**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ООБРАЗОВАНИЯ «ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВОХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии

 **МОДУЛЬ 1**

 **«мОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»**

**методические указания для студентов факультета высшего сестринского образования**

**Оренбург 2016**

**МОДУЛЬ 1 «МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»**

**Раздел: МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ (2 практических занятия)**

**Практическое занятие №1.**

**Тема:** Методы изучения морфологии микроорганизмов. Сравнительная морфология основных групп микроорганизмов.

**Цель:** ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов, сравнительной морфологией основных групп микроорганизмов, овладеть методом иммерсионной микроскопии.

**Вопросы для подготовки:**

1. Зависимость границ человеческого познания от уровня научно-технического прогресса. Становление микробиологии как науки.

### Медицинская микробиология. Её значение в практической деятельности врача. Задачи предмета.

### Микроскоп и микроскопические методы исследования

1. Оптическая микроскопия. Полезное увеличение. Разрешающая способность микроскопа.
2. Принципы иммерсионной, фазово-контрастной, флуоресцентной, электронной микроскопии.
3. Назначение и типы микропрепаратов из микроорганизмов: нативные, окрашенные (позитивно, негативно).
4. Основные группы микроорганизмов и их взаиморасположение в природе.
5. Связь формы и содержания, морфологии и функции на примере морфологии отдельных групп микроорганизмов.
6. Сравнительная морфология простейших, грибов, бактерий, спирохет, риккетсий, микоплазм, хламидий, вирусов.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА**

### Микроскоп (от греч. micros – малый и scopeo - смотрю) – оптический прибор для изучения малых объектов, недоступных невооруженному глазу

В микроскопе различают механическую и оптическую части. Механическая часть включает штатив (который состоит из основания и тубусодержателя) и укрепленные на нем тубус, револьвер для крепления и смены объективов, предметный столик для крепления препарата, кронштейн с винтом для крепления и перемещения конденсора, а также механизм для грубой (макрометрический винт) и для тонкой (микрометрический винт) настройки изображения путем вертикального передвижения тубуса или предметного столика. Оптическая часть микроскопа представлена осветительной системой, объективами и окулярами. Осветительная система состоит из конденсора с диафрагмой, зеркала, а также из отдельного или встроенного осветителя. Зеркало – служит для отражения световых лучей по направлению к объективу. Одна сторона зеркала плоская, другая – вогнутая. При работе с искусственным источником освещения и конденсором используют вогнутую сторону зеркала.Конденсор – состоит из системы линз, которые предназначены для собирания лучей, идущих от источника света, в одной точке - фокусе. Фокус должен находится в плоскости рассматриваемого объекта. При микроскопировании с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При искусственном освещении конденсор опускают до тех пор, пока при малом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

#### Диафрагма – находится под конденсором и регулирует объем лучей, проходящих через препарат. Окрашенные препараты рассматривают при открытой диафрагме. При исследовании неокрашенных препаратов отверстие диафрагмы суживают.

#### Объективы представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза производит увеличение. Лежащие за ней линзы (коррекционные) устраняют недостатки оптического изображения.

На оправе объективов указывают их увеличение: х8, х10, х40, х90, х100. Все объективы подразделяются на сухие и иммерсионные (погружные). Сухим называют такой объектив, между фронтальной линзой которого и препаратом, при рассматривании находится воздух. При этом ввиду разницы показателей преломления стекла (на котором препарат) и воздуха, часть световых лучей откланяется и не попадает в глаз наблюдателя.

Особенностью иммерсионных объективов является то, что между фронтальной линзой и препаратом помещают жидкость, имеющую показатель преломления такой же, как у стекла или близкий к нему. Благодаря этому все лучи не преломляясь и не изменяя направления попадают в объектив, чем достигается наилучшее освещение.В качестве иммерсионной жидкости для объективов водной иммерсии используют дистиллированную воду, для объективов масляной иммерсии – кедровое, терпеновое или синтетическое иммерсионное масло. Недостатком кедрового масла (показатель преломления 1,515, почти равен стеклу) является его быстрое загустевание. Для объективов, используемых при работе в ультрафиолетовой области спектра, в качестве иммерсионной жидкости используют глицерин.Окуляры имеют две линзы: верхняя называется главной, нижняя – собирательной. Окуляры обозначают по тому увеличению, которое они дают: х5, х7, х10, х12, х15. По количеству окуляров существуют монокулярные микроскопы, имеющие один окуляр, и бинокулярные микроскопы, имеющие два одинаковых окуляра.Общее (полезное) увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Однако увеличение не определяет качества изображения. Четкость изображения определяется разрешающей способностью микроскопа , т.е. возможностью различать две близко расположенные точки как отдельные. Предел разрешения – минимальное расстояние, на котором эти точки еще видны раздельно – зависит от длины луча, которым освещается объект. Предельная разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм.

Темнопольная микроскопия основана на рассеивании света (дифракции) мельчайшими взвешенными частицами (эффект Тиндаля). При микроскопии этим методом объект освещается сбоку и в объектив микроскопа попадают только лучи, отраженные от частиц в препарате. Микроорганизмы выглядят ярко светящимися на темном поле. Однако данный способ микроскопии позволяет увидеть только контуры объекта и не дает возможности изучить структуру. Для проведения темнопольной микроскопии пользуются обычными объективами и темнопольными конденсорами (параболоид или кардиоид), основная особенность которых состоит в том, что их центральная часть затемнена и прямые лучи от осветителя в объектив не попадают

Фазово-контрастная микроскопия применяется для наблюдения неокрашенных объектов и позволяет изучить внутреннюю структуру микроорганизмов.

#### Глаз человека хорошо различает амплитудные колебания света, возникающие при прохождении светового пучка через окрашенные объекты. Неокрашенные объекты вызывают незаметные для глаза фазовые изменения световой волны и выглядят при микроскопии малоконтрастными. Поэтому для наблюдения неокрашенных микроорганизмов применяют фазово-контрастное устройство, которое позволяет переводить невидимые фазовые изменения проходящего света в видимые амплитудные, при этом объекты становятся высококонтрастными и доступными для изучения. Фазово-контрастная микроскопия может быть позитивной и негативной. При позитивном фазовом контрасте наблюдают темное изображение объекта на светлом фоне, а при негативном – светлое изображение на темном фоне. Фазово-контрастное устройство состоит из специального конденсора и фазовых объективов.

#### Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия основана на способности веществ и биологических объектов светиться при воздействии на них источников энергии различной природы (свет, ультрафиолетовые лучи, ионизирующее излучение). Длина волны луча люминесценции имеет большую величину, чем возбуждающего луча. Поэтому для возбуждения люминесценции воздействуют коротковолновыми лучами (ультрафиолетовыми, синими). Существует первичная (собственная) и вторичная (наведенная) люминесценция. Первичная люминесценция наблюдается у объектов, содержащих флюоресцентные вещества. При этом не требуется предварительное окрашивание. Вторичная люминесценция представляет собой свечение объектов после их предварительного окрашивания люминесцирующими красителями – флюорохромами. Для осуществления данного метода исследования необходим люминесцентный микроскоп, снабженный источником ультрафиолетового луча и набором светофильтров. Возбуждающие светофильтры пропускают только ту часть спектра, которая возбуждает люминесценцию. Запирающие светофильтры поглощают возбуждающее излучение и пропускают свет люминесценции от препарата .

