

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ МАРАТА ОСПАНОВА



С.С. Курмангалиева, Е.В. Зевалкина, А.Ш. Сарбулатова, Р.Н. Жанаманова

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ
МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Актобе
2022

УДК 587+579+612.017(075.8)

ББК 28.073+28.3+28.4я73

К 93

Курмангалиева С.С., Зевалкина Е.В., Сарбулатова А.Ш., Жанаманова Р.Н. Учебное пособие к лабораторным занятиям по дисциплине микробиология, вирусология и иммунология. Учебное пособие/- Актобе, 2023, 217с.

Авторы:

Курмангалиева С.С. – к.м.н., руководитель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»

Зевалкина Е.В. – преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»

Сарбулатова А.Ш. – магистр, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»

Жанаманова Р.Н. - магистр, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»

Рецензенты:

1. Рахимжанова Ф.С. - к.м.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии НАО «Медицинский университет Семей»;

2. Уразаева С.Т. – к.м.н., доцент, руководитель кафедры эпидемиологии НАО «Западно-казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова»

Учебное пособие разработано согласно учебной программе и состоит из двух разделов: общей микробиологии с основами иммунологии, частной бактериологии с вирусологией и включает 21 лабораторную работу по первому разделу и 16 лабораторных работ по второму разделу.

Цель руководства – научить студентов навыкам микробиологических исследований, которые позволят будущим врачам грамотно выбирать методы исследования для постановки диагноза и правильно интерпретировать полученные результаты. Руководство иллюстрировано рисунками и схемами.

Утверждено на заседании Ученого Совета

ЗКМУ имени Марата Оспанова

«25» января 2024 года

Протокол № 5 (812)

© Курмангалиева С.С., Зевалкина Е.В., Сарбулатова А.Ш., Жанаманова Р.Н. 2023

Перечень сокращений, условных обозначений, символов

АБП - антибактериальные препараты
АГ - антиген
АТ - антитело
БГКП - бактерии группы кишечных палочек
ДДМ - дискодиффузионный метод
ЖСА - желточно-солевой агар
ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
ИППП - инфекции, передаваемые половым путем
ИФА - иммуноферментный анализ
ЛПС - липополисахарид
ЛС - лекарственные средства
МПА - мясопептонный агар
МПБ - мясопептонный бульон
МПК - минимальная подавляющая концентрация
МФА - метод флюоресцирующих антител
ОРВИ - острая респираторная вирусная инфекция
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РА - реакция агглютинации
РГА - реакция гемагглютинации
РИФ - реакция иммунофлюоресценции
РН - реакция нейтрализации
РНГА - реакция непрямой гемагглютинации
РСК - реакция связывания комплемента
СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита
ХТП - химиотерапевтические препараты
ЦМ - цитоплазматическая мембрана
DCL - абсолютная смертельная доза
DIM - минимальная смертельная доза
LD50 - полумлетальная доза

Содержание

Перечень сокращений, условных обозначений, символов	3
Введение	6
Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории	7
1. Общая микробиология с основами иммунологии.....	9
1.1. Лабораторная работа №1. Изучение морфологических и	

тинкториальных свойств бактерий. Простые методы окраски.....	9
1.2. Лабораторная работа №2. Сложные методы окраски: по Граму, Пешкову.....	13
1.3. Лабораторная работа №3. Выявление кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена	19
1.4. Лабораторная работа №4. Исследование бактерий в живом состоянии: приготовление микропрепарата «раздавленная» капля.....	22
1.5. Лабораторная работа №5. Изучение культуральных свойств бактерий на твердых и жидких питательных средах	24
1.6. Лабораторная работа №6. Выделение и идентификация чистой культуры аэробных бактерий	32
1.7. Лабораторная работа №7. Выделение чистой культуры анаэробов	45
1.8. Лабораторная работа №8. Индикация вируса в курином эмбрионе с помощью реакции гемагглютинации	53
1.9. Лабораторная работа №9. Опыт по трансдукции фага	58
1.10. Лабораторная работа №10. Микроскопическое исследование зубного налета	62
1.11. Лабораторная работа №11. Определение общего микробного числа (ОМЧ) воздуха седиментационным методом	67
1.12. Лабораторная работа №12. Микрофлора кефира	73
1.13. Лабораторная работа №13. Влияние температуры на вегетативные и споровые формы бактерий	80
1.14. Лабораторная работа №14. Определение антибиотикочувствительности бактерий методом дисков	82
1.15. Лабораторная работа №15. Определение антибиотикочувствительности бактерий методом серийных разведений..	90
1.16. Лабораторная работа №16. Титрование лизоцима в слюне	94
1.17. Лабораторная работа №17. Реакция агглютинации на стекле	98
1.18. Лабораторная работа №18. Развернутая реакция агглютинации	102

