 препаратом, все лучи, проходящие через препарат, попадают в объектив, усиливая увеличение микроскопа. Объективы, в зависимости от сухого и влажного способа (масло, иммерсия - *immersio* (лат. 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.

Микроорганизмы систематизированы по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой. Этим занимается специальная наука — систематика микроорганизмов. Систематика включает три части: классификацию, таксономию и идентификацию. В основу таксономии (от греч. *taxis* — расположение, порядок) микроорганизмов положены их морфологические, физиологические, биохимические и молекулярно-биологические свойства. Различают следующие таксономические категории: царство, подцарство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид, подвид и др. В рамках той или иной таксономической категории выделяют таксоны — группы организмов, объединенные по определенным однородным свойствам. Названия микроорганизмов регламентируются Международным кодексом номенклатуры (зоологической, ботанической, номенклатуры бактерий, вирусов).

Микроорганизмы представлены доклеточными формами (вирусы — царство *Virae*) и клеточными формами (бактерии, архебактерии, грибы и простейшие).

По новому высшему уровню в иерархии классификации клеточных форм жизни различают царства микроорганизмов, объединенные в три домена (или «империи»), — *Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya*:

- домен *Bacteria* — прокариоты, представленные настоящими бактериями (эубактериями);
- домен *Archaea* — прокариоты, представленные археями, или архебактериями;
- домен *Eukarya* — эукариоты, клетки которых имеют ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, а цитоплазма состоит из высокоорганизованных органелл (митохондрий, аппарата Гольджи и др.).

Домен *Eukarya* включает царства *Protozoa* (простейшие), *Eumycota* (настоящие грибы) и *Chromista* (хромовики). Царство *Chromista* (*Stramenopila*) — новое, образованное в результате реклассификации некоторых простейших и грибов из более раннего устаревшего таксона — царства грибов (*Fungi*, *Mycota*).

Классификация и морфология бактерий

Бактерии относятся к прокариотам, т.е. доядерным организмам, поскольку у них имеется примитивное ядро без оболочки, ядрышка, гистонов, а в цитоплазме отсутствуют высокоорганизованные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и др.).

Согласно Руководству Берджи последних изданий (2001–2011 гг.), бактерии делят на два домена: *Bacteria* и *Archaea*

Домен *Bacteria* (эубактерии) Домен *Archaea* (археи, или архебактерии)

В домене *Bacteria* можно выделить следующие бактерии:

- 1) с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные*;
- 2) с толстой клеточной стенкой, грамположительные;
- 3) без клеточной стенки (класс *Mollicutes* — микоплазмы)

Археи — одна из древних форм жизни, на что указывает приставка «архе». Они могут расти при высокой температуре, повышенной концентрации соли, высоком давлении. Часть из них — метаногены, облигатные анаэробы; не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (рРНК). Среди них нет возбудителей инфекций

В домен Bacteria входят 30 типов бактерий, из которых имеют медицинское значение следующие (по Берджи 2001–2011 гг.).

Подразделение бактерий (в домене Bacteria) по особенностям строения клеточной стенки связано с возможной вариабельностью их окраски в тот или иной цвет по методу Грама. По этому методу, предложенному в 1884 г. датским ученым Х. Грамом, бактерии делятся на грамположительные, окрашиваемые в сине-фиолетовый цвет, и грамотрицательные, красящиеся в красный цвет.

Грамотрицательные бактерии имеют тонкую клеточную стенку. К ним относятся сферические формы (кокки — гонококки, менингококки, вейллонеллы), извитые — спирохеты и спириллы, а также палочковидные формы и наиболее мелкие бактерии (риккетсии и хламидии — облигатные внутриклеточные паразиты).

Для грамположительных бактерий характерна толстая клеточная стенка. К ним относятся сферические формы (кокки — стафилококки, стрептококки, пневмококки), палочковидные формы и ветвящиеся, нитевидные формы (актиномицеты).

Формы бактерий

Кокки — шаровидные бактерии размером 0,5–1,0 мкм, которые по взаимному расположению делятся на микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки.

Микрококки (от греч. micros — малый) — отдельно расположенные клетки.

Диплококки (от греч. diploos — двойной) располагаются парами (пневмококк, гонококк, менингококк), так как клетки после деления не расходятся. Пневмококк имеет с противоположных сторон ланцетовидную форму, а гонококк и менингококк имеют форму кофейных зерен, обращенных вогнутой поверхностью друг к другу.

Стрептококки (от греч. streptos — цепочка) — клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку вследствие деления клеток в одной плоскости и сохранения связи между ними в месте деления.

Стафилококки (от греч. staphyle — виноградная гроздь) — кокки, расположенные в виде грозди винограда в результате деления в разных плоскостях.

Палочковидные бактерии различаются по размерам, форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Палочки могут быть правильной (кишечная палочка) и неправильной (коринебактерии) формы, в том числе ветвящиеся, например у актиномицетов. К наиболее мелким палочковидным бактериям относятся риккетсии.

Концы палочек могут быть как бы обрезанными (сибиреязвенная бацилла), закругленными (кишечная палочка), заостренными (фузобактерии) или в виде утолщения. В последнем случае палочка похожа на булаву (коринебактерии дифтерии). Слегка изогнутые палочки называются вибрионами (холерный вибрион). Большинство палочковидных бактерий располагается беспорядочно, так как после деления клетки расходятся. Если после деления клетки остаются связанными общими фрагментами клеточной стенки и не расходятся, то они располагаются под углом друг к другу (коринебактерии дифтерии) или образуют цепочку (сибиреязвенная бацилла).

Приготовление мазков из патологического материала пациентов. 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 придавливаясь, 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 распределяют вторым стеклом под углом 45°. Позволяет определить вид возбудителя.

Приготовление мазков из бактериальных культур:

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.

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. Мазок фиксируют на предметное стекло, чтобы он не удался при смывании и окрашивании. Для обезвреживания микробов. Кроме того, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые. Становятся безопасными для лаборанта и окружающих.

Анилиновые красители. 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.

Методы окраски подразделяются на простые и сложные

При простом методе окраски используется всего один краситель.

- фуксин Пфейффера (водный фуксин) - 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