#### Электронная микроскопия позволяет исследовать объекты, размер которых менее 0,2 мкм. Это достигается благодаря тому, что в электронном микроскопе вместо светового пучка используется поток электронов. Его длина волны в 100 000 раз короче длины волны света, что дает возможность добиться разрешающей способности электронного микроскопа до 0,1 – 0,2 нм, а общее увеличение при этом составляет в 1 000 000 раз. Метод электронной микроскопии используют для изучения строения вирусов, тонкой организации различных структур микроорганизмов.

#### **Основные группы микроорганизмов**

**Простейшие** – одноклеточные микроорганизмы, лишены дифференцированной клеточной стенки. Цитоплазма и ядро имеют сложную организацию и соответствуют строению эукариотической клетки. Передвигаются простейшие посредством жгутиков, ресничек и псевдоподий. В неблагоприятных условиях образуют цисты. Представители простейших на уровне рода: Entamoeba, Lamblia, Trichomonas, Leishmania, Toxoplasma, Plasmodium и др.

**Грибы** относятся к эукариотам. Подавляющее большинство грибов аэробы. Грибы гаплоидны (кроме грибов рода Candida), способны к половому размножению. Вегетативно грибы распространяются с помощью гиф или образуют колонии из одиночных клеток (дрожжевидный рост). Гифы- вегетативные нитчатые органы, которые, переплетаясь, образуют мицелий. Репродукция грибов осуществляется спорами (половое размножение) или конидиями (бесполое размножение). Грибные клетки сходны между собой набором основных структур, характерных для эукариот: ядро, митохондрии, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи. Клеточная стенка состоит из микрофибрилл, образованных из хитина, глюканов и маннанов. В мембране содержится большое количество эргостерола. Грибы, имеющие медицинское значение, могут вызывать у человека микозы, микотоксикозы и микогенные аллергии. Представители патогенных грибов, - роды Coccidioides, Histoplasma, Cryptococcus, Epidermophyton и др. Условно-патогенные грибы из родов: Aspergillus, Candida, Pneumocistis и др.

**Бактерии,** по классификации Берджи, делятся на 4 отдела: 1. Бактерии с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные (кокки, палочки, извитые, риккетсии, хламидии);2. Бактерии с толстой клеточной стенкой, грамположительные (кокки, палочки, актиномицеты);3. Бактерии без клеточной стенки (микоплазмы); 4. Архебактерии. Медицинское значение имеют первые три отдела. Среди грамотрицательных шаровидных бактерий различают диплококки – кокки, расположенные попарно, бобовидной формы (Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis). Грамотрицательные цилиндрической формы микроорганизмы называют бактериями, они могут располагаться одиночно (Escherichia coli), попарно(диплобактерии) и в цепочках (стрептобактерии). К извитым формам грамотрицательных бактерий относятся вибрионы, спириллы и **спирохеты.** Вибрионы имеют форму запятой (Vibrio cholerae). Спириллы имеют один и более завитков (Helicobacter pyloridis). В отличие от спирилл, спирохеты лишены дифференцированной клеточной стенки, поэтому легко меняют свою форму, образуя вторичные завитки. Патогенные спирохеты относятся к родам Borrelia, Treponema, Leptospira. Грамположительные кокки могут располагаться попарно – диплококки (Streptoccocus pneumoniae), цепочками – стрептококки (Streptococcus pyogenes), в виде гроздьев винограда – стафилоккоки (Staphylococcus aureus), образовывать пакеты из 8-16 кокков – сарцины или представлять одиночные кокки – микрококки. Грамположительные неспорообразующие палочки могут относиться к родам Corynebacterium (Corynebacterium diphtheriae), Mycobacterium (Mycobacterium tuberculosis). Грамположительные спорообразующие палочки дифференцируются на бациллы и клостридии У бацилл величина споры не превышает ширину палочки (Bacillus anthracis), у клостридий размер споры превышает толщину палочки. Спора может располагаться центрально (Clostridium perfringens), субтерминально (Clostridium botulinum), терминально (Clostridium tetani). Бациллы могут располагаться одиночно, попарно (диплобациллы), цепочками (стрептобациллы).

**Риккетсии** – грамотрицательные микроорганизмы малых размеров, облигатные внутриклеточные паразиты. Обладают выраженным полиморфизмом. Образуют кокковидные, палочковидные и нитевидные формы. Размеры клеток от 0,5 до 3-4 мкм, длина нитевидных форм до 10-40 мкм. Жгутиков не имеют. Спор и капсул не образуют. Патогенные виды: Rickettsia prowazekii, Rickettsia typhi и др.

 **Хламидии –** неподвижные кокковидные бактерии. Облигатные внутриклеточные паразиты. Размножаются в цитоплазме эукариотических клеток. Существуют в двух формах: ретикулярные тельца – внутри клетки, элементарные тельца – вне клетки. Клеточная стенка не содержит мурамовую кислоту или содержит следовые количества. Не способны синтезировать АТФ, получают от клеток хозяина. Патогенные виды: Сhlamydia trachomatis, Сhlamydia psittaci и др.

 **Актиномицеты** – грамположительные бактерии, которые образуют ветвящиеся нити или гифы. Гифы формируют мицелий или распадаются на палочковидные и кокковидные фрагменты. Ультраструктура актиномицетов схожа с бактериями. Размножаются спорами и конидиями. В состав клеточной стенки некоторых актиномицетов входят миколовые кислоты, поэтому они могут обладать кислотоустойчивостью. Патогенными для человека являются представители рода Actinomyces, Nocardia и Rodococcus.

 **Микоплазмы** – прокариоты малых размеров, лишенные клеточной стенки. Клетки имеют только цитоплазматическую мембрану и не способны синтезировать пептидогликан. Это плеоморфные микроорганизмы, по форме представляют сферические или грушевидные структуры (диаметр 0,3 – 0,8 мкм), а также разветвленные или спиральные нити. Как правило, неподвижные. Грамотрицательные. Многие вызывают заболевания у человека, например, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum.

**Вирусы –** мельчайшие микроорганизмы (размеры менее 200 нм), не имеющие клеточного строения и белоксинтезирующей системы, содержащие только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). Вирусы – облигатные внутриклеточные генные паразиты. Отличаются особым дисъюнктивным (разобщенным) способом размножения.

**ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1.Техника микроскопии:

а) ознакомиться с техникой фазово-контрастной и люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии (Работа 1);

б) обсудить схему и принципы действия иммерсионного и электронного микроскопов.

2. Освоить технику иммерсионной микроскопии при изучении сравнительной морфологии микроорганизмов. (Работа 2)

а) определить в готовых препаратах кокковидные и палочковидные формы бактерий;

б) рассмотреть лептоспиры в темнопольном микроскопе;

в) рассмотреть риккетсии в препарате из чистой культуры;

г) рассмотреть вирионы в препарате, обработанном по методу Морозова.

**САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ**

**Работа 1. Ознакомиться с различными методами микроскопии.**

Рассмотреть демонстрационный препарат: «раздавленная» капля из дрожжей,- при иммерсионной и фазово-контрастной микроскопии. Рассмотреть окрашенный флюорохромом препарат из дрожжей под люминесцентным микроскопом. Необходимо обратить внимание на качество изображения объектов. Сравнить способы микроскопии.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Исследуемый материал(материала для приготовления мазка) | **Микроскопический метод исследования** |
| Иммерсионная микроскопия(рис.) | Фазово-контрастная микроскопия(рис.) | Флуоресцентная микроскопия(рис.) |
|  |  |  |  |

 Вывод: (ответить на вопросы: 1. Какие преимущества имеет метод флуоресцентной микроскопии? 2. Какой принцип лежит в основе фазово-контрастной микроскопии?

Работа 2. Изучить морфологию основных групп микроорганизмов: бактерий, спирохет, риккетсий, вирусов.

Окрашенные препараты рассматривают под микроскопом с использованием масляной иммерсии.

Подготовка микроскопа для работы: поднять конденсор до уровня предметного столика, полностью открыть диафрагму, поставить плоское (при естественном освещении) или вогнутое (при искусственном освещении) зеркало. Осветить поле зрения под контролем объектива х 8.

Нанести на препарат каплю масла, положить препарат на столик микроскопа и закрепить зажимами. Установить иммерсионный объектив. Под контролем зрения (смотреть на объектив сбоку!) медленно опустить объектив макровинтом до погружения в масло. Затем, глядя в окуляр, медленно поднимать объектив до появления объекта. Провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, медленно вращая его только в пределах одного оборота.

Рассмотреть демонстрационные микропрепараты под световым микроскопом с масляной иммерсией. Препараты стафилококка, стрептококка, кишечной палочки, стрептобацилл, холерного вибриона, риккетсий Провачека окрашены по Граму. Препарат лептоспир окрашен негативным способом. Вирус оспы – по Морозову.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Микроорганизмы | Рисунок | Метод окраски |
| Бактерии | Стафилококки |  |  |
| Кишечные палочки |  |  |
| Спирохеты | Трепонемы |  |  |
| Риккетсии | РиккетсииПровачека |  |  |
| Вирусы | Вирус натуральной оспы |  |  |

Вывод: ответ на вопрос: как окрашиваются по Граму стафилококки, кишечная палочка?

задания для самостоятельной работы во внеучебное время

заполнить таблицу по микроскопическим методам исследования.

**Методы микроскопии.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид микроскопии | Принцип | Разрешающая способность | Применение |
| Иммерсионная |  |  |  |
| Темнопольная |  |  |  |
| Фазово-контрастная |  |  |  |
| Люминесцентная (флуоресцентная) |  |  |  |
| Электронная |  |  |  |

**Практическое занятие №2.**

**Тема:**«Строение бактериальной клетки».

**Цель:** изучить строение бактериальной клетки, овладеть методами приготовления и окраски микропрепаратов.

**Вопросы для подготовки:**

1. Строение бактериальной клетки, как результат эволюционной адаптации (конкретные примеры: капсула, споры, жгутики и др.).

2. Обязательные и необязательные компоненты бактериальной клетки: химический состав, строение и функция, методы выявления.

3. Понятие о методах окраски бактерий и их назначение. Механизм окраски по Грамму и Цилю-Нильсену .

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА**

В структуре бактериальной клетки выделяют обязательные компоненты: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, нуклеоид, рибосомы и адаптивные компоненты: капсула, спора, жгутики, пили, плазмиды, включения.

#### **Способы приготовления микропрепаратов**

Приготовление препаратов для изучения микроорганизмов

в живом состоянии

Метод «висячей капли».

В центр покровного стекла наносят небольшую каплю взвеси микроорганизмов. К покровному стеклу прижимают предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, так чтобы капля взвеси оказалась в центре лунки. Затем предметное стекло с прилипшим к нему покровным быстро переворачивают. Капля оказывается в герметичной влажной камере, при этом она должна свободно висеть над лункой, не касаясь дна и краев. Готовый препарат сначала рассматривают под увеличением х8, затем переходят на увеличение х40.

Метод «раздавленной капли».

На предметное стекло наносят каплю исследуемой жидкости и накрывают ее покровным стеклом. Для этого покровное стекло ставят к краю капли и быстро его опускают. При этом стекла прижимаются, а жидкость не должна выходить за пределы покровного стекла.

Высушивание и фиксация мазка. После приготовления мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки (избегая сильного нагревания мазка). Затем высушенный мазок фиксируют. Фиксированный мазок называют препаратом. При фиксации происходит гибель микроорганизмов, они лучше воспринимают красители, чем живые, и при окраске не смываются. Применяют физический и химический способы фиксации.Физический способ фиксации. Предметное стекло мазком вверх трижды проводят над пламенем горелки (в течение 3-5 секунд).Химический способ фиксации заключается в обработке мазка фиксирующими жидкостями: этиловым спиртом- (10-15 минут), жидкостью Никифорова (смесь этилового спирта и наркозного эфира - 1:1) – 10-15 минут и др.

Окраска препаратов

Различают простые и сложные методы окраски. Простые методы делят на позитивные и негативные.

При простом методе применяют один краситель. Например метиленовый синий, водно - спиртовой раствор фуксина. Простой метод окраски является ориентировочным и позволяет обнаружить микроорганизмы в микроскопируемом материале, определить их количество, форму и взаиморасположение.

Сложные методы окраски подразумевают использование более одного красящего вещества. Кроме красящих веществ при сложных методах окраски применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты. Сложные методы окраски являются дифференциальными и позволяют выявить химические и структурные особенности бактериальной клетки.

**Сложные методы окраски**

 Окраска по методу Грама. Метод основан на способности микроорганизмов удерживать образующийся при окраске комплекс генцианового фиолетового и йода. Это связано с особенностями строения и химического состава грамположительных и грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий на поверхности клеток есть магниевые соли рибонуклеиновой кислоты, которые прочно связывают комплекс генцианового фиолетового с йодом и препятствуют его вымыванию спиртом. Кроме того, грамположительные бактерии имеют более выраженный пептидогликановый слой, в котором после обработки спиртом сужаются поры, что также делает невозможным вымывание красителя. В результате грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет.У грамотрицательных бактерий отсутствуют магниевые соли рибонуклеиновой кислоты, пептидогликановый слой значительно тоньше, а размеры пор шире. Поэтому при обработке спиртом краситель легко вымывается, бактерии обесцвечиваются и при использовании дополнительного красного красителя окрашиваются в красный цвет.

Окраска по Цилю- Нильсену. Применяется для дифференциации кислотоустойчивых и некислотоустойчивых микроорганизмов. Устойчивость бактерий к кислоте обусловлена повышенным содержанием в клеточной стенке и цитоплазме липидов, воска и оксикислот. Принцип основан на том, что кислотоустойчивые бактерии за счёт содержания указанных веществ прочно связывают карболовый фуксин при нагревании (т.е. окрашиваются в красный цвет) и не обесцвечиваются кислотой. Некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются серной кислотой и при использовании дополнительного красителя- метиленового синего окрашиваются в синий цвет. Споры кислотоустойчивы, поэтому красятся в красный цвет .

**ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Строение бактериальной клетки (Работа 1.)

а) Жгутики

* + рассмотреть препарат из бактерий со жгутиками, окрашенный по Грею;

обнаружить движение бактерий при темнопольной микроскопии в препарате «раздавленная» капля;

б) Капсула. Рассмотреть препарат из бактерий (клебсиелла с капсулой), окрашенный по Бурри-Гинсу;

в) Внутриклеточные включения. Рассмотреть препарат из дифтерийных палочек с зернами волютина, окрашенный метиленовой синькой;

г) Споры бактерий

* + рассмотреть препарат из палочек со спорами, окрашенный по Граму;

д) Клеточная стенка. Рассмотреть препарат плазмолиз дрожжей, окраска по Бурри-Гинсу.

 2. Методика изготовления окрашенных и неокрашенных микропрепаратов (Работа 2):

а) приготовить из агаровой культуры препарат и окрасить метиленовым синим или фуксином;

б) приготовить из взвеси дрожжей препарат и окрасить негативным методом.

**САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ**

**Работа 1**

**Цель:**Изучить компоненты бактериальной клетки.

Рассмотреть демонстрационные препараты в световом микроскопе с масляной иммерсией:

1) Плазмолиз дрожжей, окраска по Бурри-Гинсу;

2) Палочка со спорой, окраска по Граму;

3) Палочка со жгутиками, импрегнация серебром

4) Палочка с капсулой в органе, окраска фуксином

5) Дифтерийная палочка с зернами волютина, окраска метиленовым синим.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонентбактериальной клетки | Исследуемый материал | Метод обнаружения, окраска | Результат (рисунок с обозначениями) |
| Клеточная стенка |  |  |  |
| Капсула |  |  |  |
| Споры |  |  |  |
| Жгутики |  |  |  |
| Внутриклеточные включения |  |  |  |

Вывод: ответы на вопросы:

1. Какое функциональное значение имеют изученные компоненты бактериальной клетки?

2. Какие два рода клинически значимых спорообразующих микроорганизмов Вы знаете? Чем они отличаются друг от друга по морфологическим свойствам?

**Работа 2.**

**Цель:**Овладеть методом приготовления и простой окраски микропрепаратов из чистой культуры бактерий.

I. Приготовление препарата из агаровой культуры

Для приготовления мазка необходимо взять чистое обезжиренное стекло. На предметном стекле обозначают стеклографом место нанесения материала. На обратную сторону стекла от обозначенного места наносят петлей каплю физиологического раствора. В левую руку берут пробирку с агаровой культурой, а в правую - петлю за петледержатель. Петлю обжигают на пламени горелки. Пробку прижимают к ладони 4 и 5 пальцами и медленными вращающими движениями извлекают из пробирки. Край пробирки обжигают. Петлю вводят в пробирку и остужают о стенки. Скользящим движением петлей берут материал и осторожно, не задевая о стенки, извлекают. Пробирку снова обжигают и закрывают пробкой.

В каплю физиологического раствора вносят исследуемую культуру и смешивают петлей до образования слегка мутноватой взвеси. Полученную взвесь равномерно распределяют на поверхности стекла, чтобы диаметр мазка был 1 – 1,5 см. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют, для этого проводят стекло над пламенем горелки три раза, при этом мазок должен быть сверху. Препарат окрашивают фуксином (1-2 мин) или метиленовой синькой (3-5 мин).

Для окраски негативным способом на стекло наносят каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе и смешивают с каплей туши. Препарат высушивают.

Протокол исследования:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Позитивный метод окраски | Негативный метод окраски тушью (рис.) |
| Фуксином (рис.) | Метиленовым синим (рис.) |
|  |  |  |

Обозначения к рисункам:

1. Название микроорганизма.

2. Фон (окрашен/не окрашен)

Вывод: ответ на вопросы:

1. Какие красители наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов?

2. В чем преимущества негативной окраски микроорганизмов?

3. Почему в микробиологических исследованиях используется метод иммерсионной микроскопии (преимущества метода)?

задания для самостоятельной работы во внеучебное время

Заполнить таблицу **«Обязательные и необязательные компоненты бактерий»**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пп | Обязательные компоненты | Необязательные компоненты |
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |
| 4 |  |  |
| 5 |  |  |
| 6 |  |  |

**Раздел 2: «ФИЗИОЛОГИЯ МИКРОРГАНИЗМОВ»(2 практических занятия)**

**Практическое занятие № 1.**

**Тема:** Условия культивирования микроорганизмов. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.

**Цель:** Изучить условия культивирования бактерий и овладеть бактериологическим методом диагностики инфекционных заболеваний.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Физиологическая роль питания и дыхания у бактерий.

2.Ферменты бактерий и их практическое использование. Биотехнология.

3.Дифференциация микроорганизмов по типу дыхания, питания и отношению к температуре.

 4.Динамика роста бактериальной популяции в жидкой питательной среде.

 5.Практическое использование знаний о физиологии микроорганизмов. Условия культивирования бактерий:

а) типы питательных сред;

б) культивирование облигатных паразитов;

 в) культивирование анаэробов.

6. Правила забора и транспортировки исследуемого материала для бактериологического исследования.

7. Правила оформления направления на бактериологическое исследование.

8. .Методы выделения чистых культур микроорганизмов.

9. Бактериологический метод диагностики. Цель. Этапы. Диагностическая ценность.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА**

Микроорганизмам как всему живому присущи три основных физиологических функции: питание, дыхание и размножение.

**Питание** необходимо для синтеза в клетке всех органических структур, оно осуществляется с поглощением энергии. Основным источником энергии являются окислительно-восстановительные процессы (дыхание). По типу питания микробы делятся на **аутотрофы и гетеротрофы.** Аутотрофы усваивают азот и углерод из неорганических веществ (СО2 и др.), а гетеротрофы – из сложных органических соединений (аминокислоты, моносахара и др.), синтезированных ранее другими живыми организмами. Гетеротрофы в свою очередь делятся на **сапрофиты и паразиты**. Сапрофиты нуждаются в органических соединениях мертвого субстрата (возбудители газовой инфекции:Cl. рerfringens и др.), а паразиты получают питательные вещества в организме-хозяине. Паразиты могут быть облигатными (внутриклеточными) и факультативными. Облигатные внутриклеточные паразиты (вирусы) лишены способности жить и размножаться вне клеток хозяина, так как зависят от их метаболизма. Факультативные паразиты (гонококки, стрептококки, шигеллы и др.) могут питаться как в организме, так и вне его, так как обеспечены автономными ферментными системами преобразования веществ и энергии.

**Дыхание** микроорганизмов – биологическое окисление субстрата с выделением необходимой для метаболизма энергии. По типу дыхания микроорганизмы делятся на 3 основных группы: **аэробы, анаэробы, факультативные анаэробы/аэробы.** Аэробы могут жить только в присутствии кислорода (V.cholerae), анаэробы (облигатные) только в отсутствии кислорода (Cl.tetani), факультативные анаэробы могут жить при любом процентном содержании кислорода и без него (St.aureus).

**Размножение** бактерий осуществляется путем простого поперечного деления клетки.

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на **термофилы (**диапазон роста 50 - 70оС), **мезофилы (**диапазон роста 20 - 40оС) и **психрофилы (**диапазон роста 0 - 10оС). Большинство патогенных для человека бактерий относятся к группе мезофилов.

