

Тема 1. Медицинская микробиология и иммунология, ее цели 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 чистой культуры микробов. Анилиновые красители. 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.

СОВРЕМЕННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

- *Микроорганизмы делятся на две большие группы:*
- *Неклеточные формы (вирусы, вириоды, прионы)*
- *Клеточные формы.*

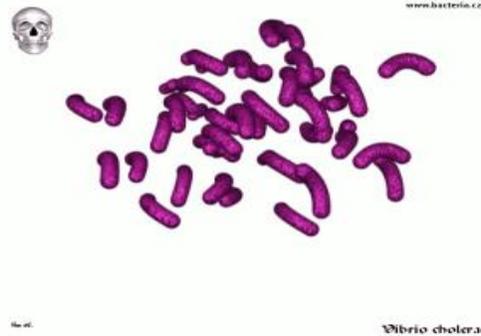
Микроорганизмы, имеющие клеточную структуру делятся на два домена:

- ***Bacteria** –прокариоты, бактерии;*
- ***Archaea** –прокариоты, археобактерии;*
- ***Eukaria** –эукариоты, включающие в себя три царства:*
 - * *Грибы(Fungi)*
 - * *Животные(Animalia), в том числе Простейшие(Protozoa)*
 - * *Растения(Plantae)*



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ

- ✓ Бактерии (греч. *bacteria* - палочка) одноклеточные, не видимые невооруженным глазом микроорганизмы
- ✓ Прокариоты
- ✓ Размер 1,5-3 X 0,6-0,8 мкм
- ✓ Седиментация рибосом 70S
- ✓ Не имеют ядерной мембраны и ядрышка
- ✓ Имеют одну хромосому
- ✓ Митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум отсутствуют
- ✓ В цитоплазматической мембране стерол отсутствует (за исключением микоплазм)



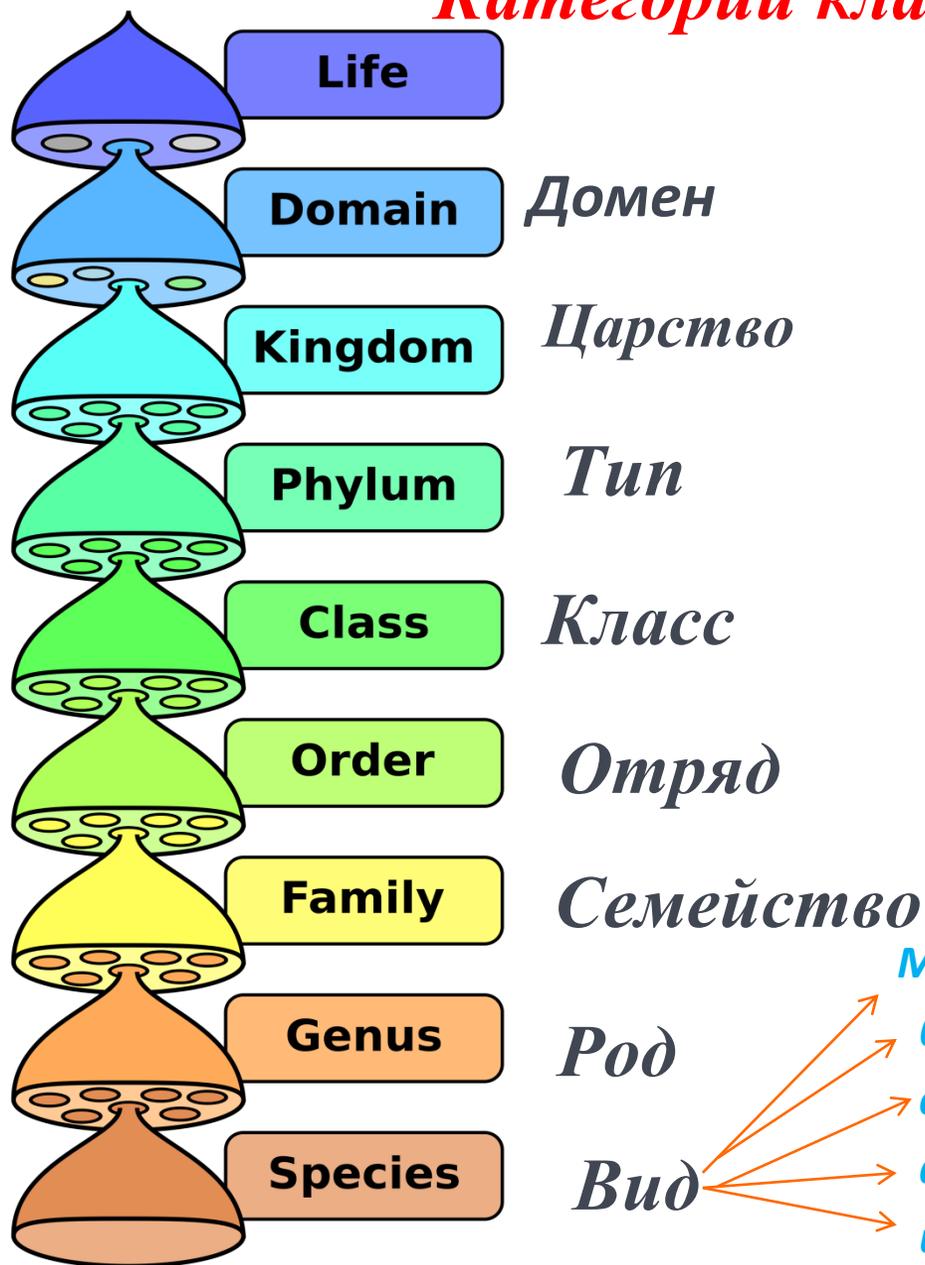
КЛАССИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ

- *Д. Берджи – 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.*



Таксономия микроорганизмов

Категории классификации



Каждый микроорганизм в систематике имеет определённую таксономию (греч. taxis-место, ряд).