1.19. Лабораторная работа №19. Реакция преципитации	107
1.20. Лабораторная работа №20. Реакция связывания комплемента	109
1.21. Лабораторная работа №21. Исследование фагоцитоза	114
2. Частная бактериология с вирусологией.....	119
2.1. Лабораторная работа №1. Бактериологический метод исследования при фурункулезе	119
2.2. Лабораторная работа №2. Микроскопическая диагностика гонореи...	128
2.3. Лабораторная работа №3. Бактериологическая диагностика шигеллеза	132
2.4. Лабораторная работа №4. Серологическая диагностика брюшного тифа. Реакция Видаля	139
2.5. Лабораторная работа №5. Бактериологическое исследование при подозрении на холеру	146
2.6. Лабораторная работа №6. Реакция агглютинации для серологической диагностики коклюша	150
2.7. Лабораторная работа №7. Микроскопическая диагностика туберкулеза легких	156
2.8. Лабораторная работа №8. Микроскопическая диагностика дифтерии.....	163
2.9. Лабораторная работа №9. Реакция термопреципитации Асколи при сибирской язве	168
2.10. Лабораторная работа №10. Микроскопическая диагностика чумы...	175
2.11. Лабораторная работа №11. Микроскопическая диагностика раневой анаэробной инфекции	181
2.12. Лабораторная работа №12. Реакция Вассермана при сифилисе	186
2.13. Лабораторная работа №13. РТГА для идентификации вируса гриппа	194
2.14. Лабораторная работа №14. Определение комплементсвязывающих антител в сыворотке больного аденовирусной инфекцией	202
2.15. Лабораторная работа №15. Серологическая диагностика полиомиелита.....	206
2.16. Лабораторная работа №16. РТГА для серологической диагностики клещевого энцефалита	210
Заключение	217
Список использованных источников	218

Введение

Уважаемые студенты!

Вы приступаете к изучению очень интересной и содержательной дисциплины «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология», играющей очень важную роль в подготовке будущих врачей и в последующей их практической деятельности в системе здравоохранения.

Для облегчения усвоения вами большого объема информации и успешного освоения базовых практических навыков микробиологических исследований и было подготовлено данное учебное пособие.

Занятия по микробиологии состоят из теоретической и практической частей. Практическая часть занятия заключается в выполнении лабораторной работы и поэтому цель данного учебного пособия заключается в том, чтобы подготовить студентов-медиков к выполнению лабораторной работы, научить анализировать и интерпретировать полученные результаты исследования. При помощи данного пособия студенты приобретут основные навыки микробиологических исследований, закрепят практикой приобретенные теоретические знания, научатся правильно заполнять сопроводительную документацию при направлении клинического материала в лабораторию, что позволит будущим врачам грамотно выбирать методы микробиологического исследования для постановки диагноза и правильно интерпретировать полученные результаты.

Пособие состоит из двух разделов: общей микробиологии с основами иммунологии, частной бактериологии с вирусологией и включает 21 лабораторную работу по первому разделу и 16 лабораторных работ по второму разделу.

Описание лабораторной работы выполнено по схеме: тема, цель работы, необходимое оснащение, теоретический материал с подробными иллюстрациями, протокол лабораторной работы и последовательность ее исполнения. Все иллюстрации заимствованы из интернет-ресурсов и способствуют лучшему усвоению теоретических знаний и практических навыков. В конце каждой лабораторной работы представлена литература для более углубленного изучения темы.