**Культивирование** микроорганизмов осуществляют при создании ряда условий с учетом типов питания, дыхания, отношения к температуре и скорости размножения.

Для культивирования сапрофитов и факультативных паразитов используют исскусственные питательные среды, которые по своему назначения бывают **простые, элективные и дифференциально-диагностические,** а по консистенции – жидкие, полужидкие и плотные. Простые среды: мясо-пептонный бульон и мясо-пептонныйагар, пригодны для выращивания большинства бактерий. Элективные среды позволяют культивировать определенный вид или виды микроорганизмов: щелочная пептонная вода для холерного вибриона, среда Китта-Тароцци для облигатных анаэробов. Дифференциально-диагностические среды используют для изучения биохимичесих свойств микроорганизмов: среда Эндо, стафитесты.

Культивирование облигатных внутриклеточных паразитов осуществляют на «живых» средах: культуре клеток, курином эмбрионе, экспериментальном животном.

Создание особых условий **анаэробиоза** требуется при культивировании облигатных анаэробов. При этом используют особые приборы и среды: анаэростат, эксикатор, среды Вильсона-Блер, Китта-Тароцци и др.

Подавляющее большинство объектов изучения медицинской микробиологии культивируют при температуре 37оС в специальном приборе **термостате** в течение18 -24 часов.

**Бактериологический метод** является основным методом диагностики инфекционных заболеваний. Его сущность – определение вида возбудителя инфекции, следовательно, на основании результатов бактериологического метода можно поставить этиологический (окончательный) диагноз. Основным недостатком метода является длительность исследования – от 3 до 5 суток, а в отдельных случаях и более.

Успех проведения бактериологического метода во многом зависит от предварительного этапа, включающего забор исследуемого материала и его транспортировку, оформление направления в бактериологическую лабораторию. При этом необходимо соблюдение ряда правил.

1. **Забор** исследуемого материала необходимо провести до начала антибактериальной терапии или через 8-10 часов после введения последней дозы антибиотика. Чтобы избежать загрязнения пробы микрофлорой окружающей среды необходимо соблюдать строжайшую асептику. Для этого использовать стерильный материал: а) ватные тампоны для взятия материала из раны, со слизистых оболочек (глаз, зева, носа); б) проволочную петлю для взятки материала из влагалища, анального отверстия; в) шприц для взятия крови, гноя; г) стерильную посуду для непосредственного сбора в нее мочи, мокроты, испражнений.
2. **Транспортировку** полученного материала следует производить в максимально короткие сроки (2-3 часа) в специальных биксах или пеналах.
3. **Направление** прилагают к клиническому образцу в качестве сопроводительного документа. Оно содержит основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования:
* фамилия, имя, отчество, возраст пациента;
* предполагаемый диагноз заболевания;
* предшествующая антимикробная терапия;
* характер материала;
* дата и время взятия материала;
* цель исследования;
* название лечебного учреждения, номер отделения, палаты;
* подпись лечащего врача.

Бактериологический метод осуществляется в два этапа:

1. Выделение чистой культуры возбудителя (1-2 суток);
2. Идентификация чистой культуры (1-3 суток).

На первом этапе проводится посев исследуемого материала на твердую или в жидкую питательную среду, оценка культуральных свойств, отбор подозрительных колоний и их отсев на скошенный агар. Этап идентификации включает обязательное изучение морфологии, биохимических свойств и антигенной структуры выделенной чистой культуры, а также проведение дополнительных исследований по определению антибиотикочувствительности, фагочувствительности, фаготипирования, изучения патогенности и персистентных свойств.

**САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ К ЗАНЯТИЮ.**

**Работа 1**

**Цель:** Освоить бактериологический метод диагностики.

**Задача**. В бактериологическую лабораторию поступил исследуемый материал (испражнения) от больного с предварительным диагнозом: «Пищевая токсикоинфекция?». При микроскопии материала обнаружены грамположительные кокки и грамотрицательные палочки.

Выделите чистые культуры микроорганизмов, проведите их идентификацию. Определете этиологию пищевойтоксикоинфекции.

**Методика:**

Все этапы бактериологического метода условно осуществляются в течение одного занятия: студент выполняет манипуляции очередного этапа, относит материал в термостат и сразу получает готовый результат для выполнения следующего этапа исследования.

1. Посев исследуемого материала на агар в чашке Петри методом механического разобщения с целью получения отдельных колоний (1-ый день).

Простерилизованной в пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и вносят в чашку, слегка приоткрыв крышку. На поверхности питательной среды материал распределяют петлей следующим образом: у края чашки частыми штрихами образуют овальную площадку, на которой остается значительная часть материала, затем проводят параллельные штрихи на расстоянии 0,5 см от одного края чашки к другому. При посеве петлю следует держать параллельно агару, чтобы не царапать его. После рассева петлю вынимают из чашки и немедленно обжигают в пламени, одновременно закрывая чашку Петри крышкой. Чашку маркируют и помещают вверх дном в термостат на сутки.

2.Изучение культуральных свойств выросших колоний (2-ой день).

Через сутки при правильном посеве на последних штрихах вырастают отдельные колонии. Дифференцируют разные типы колоний по величине, цвету , форме, прозрачности, характеру поверхности (гладкая, шероховатая) и края (ровный, зазубренный) . Из материала части колоний готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Остаток изучаемой колонии отсевают петлей в пробирку на скошенный питательный агар для получения чистой культуры. Посев ставят в термостат на сутки.

 3. Идентификация выделенной чистой культуры (3-ий день).

Через сутки выросшую чистую культуру идентифицируют по основным видовым признакам. Изучают морфологию при микроскопии мазка из чистой культуры. Осуществляют посев чистой культуры на дифференциально-диагностические тест-системы (стафитест, энтеротест) для изучения биохимической активности. Для этого готовят 1-миллиардную взвесь бактерий в физиологическом растворе, затем дозаторными или пастеровскими пипетками вносят 0,1 мл взвеси в лунки тест-системы. Планшет относят в термостат на сутки.

 4. Определение вида выделенных микроорганизмов (4-ый день).

Через 24 часа оценивают результаты биохимической активности по изменению цвета индикатора в лунке и сопоставляют их с дифференцирующими таблицами тест-системы. По результатам изучения свойств выделенных чистых культур определяют виды микроорганизмов, что является одной из конечных целей бактериологического метода диагностики. Используют определитель Берджи.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| 1 этапВыделение чистой культуры бактерий | 2 этап |
| 1 день | 2 день  | 3 день |
| Исследуемый материал | Микроскопия исследуемого материала(рис.) | Метод выделения чистой культуры | Среда для посева | Характеристика колоний | Микроскопия колоний(рис.) | Микроскопия чистой культуры(рис.) |

|  |
| --- |
| 2 этап. Идентификация чистой культуры |
| 4 деньБиохимические свойства |
| Энтеротест |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Стафитест |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. Виды выделенных микроорганизмов (латинская транскрипция). 2. Можно ли на основании полученных результатов сделать заключение об этиологии ПТИ? Почему?).

**Работа 2**

**Методы культивирования анаэробов**

**Цель**: Изучить методы культивирования анаэробов.

**Методика:**

1. Рассмотреть прибор анаэростат и ознакомиться с принципом его работы.