К таксономии относятся:

- **Классификация**
- **Идентификация**
- **Номенклатура**

Морфовар

биовар

серовар

фаговар

штамм



Идентификация микроорганизмов

- морфологическая
- тинкториальная
- культуральная
- биохимическая
- антигенная

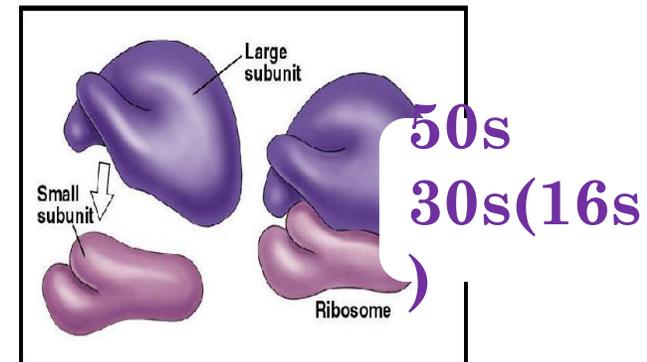
По фенотипу

- По процентному соотношению Г+ Ц
- По гибридизации ДНК,
- Секвенирование,
- По действию фермента рестриктазы.
- По полиморфизму в цепочке ДНК

По генотипу

- Консерватизм рибосомы 16S
- Гены, кодирующие RNT и рибосомные белки

По филогенезу



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 морфобиологические свойства.

➤ **Штамм** – это чистая культура одного вида микроорганизмов, полученных из различных (или одного) источников в разное время.

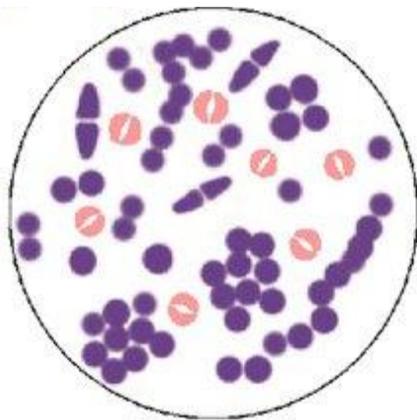
➤ **Клон** – культура, выращенная из одной микробной клетки.

➤ **Колония** – это скопление (популяция), образуемая бактериями на твёрдых питательных средах.

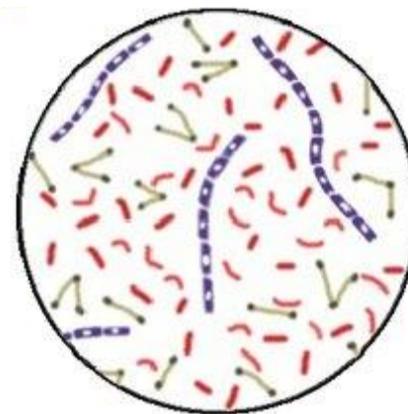
➤ **Чистая культура микроба**– имеется ввиду популяция, образованная одним видом микроорганизма на твёрдой питательной среде.