В структуре пособия также имеется важный раздел о технике безопасности и правилах поведения при работе в бактериологической лаборатории, который студентам необходимо усвоить на первом же занятии и строго соблюдать в дальнейшем.

При работе над пособием авторы исходили прежде всего из интересов студентов и надеются, что оно будет полезным и востребованным в процессе изучения такой информационно насыщенной и интересной дисциплины, как микробиология, вирусология и иммунология.

Учебное пособие подготовлено в соответствии с учебной программой и может быть использовано студентами всех специальностей.

Желаем вам успехов в познании микромира!

1. Правила работы и техника безопасности в микробиологической

лаборатории

1. К работе в учебной микробиологической лаборатории допускаются только студенты, ознакомленные с правилами работы в ней.

2. Входить в лабораторию и работать в ней можно только в спецодежде это халат, колпак, сменная обувь.

3. За каждым студентом закрепляется его рабочее место.

4. Приносить пищевые продукты, пить, курить, шуметь, бегать в микробиологической лаборатории не разрешается.

5. Приступить к выполнению лабораторной работы необходимо после организации рабочего места: для этого нужно убрать со стола личные вещи и все лишнее, достаточно иметь под рукой альбом с протоколом лабораторной работы.

6. Все исследования проводятся сидя, не наклоняясь над столом.

7. Основная опасность при работе – это живая культура бактерий. Пробирки с живыми культурами бактерий должны стоять в штативах, запрещается класть их на стол. Штатив с пробирками должен располагаться слева от студента (и справа, если он - левша). Пробирки нужно брать левой рукой, потому что в правой (активной) руке держат бактериологическую петлю, которой выполняют все манипуляции.

8. К материалу, содержащему живые микроорганизмы, нельзя прикасаться руками, для этого есть специальные микробиологические инструменты – бактериологические петли и иглы, пинцеты. Эти инструменты после окончания работы обязательно стерилизуются (фламбируются) в пламени спиртовки.

9. При прокаливании бактериологической петли в пламени спиртовки она нагревается – поэтому нужно держать петлю только за пластмассовый держатель и не касаться пальцами самой петли. Петлю нельзя класть на стол, после стерилизации ее необходимо поставить в штатив. Нельзя оставлять петлю с остатками бактериальной культуры – это приведет к заражению работающего. После и перед любой манипуляцией – нужно простерилизовать петлю в пламени спиртовки.

10. Все манипуляции с микробными культурами выполняют в стерильной зоне (возле спиртовок в радиусе 10-15 см), при этом обжигая края пробирок, прокаливая петли и пр. Отработанные препараты необходимо сбрасывать в банки с дезинфицирующим раствором, которые всегда должны находиться на рабочем месте.

11. Во время работы с открытым пламенем спиртовки необходимо помнить, что болтающиеся рукава халата представляют особую опасность, необходимо их закатать или застегнуть манжеты. Длинные волосы следует убрать под колпак или косынку во избежание их воспламенения. Не следует наклоняться над спиртовкой.

12. Прежде чем зажечь спиртовку, нужно убедиться, что корпус ее цел, фитиль выпущен на нужную высоту (1 см), горловина и держатель фитиля сухие. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя, иначе возможны вспышки паров внутри спиртовки. При гашении спиртовки нельзя дуть на пламя, нужно накрыть его сверху специальным колпачком.

13. Категорически запрещается зажигать спиртовку от пламени другой спиртовки, оставлять горящую спиртовку без присмотра и переносить ее с места на место.

14. При насасывании жидкого материала необходимо пользоваться резиновыми грушами, надетыми на пипетки, закрытые ватными тампонами. Насасывать ртом категорически запрещается.

15. Переливание жидкостей, содержащих живые микроорганизмы, из одной емкости в другую, производят над лотком, наполненным дезинфицирующим раствором.

16. В случае попадания материала с живыми микробами на стол или руки об этом необходимо сообщить преподавателю. Затем под контролем преподавателя обработать поверхность стола и руки раствором дезинфектанта, который всегда есть на рабочем месте, после этого руки следует вымыть водой с мылом.