Анаэростат – прибор для создания бескислородной воздушной среды представляет собой толстостенную металлическую емкость для помещения чашек Петри или пробирок. Система газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и замерять давление (рис. 2.4.б).

1. Ознакомиться с условиями создания анаэробиоза в эксикаторе (свеча, тиогликолевая кислота).

Эксикатор – толстостенная стеклянная емкость с притертой крышкой и подставкой для чашек Петри. На дно эксикатора ставится горящая свеча либо наливается тиогликолевая кислота (химический редуцент кислорода), затем крышка притирается (рис. 2.4.а).

3. Рассмотреть чашку с сокультивированием аэробов и анаэробов (способ Фортнера).

В чашку Петри на поверхность питательного агара, разделенного пополам посредине чашки, производят посев на одной половине аэробов, на другой – анаэробов. Чашку герметизируют парафином и помещают в термостат. При остаточном кислороде растут аэробы, после его утилизации начинают расти анаэробы.

4. Рассмотреть и изучить состав специальных сред для культивирования анаэробов.

Среда Китта-Тароцци - питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных. Глюкоза и кусочки органов обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла. Среда контроля стерильности (СКС) – 0,3% агар с добавлением тиогликолевой кислоты (редуцент О2), посев уколом.

Среда Вильсона-Блер – высокий столбик питательного агара с добавлением солей натрия и железа, посев уколом. Анаэробы образуют черные колонии в глубине столбика за счет химической реакции с солями металлов.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| **Методы, среды** | **Условия создания анаэробиоза** |
| 1. Физический.
2. Химический
3. Биологический
4. Специальные среды;
* Китта-Тароцци;
* Вильсона-Блер;
* СКС (среда контроля стерильности);
* Высокий столбик агара.
 |  |

 **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ**

**РАБОТЫ ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1. Основные процессы, составляющие физиологию микроорганизмов
2. Группы бактерий по типу дыхания
3. Питательные среды для культивирования облигатных анаэробов
4. Группы бактерий по способности утилизировать углерод и азот
5. На какие группы классифицируют гетеротрофы?
6. На какие группы классифицируют паразиты?
7. Дать определение облигатным паразитам

1. Дайте определение колоний2. Дайте определение чистой культуре бактерий3. Перечислите принципы выделения чистых культур бактерий4.Назовите этапы бактериологического метода диагностики5. По каким обязательным критериям проводят идентификацию чистой культуры?6. Какие дополнительные признаки определяют у чистой культуры?1. Назвать условия культивирования бактерий
2. Назовите типы питательных сред по назначению
3. Перечислите способы размножения бактерий
 | Питание, дыхание, размножение, изменчивость.1. Облигатные аэробы
2. Облигатные анаэробы
3. Факультативно-анаэробные микроорганизмы
4. Микроаэрофилы

Среда Китта-Тароцци, среда Вильсона-Блер, СКС.Аутотрофы, гетеротрофыСапрофиты и паразитыОблигатные и факультативныеМикроорганизмы, полностью лишенные способности жить вне клеток живого организма (вирусы, риккетсии, хламидии)Потомство одной клетки при размножении на твердой питательной средеПопуляция микроорганизмов, состоящая из особей одного вида1. Механическое разобщение микроорганизмов при посеве
2. Использование биологических свойств бактерий
3. Выделение чистой культуры
4. Идентификация чистой культуры
5. Морфология
6. Биохимические свойства
7. Антигенная структура

1.Антибиотикорезистентность2. Фаготипирование3. Факторы патогенности и персистенции1. Питательная среда
2. Оптимальная температура
3. Аэробные или анаэробные условия
4. Время культивирования
5. Простые
6. Элективные
7. Дифференциально-диагностические

1.Поперечное деление |  | Потомство одной клетки при размножении на твердой питательной средеПопуляция микроорганизмов, состоящая из особей одного вида1. Механическое разобщение микроорганизмов при посеве
2. Использование биологических свойств бактерий
3. Выделение чистой культуры
4. Идентификация чистой культуры
5. Морфология
6. Биохимические свойства
7. Антигенная структура

1.Антибиотикорезистентность2. Фаготипирование3. Факторы патогенности и персистенции |

 **ПИСЬМЕННОЕ ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

 **ВО ВНЕУЧЕБНОЕ ВРЕМЯ**

В тетради для практических занятий составить и заполнить таблицу.

Таблица. Характеристика этапов бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Объект исследования  | Этап выделения чистой культуры(методика) | Этап идентификации чистой культуры (методика) | Результат исследования |
| 1. Исследуемый материал | 1.2.3. |  |  |
| 2. Чистая культура бактерий |  | 1.2.3. |  |

**Практическое занятие № 2**

**Тема:** Действие физических и химических факторов на микроорганизмы. Антибиотики

**Цель:** Изучить действие физических и химических факторов на микроорганизмы, ознакомиться с практическим использованием в медицине результатов действия абиотических факторов на микроорганизмы и усвоить принципы микробиологической оценки качества стерилизации.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. .Факторы внешней среды, действующие на микроорганизмы.
2. Результаты действия факторов внешней среды на микроорганизмы.
3. Условия, определяющие результат действие факторов.
4. .Практическое использование знаний о воздействии факторов внешней среды на микробы – культивирование, стерилизация, дезинфекция, антисептика, химиотерапия.
5. Понятие об асептике.
6. Антибиотики. Определение. Природа, происхождение, спектр, механизмы и результаты действия на микроорганизмы.
7. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и пути ее преодоления.
8. Осложнения антибиотикотерапии.
9. Бактериоцины. Свойства. Практическое значение.
10. Бактериофаги. Природа и свойства. Этапы взаимодействия с клеткой. Практическое использование.
11. Эубиотики. Природа, механизм действия. Практическое использование.
12. Механизмы генотипической изменчивости – мутации, трансформация, трансдукция, лизогенная конверсия, конъюгация.
13. Метод молекулярной гибридизации (ДНК-зондирование), ПЦР в диагностике заболеваний.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ СПРАВКА**

 Химические и физические факторы внешней среды при действии на микроорганизмы в зависимости от совокупности условий (природа фактора, вид микроорганизма, физиологическое состояние микроба, интенсивность фактора, экспозиция, сочетанное действие факторов) оказывают благоприятное, губительное или индифферентное действие. Благоприятное действие факторов внешней среды используют при создании условий для культивирования микроорганизмов, что необходимо в диагностике (бактериологический метод) и в биотехнологической промышленности (например, производство антибиотиков). В практическом здравоохранении для проведения профилактических и лечебных мероприятий широко используют губительное действие физических и химических факторов на микроорганизмы с целью обеззараживания объектов внешней среды, уничтожения микробов на поверхности и в организме человека.

 **Стерилизация –** уничтожение всех форм жизни в объектах внешней среды с использованием преимущественно физических факторов. К методам стерилизации относят кипячение, фильтрование, автоклавирование, воздействие ультрафиолетовыми лучами – УФЛ и др.

 **Дезинфекция –** уничтожение патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды с использованием преимущественно химических веществ - дезинфектантов. Наиболее часто используют производные хлора и фенолов, кислоты, щелочи, детергенты.

 **Пастеризация** – уничтожение вегетативных форм патогенных и гнилостных микроорганизмов в продуктах питания путем прогревания последних при температурах ниже 900С.