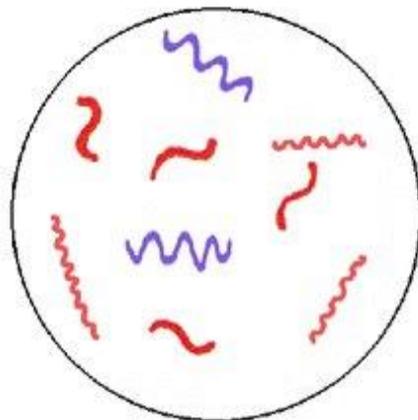
Морфология бактерий



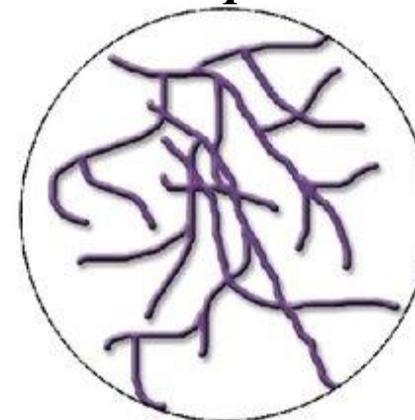
КОККИ



***Палочковидные
бактерии***



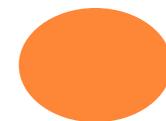
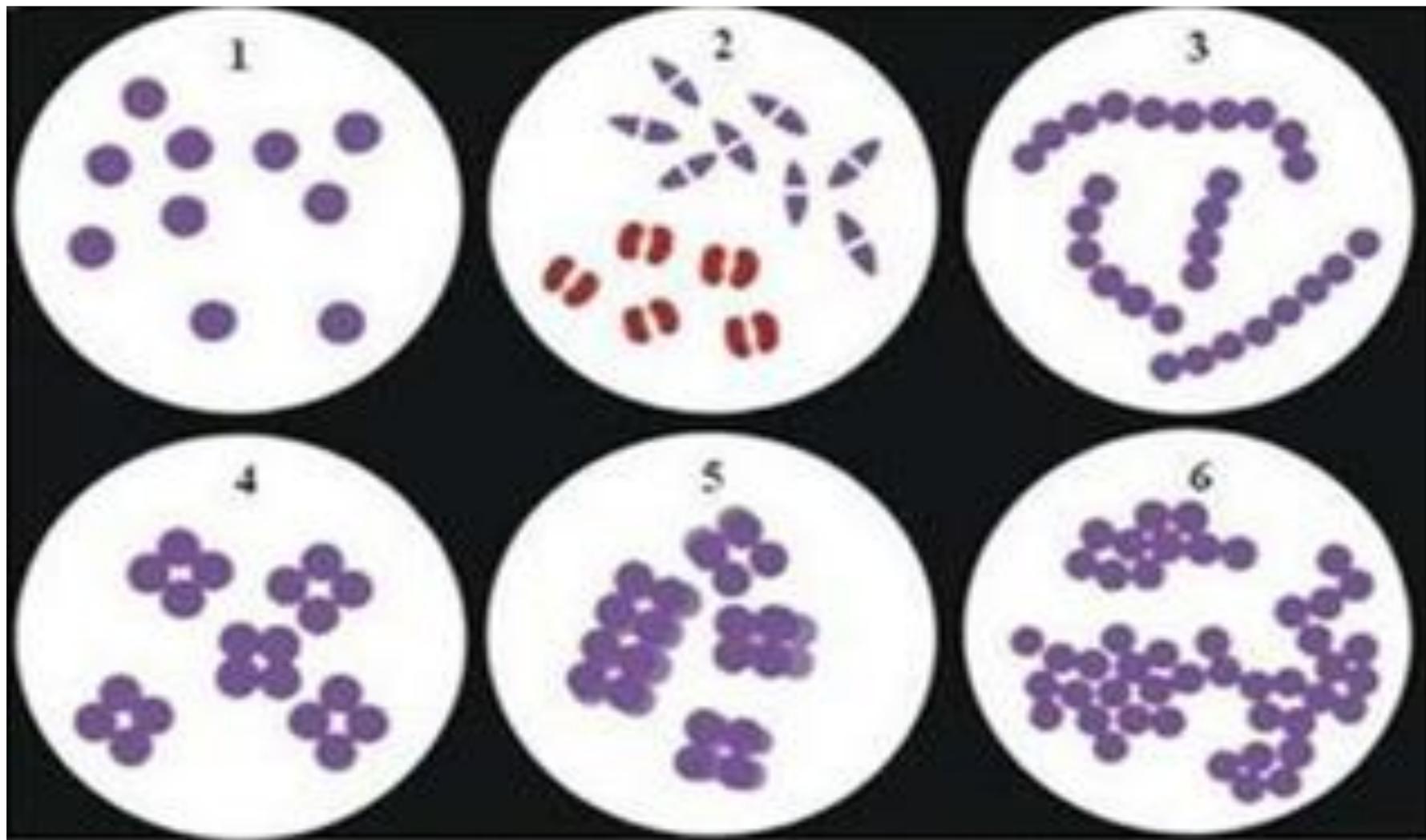
***Спиральные
бактерии***



Нитчатые бактерии



КОККИ



Кокки

Микрококки (греч. *micros* – **мелкий**) - делятся поперечно, располагаются отдельно

Диплококки (греч. *diplos* – **вместе**) - делятся поперечно, располагаются парами

Стрептококки (греч. *Streptos* – **цепочка**) - делятся поперечно, располагаются в виде цепочек

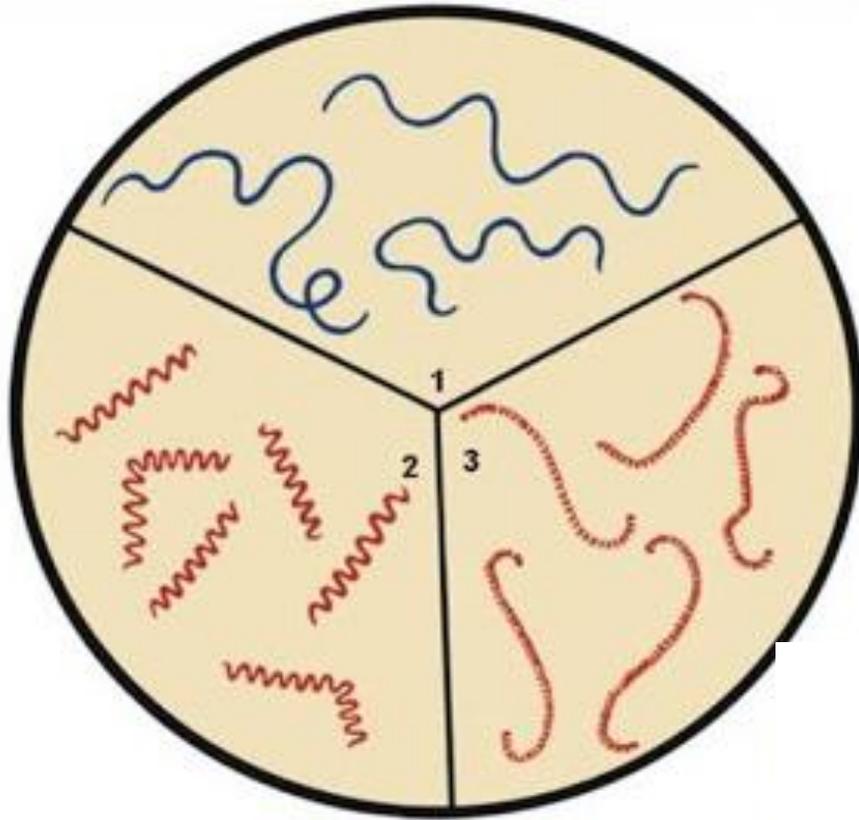
Тетракокки (греч. *tetra* – **четыре**) - делятся перпендикулярно в двух плоскостях и располагаются по четыре

Сарцины (лат. *sarsina* – **сноп**) - делятся перпендикулярно в трёх плоскостях и располагаются в виде снопов

Стафилококки (греч. *staphyle*- **гроздь винограда**)- делятся перпендикулярно в двух плоскостях и располагаются в виде гроздей винограда

Спиралевидные бактерии (<20 мкм)