17. При работе с электроприборами не отключайте прибор мокрыми руками. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю.

18. Студентам можно выполнять лабораторную работу только в присутствии преподавателя.

19. По окончании работы поверхность стола на рабочем месте продезинфицировать (5% раствором формалина или хлорамина), руки ополоснуть дезинфицирующим раствором и вымыть с мылом.

20. Ежедневная тщательная уборка помещения производится влажным способом с применением дезинфицирующих средств.

1. Общая микробиология с основами иммунологии

1.1. Лабораторная работа №1

Тема: Изучение морфологических и тинкториальных свойств бактерий.

Простые методы окраски

Цель: освоение этапов приготовления фиксированного микропрепарата из чистой культуры бактерий и окраски его простым методом

Студент должен знать:

1. Микробиологическая лаборатория - принципы организации и оборудование.
2. Техника безопасности и правила работы в микробиологической лаборатории.
3. Морфология бактерий и способы ее изучения.
4. Виды микропрепаратов и простые методы окраски бактерий.

Студент должен уметь:

1. Приготовить фиксированный микропрепарат из чистой культуры бактерий и окрасить его простым методом.
2. Микроскопировать с помощью иммерсионной системы биологического микроскопа.
3. Дифференцировать бактерии по морфологическим и тинкториальным свойствам в микропрепарате.

Основные теоретические положения Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования

Микроскопический метод исследования – совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств микробов в микропрепаратах, приготовленных из исследуемого материала (патологический материал, чистая культура и др.) с помощью микроскопии.

Для микроскопического исследования основной целью является установление этиологии, т.е. возбудителя инфекционного заболевания, а также определение чистоты выделенной культуры микроорганизмов. Для этого готовят следующие типы микроскопических препаратов:

- 1) фиксированный микропрепарат;
- 2) «раздавленная» капля;
- 3) «висячая» капля;
- 4) «толстая» капля;
- 5) тонкий мазок; 6) тушевой препарат;
- 7) препарат-отпечаток.

Таким образом, микроскопический метод позволяет изучить морфологические (размеры, форма, взаимное расположение микробных клеток) и тинкториальные (способность окрашиваться) свойства микробов.

Оценка микроскопического метода: доступный, быстрый, простой, недорогой, но обладает низкой чувствительностью (в 1 мл исследуемого материала должно быть не менее 100 000 бактерий) и низкой информативностью (из-за сходной морфологии микроорганизмов разных видов), а также при работе с живыми микробами существует опасность заражения.

Этапы приготовления фиксированного микропрепарата:

1. Собственно приготовление мазка
2. Высушивание
3. Фиксирование
4. Окрашивание

Ход выполнения лабораторной работы

Предметные стекла для приготовления микропрепарата должны быть чистыми и хорошо обезжиренными, т.к. от этого зависит качество изображения. Один из методов обезжиривания заключается в натирании предметного стекла кусочком сухого мыла с последующим протиранием ватой или тканевой салфеткой. На обратной стороне стекла в центре стеклоглафом очерчивают границы микропрепарата в виде овала площадью примерно 2-4 см². Подготовленное таким образом предметное стекло помещают на стеклянный «мостик» лотка.

Для приготовления фиксированного микропрепарата из культуры бактерий, выращенной на плотной питательной среде, на предметное стекло прокаленной петлей в первую очередь помещают каплю стерильного физиологического раствора. Затем пробирку с культурой бактерий примерно посередине берут в левую руку снизу так, чтобы поверхность питательной среды

с колониями микроорганизмов была обращена к исследователю. В правую руку берут вертикально петлю так, как держат ручку, вносят петлю в верхнюю часть пламени (наиболее горячую) и прокалывают ее докрасна, начиная с кончика и на всем протяжении (1, рис.1). Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки обхватывают ватную пробку, вынимают ее из пробирки и держат так во время последующих манипуляций (2, рис.1). Поверхность пробки считается инфицированной, поэтому класть ее на стол нельзя. Край открытой пробирки обжигают в пламени спиртовки и вводят в пробирку стерильную петлю (3, рис.1). Прикоснувшись петлей к колониям бактерий, берут небольшое количество микробной массы и вынимают петлю из пробирки, следя за тем, чтобы петля не касалась краев и стенок пробирки (4, рис.1). Горлышко пробирки вновь обжигают в пламени спиртовки (5, рис.1), затем обжигают ватную пробку, закрывают ею пробирку и ставят пробирку в штатив (6, рис.1).