 **Антисептика –** уничтожение патогенных микроорганизмов на поверхности тела человека и в ране с использованием химических веществ – антисептиков. С этой целью широко используются спирты, анилиновые красители, йод, растворы фурациллина, риванола и др.

 **Химиотерапия –** уничтожение патогенных микроорганизмов в организме человека на основе избирательного действия химиотерапевтических препаратов. К основным группам химиотерапевтических препаратов относят антибиотики, сульфаниламиды, производные различных химических веществ.

 **Асептика –** комплекс мероприятий (стерилизация, дезинфекция, антисептика, химиотерапия), направленный на предотвращение попадания микробов в заведомо стерильный объект (например, в операционную рану).

К биологическим факторам, действующим на микроорганизмы, относят:

1. Микробные ассоциации;
2. Продукты жизнедеятельности других живых организмов (антибиотики, бактериоцины);
3. Факторы защиты макроорганизма (антитела, фагоциты, лимфоциты);
4. Бактериофаги (вирусы бактерий).

В практике здравоохранения с целью этиотропной терапии и профилактики широко применяют **антибиотики, бактериофаги и эубиотики.**

**Антибиотики –** продукты жизнедеятельности живых организмов или их синтетические аналоги, избирательно подавляющие жизнедеятельность других живых организмов или опухолевых клеток. По происхождению выделяют антибиотики растительного (фитонциды), животного (лизоцим) и микробного (пенициллин) происхождения, а также полусинтетические (ампициллин) и синтетические (хлорамфеникол) препараты. Механизм действия антибиотиков связан с точами их приложения в бактериальной клетке. Выделяют антибиотики, действующие на синтез белка на рибосомах, структуру клеточной стенки, цитоплазматическую мембрану, синтез нуклеиновых кислот. Антибиотикотерапия, как вариант химиотерапии, влечет за собой ряд побочных явлений, связанных с точками приложения и химической структурой антибиотика (токсическое действие, дисбиоз, аллергия, иммуносупрессия и др.). В связи с этим для уменьшения побочных эффектов разработаны и применяются принципы рациональной антибиотикотерапии:

1. Обоснование показаний к антибиотикотерапии;
2. Выбор антибиотика по спектру действия;
3. Подбор дозы в расчете на кг веса;
4. Оптимальная кратность введения препарата;
5. Сочетание антибиотиков с различными точками приложения;
6. Определение чувствительности возбудителя к антибиотикам (индивидуальная антибиотикограмма) .

**Бактериофаги –** вирусы бактерий, специфически взаимодействующие с бактериальной клеткой. По типу взаимодействия различают **вирулентные и умеренные** бактериофаги. **Вирулентные** бактериофаги в результате своей репродукции вызывают лизис бактериальной клетки и используются в диагностике для фаготипирования бактерий ,а также для экстренной специфической профилактики и специфической терапии инфекций. **Умеренные** бактериофаги интегрируются в геном бактериальной клетки и вызывают изменение ее свойств – **лизогенную конверсию.** Явление лизогении и умеренные бактериофаги широко используются в генной инженерии в качестве материала и средства управляемой генетической изменчивости бактерий с целью придания им новых, полезных для человека свойств.

**Эубиотики –** препараты, содержащие живые антагонистически активные бактерии из состава нормальной микрофлоры. Механизм действия биопрепаратов основан на их антагонистическом конкурентном влиянии на патогенные микроорганизмы посредством выделения бактериоцинов и других факторов антагонизма. Эубиотики используются для лечения и профилактики дисбиозов, острых кишечных инфекций.

**Бактериоцины –** вещества белковой природы с узким спектром антимикробного действия.

**Генетика** микроорганизмов – одно из наиболее актуальных и перспективных направлений микробиологической науки. Генетический контроль в бактериальной клетке осуществляют ДНК нуклеоида и ДНК плазмид. Передача генетического материала осуществляется по наследству (вертикально) от материнской клетки дочерним при бинарном делении, а также между отдельными особями в бактериальной популяции (горизонтально). Основными механизмами генотипической изменчивости бактерий являются **мутации и рекомбинации. Мутации** являются следствием изменений в первичной структуре ДНК бактериальной клетки, бывают спонтанными и инцуцированными. **Рекомбинации** включают перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту. В зависимости от механизма рекомбинаций выделяют: **конъюгацию –** передачу генетической информации от клетки-донора (F+) клетке-реципиенту (F-) через конъюгативный канал; **трансформацию –** активное включение донорского генетического материала клеткой-реципиентом из субстрата; **трансдукцию –** перенос генетического материала от донора реципиенту с помощью бактериофага. Изучение генетического аппарата микроорганизмов, форм и механизмов генетической изменчивости определило развитие прикладной науки – **генной инженерии,** основными задачами которой на современном этапе являются: создание новых вакцин, производство гормональных и ферментных препаратов, разработка современных молекулярно-генетических методов диагностики. В основе методов молекулярной гибридизации (ДНК-зонд, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др.) лежит способность однонитчатой ДНК (зонд, праймер) достраиваться и взаимодействовать по принципу комплементарности с ДНК искомого возбудителя при ее наличии в исследуемом материале.

**ПЛАН САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Действие физических и химических факторов на бактерии:

* поставить опыт по действию карболовой кислоты на взвесь стафилококка (Работа 1);
* учесть результат опыта по действию УФЛ на бактерии (Работа 2).

2. Практическое применение действия факторов внешней среды на микроорганизмы:

* ознакомиться с устройством и работой автоклава – экскурсия в автоклавную (Работа 3);

САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

**Работа 1**

**Цель**: Оценить действие карболовой кислоты на стафилококк.

**Задача**. Лабораторную посуду после работы с патогенным стафилококком необходимо подвергнуть дезинфекции 5% карболовой кислотой.

Отработайте временной режим губительного действия карболовойкилосты на стафилококк.

**Методика:**

1. Пастеровской пипеткой добавляют 5 капель взвеси стафилококка в пробирку с 1 мл 5% карболовой кислоты.
2. Из пробирки с карболовой кислотой 4-5 капель жидкости засевают на скошенный агар: первый раз – через 10, а второй раз через 30 минут после начала опыта.
3. Посевы помещают в термостат на 24 часа.
4. Через сутки учитывают результаты опыта. Просматривают пробирки и определяют наличие или отсутствие роста микроба.

Результат работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Вид бактерий | Результат действия 5% карболовой кислоты |
| Через 10 минутРост (есть, нет) | Через 30 минутРост (есть, нет) |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. От чего зависит результат эффективного действия карболовой кислоты на стафилококк? 2. Какой режим обработки лабораторной посуды Вы рекомендуете?).

 **Работа 2**

**Цель**: Оценить действие УФЛ на взвесь неспорообразующих бактерий.

**Задача**. При посеве воздуха из операционной выделена культура золотистого стафилококка. Необходимо установить эффективный временной режим стерилизации воздуха операционной ультрафиолетовыми лучами.