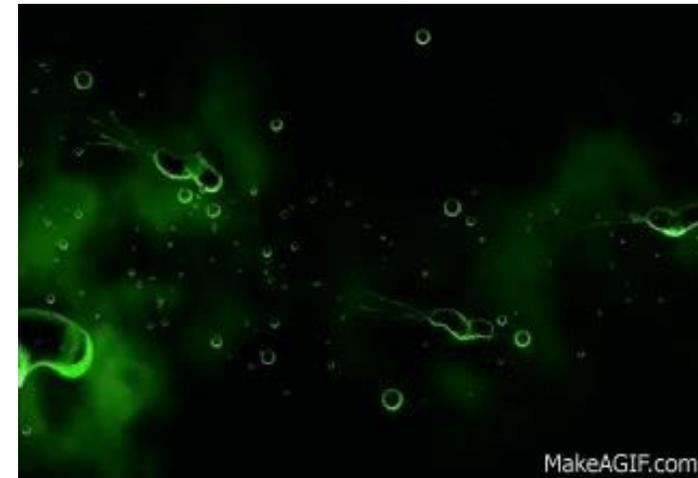
- *Спириллы*
- *Спирохеты*



1. *Боррелия*
2. *Трепонема*
3. *Лептоспира*



кампилобактерии



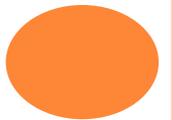
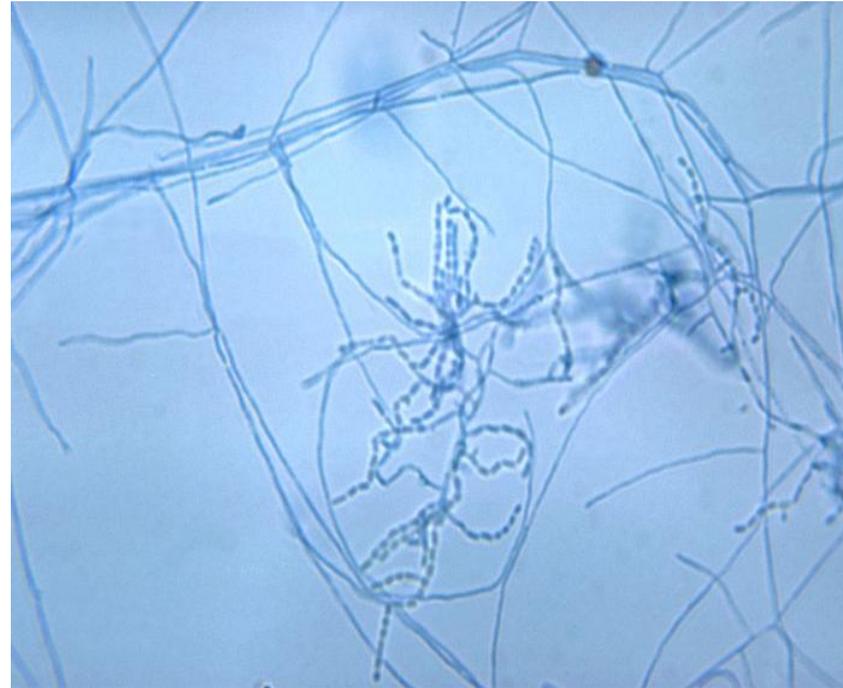
Helicobacter pylori



НИТЧАТЫЕ БАКТЕРИИ(10-50 мкм)



Актиномицеты



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*

Современная микробиологическая лаборатория



Оборудования микробиологической лаборатории



Чашки Петри



тампоны



петля



игла



шпатель



Спиртовка



ПРИБОРЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

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



ПРИБОРЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ



Система Газпак



Печь Пастера



Центрифуга



Холодильные шкафы



Автоклав



Магнитная мешалка

Бактериологические анализаторы

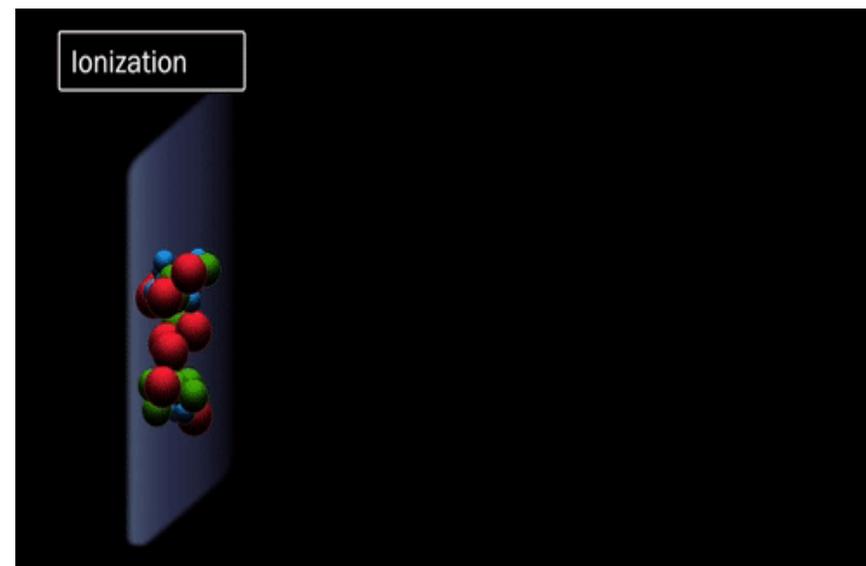


Анализаторы для идентификации микроорганизмов, изучения их чувствительности к антибиотикам и гемокультуры



MALDI-tof масс-спектрометрия

- *MALDI-tof масс-спектрометрия (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Матрично-активированная лазерная десорбция (ионизация))*
- *В результате обоюдного воздействия анализируемого вещества на матриксе и лазерного излучения вещество ионизируется*
- *Применяется для исследования нелетучих высокомолекулярных соединений (пептидов, белков, олигонуклеотидов, углеводов)*
- *За создание прибора MALDI-tof японский инженер Шимадзу К.Т. в 2002 году получил Нобелевскую премию*



Термостат

➤ Термостат – специальный шкаф с двумя дверцами для культивирования микроорганизмов на искусственных питательных средах вне организма человека или животного.

➤ Большинство патогенных микроорганизмов размножается при t -ре 37°C в течение нескольких суток, а лептоспира и грибки - при температуре 28°C в течение 3-10 дней.