Петлю с микробной массой вносят в каплю физиологического раствора, перемешивают и полученную суспензию равномерно распределяют на стекле тонким слоем в пределах очерченных границ (7, рис.1). Петлю вновь прокалывают докрасна на всем протяжении и только после этого ее можно поставить в штатив.

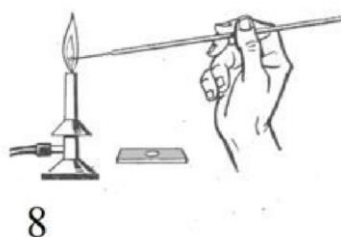
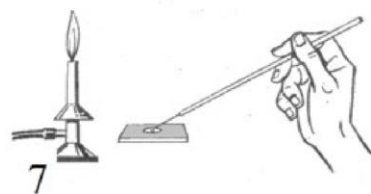
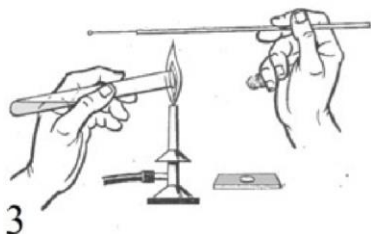
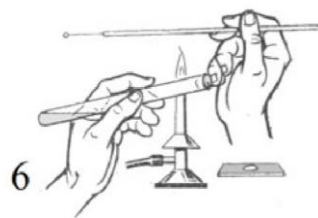
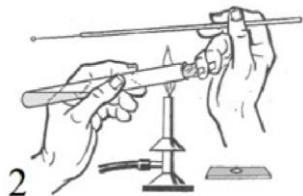
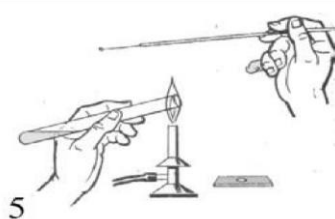


Рисунок 1 - Этапы приготовления фиксированного микропрепарата.
Заимствовано из Интернет-ресурсов.

2 этап. Высушивание мазка

Мазок можно высушить либо при комнатной температуре, или держа предметное стекло высоко над пламенем спиртовки в потоке теплого воздуха.

3 этап. Фиксирование мазка

Фиксирование (убивка) микропрепарата необходимо для того, чтобы бактерии прикрепились к стеклу и не смывались при окраске, а так же чтобы они окрасились, т. к. живые бактерии практически не окрашиваются.

Наиболее простым методом фиксации является воздействие высокой температуры. Для этого предметное стекло мазком вверх трижды проводят через верхнюю (наиболее горячую) часть пламени спиртовки. При фиксации важно не перегреть мазок (прикладывание предметного стекла к тыльной поверхности кисти руки должно вызывать чувство выраженного тепла, но не жжения). Термическая фиксация считается грубой, поэтому еще применяется химическая фиксация, особенно для мазков из крови. Для этого предметное стекло с мазком на определенное время погружают в емкость с фиксирующей жидкостью (метиловый спирт, этиловый спирт, смесь Никифорова и др.) и промывают водой.

4 этап. Окрашивание мазка

В неокрашенном состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, и не видны при световой микроскопии. Окрашивание мазка в зависимости от цели проводят сложными или простыми методами. При простом методе окраски применяют только один краситель анилинового ряда (метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый), который в небольшом количестве наносят так, чтобы краска полностью покрыла мазок, через 1-2 мин (фуксин), 3-5 мин (метиленовый синий), 2 мин (генциановый фиолетовый) краску смывают водой, высушивают препарат с помощью фильтровальной бумаги и приступают к микроскопированию с иммерсионным объективом.