**Методика:**

1. Готовят 1-миллиардную взвесь выделенного стафилококка по стандарту мутности. Для этого чистую культуру микроба суспензируют в 2 мл стерильного физиологического раствора.
2. Производят посев шпателем по 0,1 мл взвеси стафилококка напитательныйагар в две чашки Петри для получения сполошного роста бактерий. Для этого на поверхность агара наносят пипеткой 0,1 мл взвеси и затем стерильным шпателем осторожно гладящими движениями распределяют материал по всей поверхности чашки. Шпатель и пипетку помещают в стакан с дезраствором.
3. С чашек Петри после посева снимают крышки, прикрывают чашки картоном, в центре которого вырезана буква «М».
4. Помещают чашки под лучи кварцевой лампы на расстоянии 30-40 см на 10 минут и на 30 минут соответственно.
5. После облучения чашки накрывают крышками, маркируют и помещают в термостат на 18-24 часа.
6. Через сутки учитывают результат опыта. Определяют наличие стерильной зоны в виде буквы «М» на фоне сплошного роста стафилококка при эффективном режиме кварцевания (рис.2.6.).

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Вид бактерий | Результат действия УФЛ |
| Экспозиция 10 мин. (рис.) | Экспозиция 30 мин (рис.) |
|  |  |  |

Вывод: (ответить на вопрос:Какой режим воздействия УФЛ Вы рекомендуете для стерилизации операционной и почему?).

**Работа 3**

**Цель:** Ознакомиться с правилами и режимом работы автоклава, основными методами стерилизации.

**Методика:**

1. Внимательно прослушать информацию во время экскурсии в автоклавную.
2. Ознакомиться с устройством, правилами и режимом работы автоклава (рис.2.5.б).
3. Ознакомиться с принципами основных методов стерилизации.
4. Изучить методы контроля стерильности сред и материалов.
5. Оформить протокол исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Метод стерилизации | Действующие факторы | Режим стерилизации | Контроль качества стерилизации |
| 1. Автоклавирование
2. Сухожаровой шкаф
3. Дробная стерилизация
 |  |  |  |

**Самостоятельная работа студентов к занятию:**

1. Изучить действие антибиотиков на бактерии:

* определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом диффузии в агар (индикаторных дисков) (Работа 1);
* определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом серийных разведений (Работа 2).

2. Изучить действие бактериофагов.

* учесть результаты реакции фаготипирования (Работа 3);

 **САМОСТОЯТЕЛЬНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ**

**Работа 1**

**Цель**: Овладеть навыком определения чувствительности бактерий к антибиотикам методом индикаторных дисков.

**Задача**. В клинику поступил больной с диагнозом «Стафилококковая пневмония». Для успешного этиологического лечения с целью выбора эффективного антибиотика было рекомендовано определение антибиотикограммы возбудителя. Проведите исследование. Оцените результат. Сделайте вывод.

**Методика:**

1. Исследуемую культуру суспензируют в 2 мл стерильного физиологического раствора и готовят 1-миллиардную взвесь по стандарту мутности.
2. Бактериальную взвесь (1 мл) стерильной пипеткой наливают на поверхность среды в чашку Петри и равномерно распределяют путем покачивания (либо шпателем). Избыток жидкости удаляют пастеровской пипеткой. Шпатель и пипетки помещают в стакан с дезраствором.
3. На различные участки засеянногоагара пинцетом помещают диски с антибиотиками (6-8), стараясь не касаться агара. Диск пинцетом слегка прижимают к агару.
4. Чашки с посевами помещают в термостат на 18-24 часа.
5. Через сутки проводят оценку результата опыта путем измерения зоны задержки роста (в мм) бактерий по диаметру, включая бумажный диск (Рис.2.7.).

Результаты выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

Шкала оценки чувствительности бактерий к антибиотикам

|  |  |
| --- | --- |
| Размер зоны задержки роста в мм | Чувствительность  |
| До 10 ммБолее 10 мм | Не чувствителенЧувствителен |

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид возбудителя | Результат посева на чувствительность к антибиотикам (рисунок с обозначениями) | Величина зон задержки роста ( в мм) |
| Антибиотики  |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: 1. К каким антибиотикам чувствителен выделенный возбудитель? Какой антибиотик Вы рекомендуете для лечения и почему?).

**Работа 2**

**Цель**: Определить чувствительность бактерий к антибиотикам методом серийных разведений.

**Задача**. С целью назначения больному рациональной схемы лечения пенициллином потребовалось определить бактериостатическую и бактерицидную концентрацию препарата по отношению к возбудителю – золотистому стафилококку.

**Методика:**

1. В пробирки разливают стерильный мясо-пептонный бульон (МПБ) по 1 мл.
2. Добавляют исследуемый антибиотик в различных концентрациях: от 1 ед/мл до 128 ед/мл.
3. Заливают в пробирки 18-часовую бульонную культуру стафилококка по 1 мл.
4. Инкубируют посевы в термостате 24 часа.
5. Через сутки учитывают результаты опыта:

а) Определяют минимальную подавляющую (бактериостатическую) концентрацию антибиотика (МПК). За нее принимают наименьшую концентрацию антибиотика, при которой не происходит размножение бактерий, и содержимое пробирки остается прозрачным.

б) Определяют минимальную бактерицидную концентрацию антибиотика (МБК). Для этого из пробирок с отсутствием видимого роста и из пробирки с минимальной концентрацией антибиотика, где рост есть (контроль), производят высев секторами на мясо-пептонныйагар в чашки Петри. На секторах обозначают концентрацию антибиотика, из которой сделан высев. Чашки относят в термостат на 18-24 часа.

6. Через сутки просматривают чашки и определяют МБК по отсутствию роста бактерий на агаре в соответствующих секторах.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентрация антибиотика в МПБ (ед/мл) | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | К |  |
| Наличие роста микроба в МПБ (мясо-пептонный бульон) |  |  |  |  |  |  |  |  |  | МПК |
| Наличие роста микроба при высеве на МПА (мясо-пептонныйагар) |  |  |  |  |  |  |  |  |  | МБК |

Вывод: (ответить на вопросы: Почему МБК выше, чем МПК? Может ли быть наоборот? Почему?).

**Работа 3**

**Цель**: Определить фаготип исследуемой культуры.

**Задача**. В районе произошла вспышка брюшного тифа. Из воды у места водозабора выделен возбудитель S.typhi. С целью установления пути распространения инфекции рекомендовано определить фаготипы выделенных бактерий (из воды и от больных людей). Оцените результат. Сделайте вывод.

**Методика:**

1. На чашки Петри засевают шпателем взвеси исследуемых культур.
2. На засеянную поверхность агара пастеровскими пипетками наносят аккуратными каплями сальмонеллезные индикаторные бактериофаги различных типов. Места нанесения фагов маркируют на дне чашки. Пипетки и шпатель помещают в стакан с дезраствором.
3. Посев помещают в термостат на 24 часа.
4. Через сутки учитывают результат. На поверхности выросших исследуемых культур определяют зоны лизиса бактерий соответствующим типом фага (Рис.2.10.).
5. Сравнивают фаготипы выделенных из разных источников культур бактерий.

Результат выполненной работы оформляют в виде протокола исследования.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Цель:

|  |  |
| --- | --- |
| Вид возбудителя | Результат |
| Исследуемая культура № 1 (вода) (рис. с обозначениями) | Исследуемая культура № 2 (больной А) (рис.с обозначениями) |
|  |  |  |

Вывод: (ответить на вопросы: Явилась ли вода фактором распространения данной инфекции? Почему?).