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)

- a) В лабораторию нельзя заходить без халата и колпака В случае необходимости нужно использовать маску.***
- b) Нельзя заходить в лабораторию в верхней одежде, много передвигаться и много разговаривать.***
- c) В лаборатории нельзя кушать, пить чай и курить***
- d) В случае попадания патологического материала на халат, стол или на пол, необходимо немедленно обработать дезинфицирующим средством.***
- e) Использованные пипетки, шпатели, пробирки, чашки Петри необходимо замочить в дезинфицирующем растворе.***
- f) В конце работы рабочий стол необходимо убрать, дезинфицировать, засеянные чашки Петри поместить в термостат, музейные штаммы и неиспользованные питательные среды поместить в холодильник.***
- g) 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.***
- h) 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 целостность 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, щипатель, 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 окончании 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



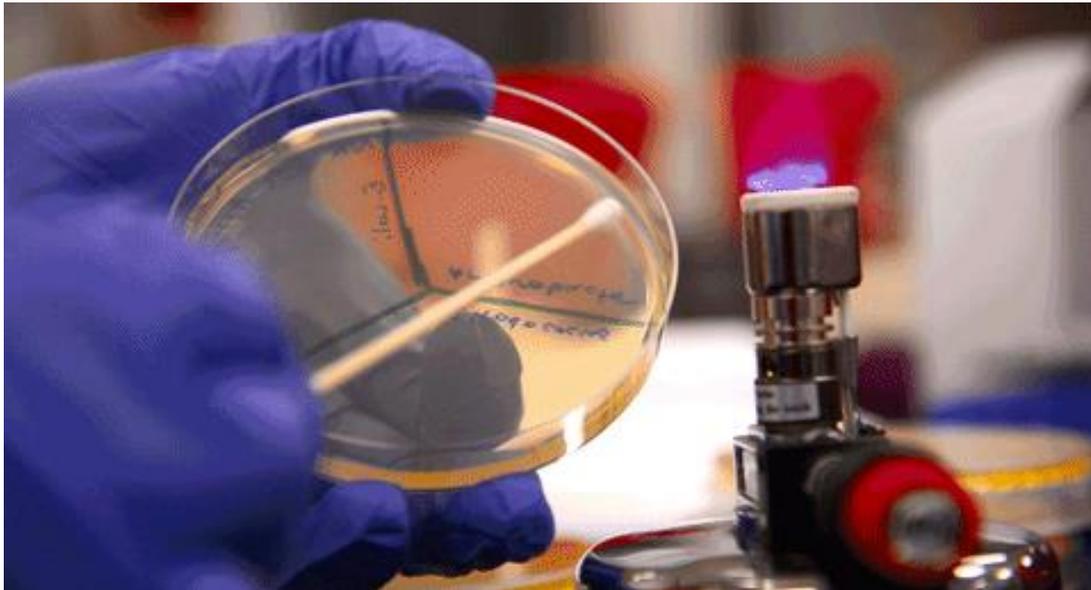
Метод микроскопии

- ❑ С помощью микроскопического метода в исследуемом материале определяют наличие микроорганизмов и их морфологию.
- ❑ Дополнительные элементы – определяют наличие капсулы, спор, жгутиков, других элементов (зёрна волютина).
- ❑ 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.*



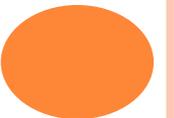
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

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***).



КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА

- *В связи с тем, что антигены возбудителей вызывают сенсibilизацию, для диагностики инфекционных болезней применяются аллергические реакции*
- *при туберкулёзе - проба Манту,*
- *при бруцеллёзе - проба Бурне,*
- *при туляремии - реакция на тулярин и т.д.*



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.

***Виды
микроскопов***

```
graph TD; A[Виды микроскопов] --> B[Биологический (световой) м.]; A --> C[Электронный м.]; A --> D[Другие м.]; B --> E[Темнопольный м.]; B --> F[Контрастно-фазный м.]; B --> G[Люминесцентный м.];
```

***Биологический
(световой) м.***

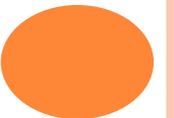
Электронный м.

Другие м.

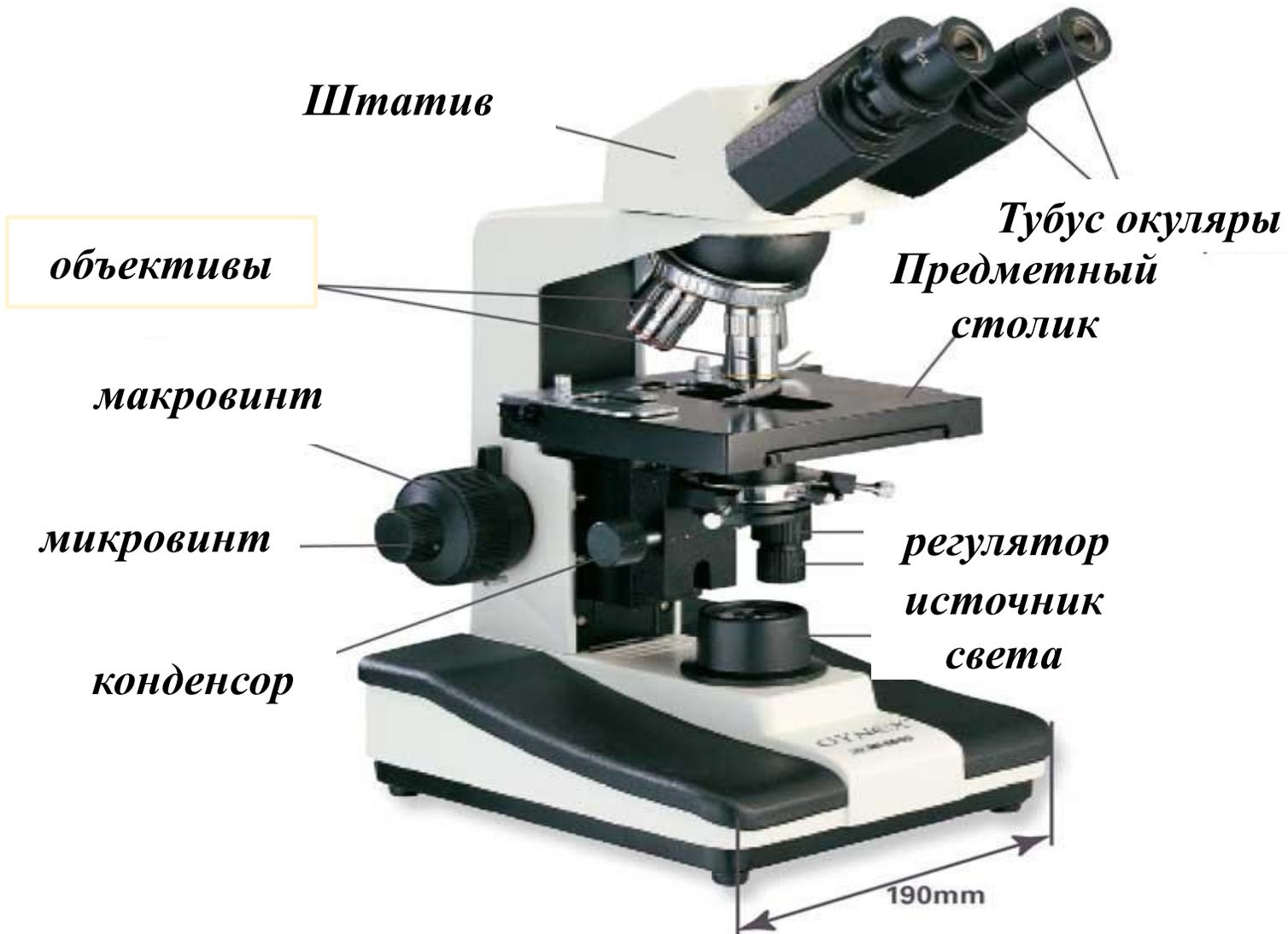
Темнопольный м.

***Контрастно-
фазный м.***

Люминесцентный м.



Строение светового микроскопа



Биологический микроскоп состоит из двух частей:

- | Механическая | Оптическая |
|--------------------------|-------------------|
| a) Штатив | Объективы |
| b) Ручка | Окуляры |
| c) Тубус | |
| d) Предметный столик | Освещение |
| e) Макрометрический винт | - зеркало |
| f) Микрометрический винт | - конденсор |
| g) револьвер | |

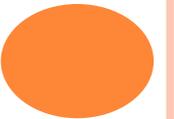
Предметный столик



✓ 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.



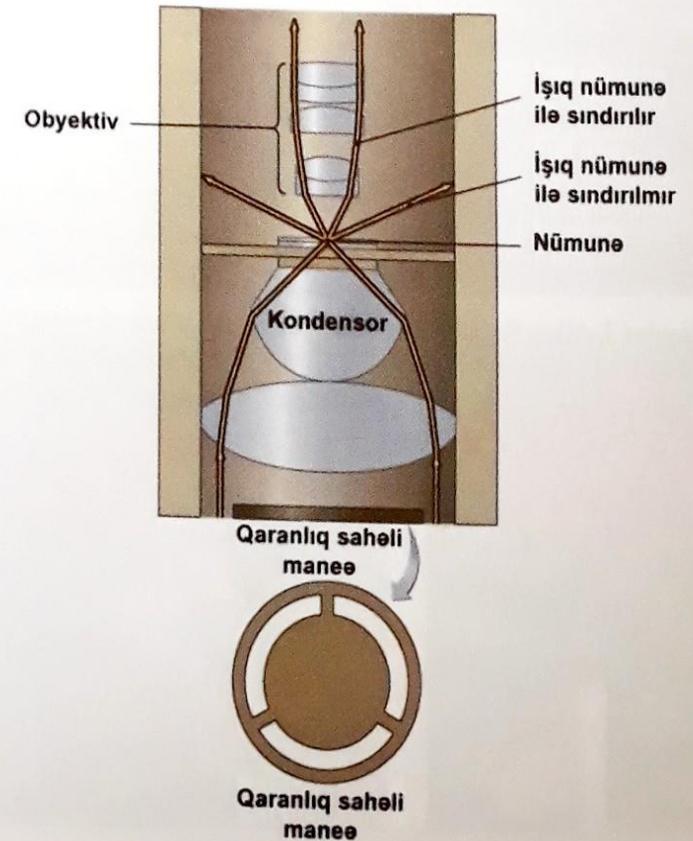
Увеличительная способность микроскопа

- *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 $100 \times 10 = 1000$ раз.*
- *Биологические световые микроскопы позволяют увеличить объект до 2000-3000 раз.*
- *Дифференциал 0,00027 мм*



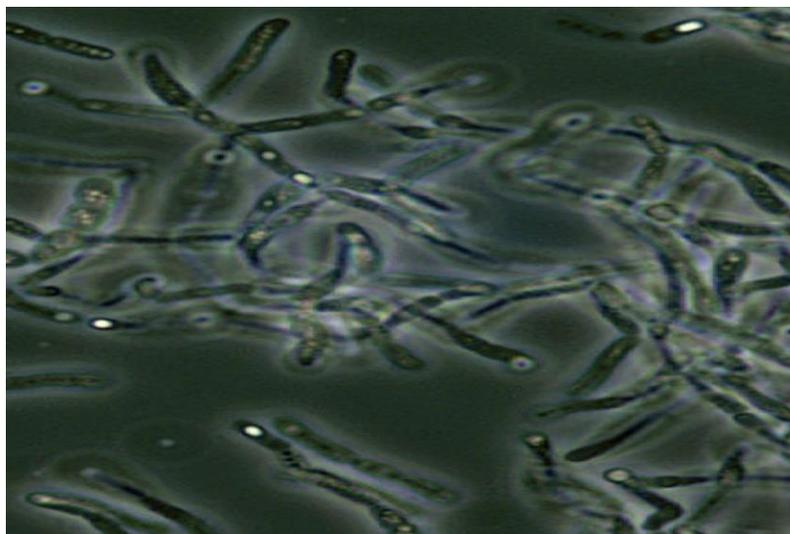
Темнопольный микроскоп

- 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.



Споры B.antracis под контрастно-фазовым микроскопом

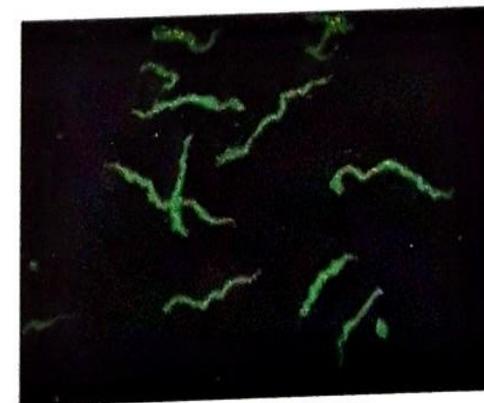
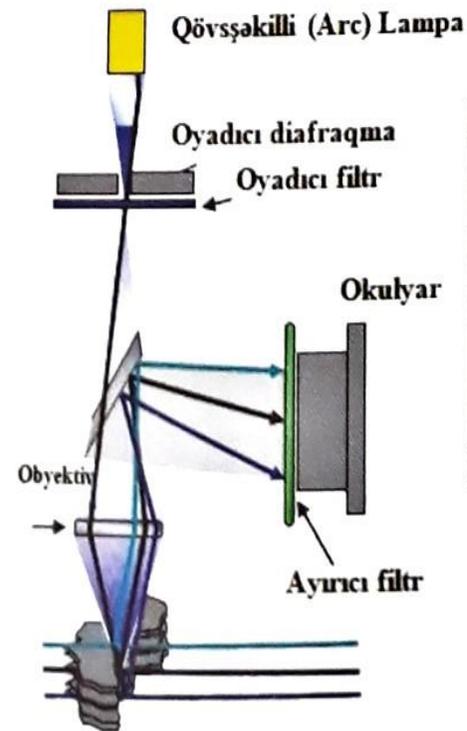


Люминесцентный (флюоресцентный) микроскоп

➤ **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.**



Fluorescent mikroskopun sxemi (sol),
fluorescent mikroskopda spiroxetlərin
görünüşi (sağ)

Схема флюоресцентного микроскопа(справа),
спирохеты под флюоресцентным микроскопом
(слева)



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 нм, 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 ($\times 1\ 000\ 000$), чем световой микроскоп.*



Электронный микроскоп



Микроскопический метод исследования

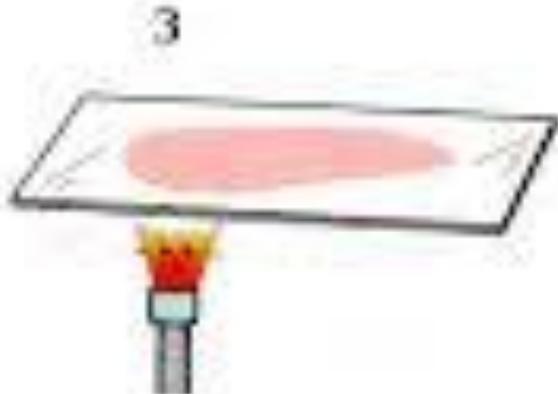
Этапы приготовления мазка



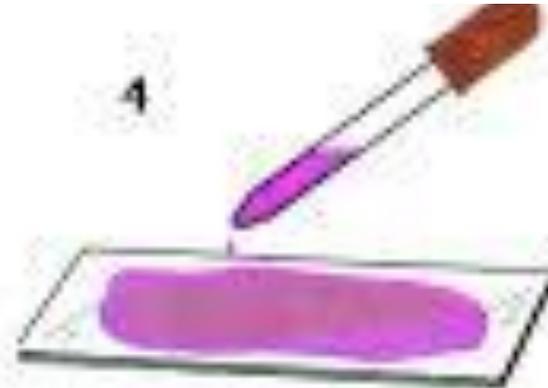
На предметное стекло наносится капля воды (физ. раствора)



На неё добавляется биологический материал и перемешивается



Высушивается и фиксируется

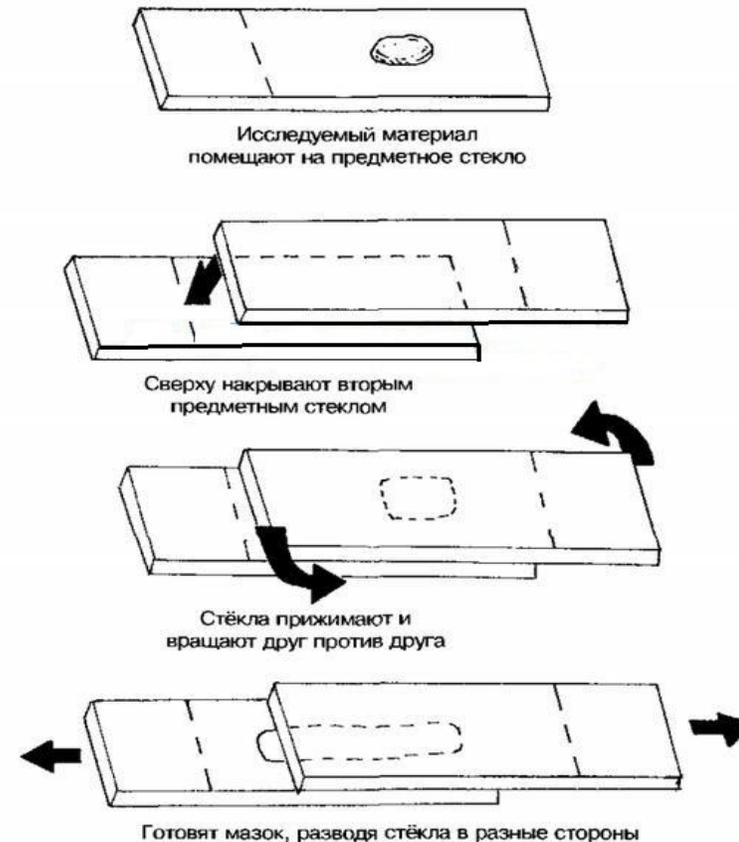


Сверху добавляется простой краситель и окрашивается



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.



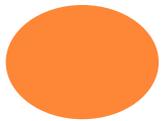
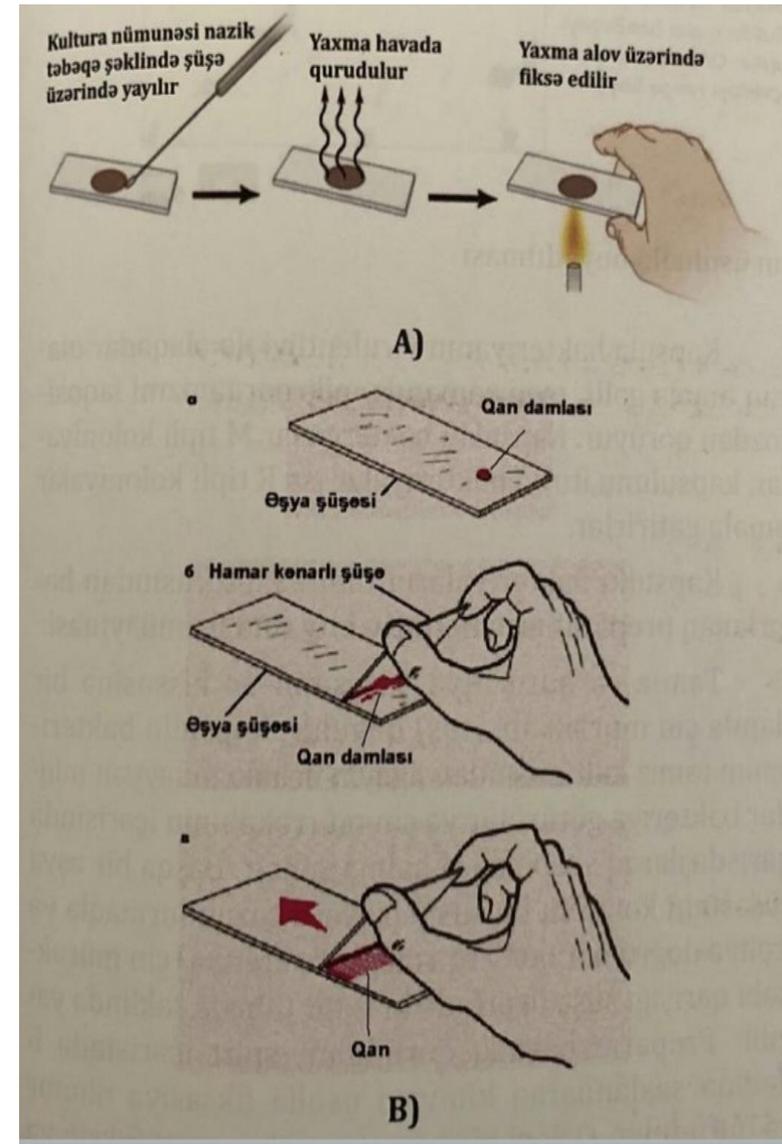
Из крови готовится два вида мазка:

➤ **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 распределяют вторым стеклом под углом 45°.

➤ Позволяет определить вид возбудителя.



Фиксация мазка (физическая, химическая, смешанная)

1. Мазок фиксируют на предметное стекло, чтобы он не удался при смывании и окрашивании.

Для обезвреживания микробов. Кроме того, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.

3. 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



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.*



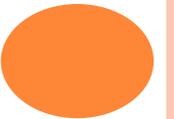
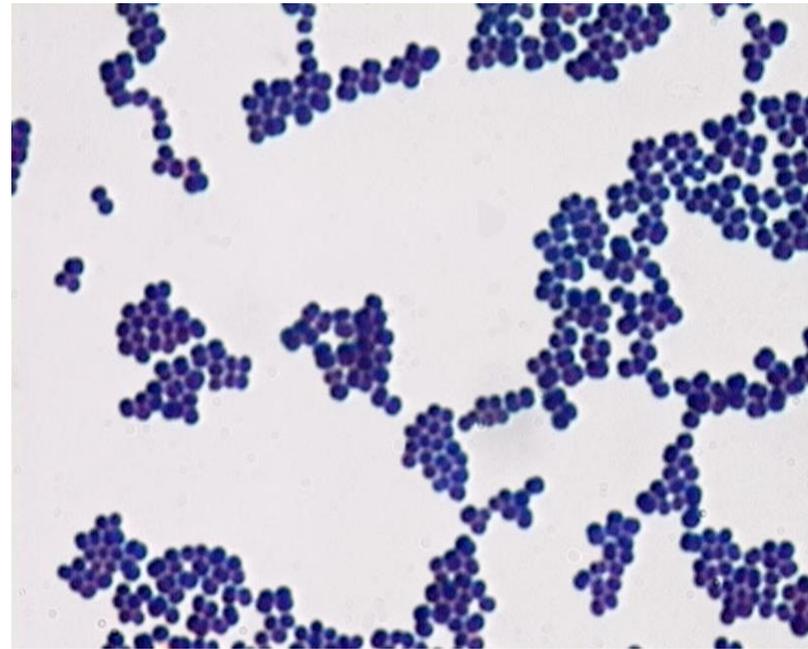
ВЫСУШИВАНИЕ МАЗКОВ

- ***Химические краски получают из каменного угля и называются анилиновыми красителями.***
- ***Чаще используют щелочные красители***
- ***Щелочные красители окрашивают ядро клетки, а кислые протоплазму клетки.***



ПРОСТОЙ МЕТОД ОКРАСКИ

- *При простом методе окраски используется всего один краситель.*
- *Такой способ подходит только для изучения морфологии микробов*



ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

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