ПРОТОКОЛ №1 Изучение морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов. Простые методы окраски

День иссл.	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
-----------------------	---------------------------------	-------------------------	------------------

1	Культура стафилококка и кишечной палочки на МПА	1. Приготовить мазок. 2. Окрасить простым методом (метиленовый синий, фуксин Пфейффера). 3. Микроскопировать. 4. Зарисовать.	
---	---	---	--

Материалы и оборудование: пробирка со стерильным физиологическим раствором; бактериологическая петля; культуры стафилококка и кишечной палочки на МПА в пробирках; спиртовка; набор рабочих растворов анилиновых красителей; промывалка; чистые предметные стекла; лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 13-31.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012,- С. 15-31.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.5-24.

1.2. Лабораторная работа №2

Тема: Сложные методы окраски: по Граму, Пешкову

Цель: освоение сложных методов окрашивания по Граму, по Пешкову

Студент должен знать:

1. Структуру бактериальной клетки, особенности строения клеточной стенки Грам (+) и Грам (-) бактерий;
2. Методику и механизм дифференциальных методов окраски по Граму и Пешкову.

Студент должен уметь:

1. Приготовить фиксированный микропрепарат и окрасить по Граму, Пешкову;
2. Микроскопировать с иммерсионной системой и дифференцировать бактерии по морфологическим и тинкториальным свойствам

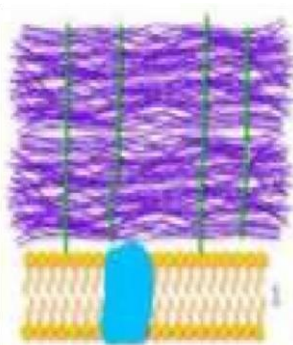
Основные теоретические положения

Для окраски микропрепаратов в зависимости от цели применяются простые или сложные методы. При простом (ориентировочном) методе окраски

используют только один краситель, при сложном – не менее 2-х с обесцвечиванием между ними. Для обесцвечивания используют воду, или спирты, кислоты. Красители в микробиологии используют анилиновые основные (щелочные), реже нейтральные, так как содержимое бактериальной клетки после фиксации имеет кислую реакцию.

Сложные методы окраски применяются с целью отличить различные бактерии друг от друга по тинкториальным свойствам, поэтому их называют дифференциальными. Примером сложного метода окраски является окраска по Граму. Благодаря этому методу можно установить связь между строением клеточной стенки бактерий и их тинкториальными свойствами.

Грамположительные бактерии имеют толстую (20-80 нм) многослойную клеточную стенку, состоящую из большого количества пептидогликана (50-90% сухой массы) и тейхоевых кислот (рисунок 2), с которыми генциановый фиолетовый в присутствии раствора Люголя образует комплекс. В дальнейшем при обработке микропрепарата этиловым спиртом сужаются поры в слое пептидогликана, что препятствует выходу комплекса красителя с йодом из клеточной стенки. Такие бактерии, окрасившись генциановым фиолетовым, в последующем не воспринимают фуксин, в результате чего клетки имеют фиолетовую окраску.



Грамположительные:

1. Цитоплазматическая мембрана,
2. Пептидогликан (муреин),
3. Тейхоевые кислоты

Рисунок 2 - Схема строения клеточной стенки Грам (+) бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Грамотрицательные бактерии имеют клеточную стенку толщиной 14-17 нм, в которой выделяют внешнюю мембрану, периплазматическое пространство, слой пептидогликанов и другие компоненты (фосфолипиды, белки, липополисахариды) (рисунок 3). На долю пептидогликана приходится 1-10% сухой массы, что значительно меньше, чем у грамположительных бактерий. Кроме того, отсутствуют тейхоевые кислоты и микрофибриллы пептидогликана расположены рыхло. Поэтому у грамотрицательных микробов не образуется прочного соединения генцианового фиолетового и йода с компонентами клеточной стенки и красители легко вымываются этиловым спиртом. Такие бактерии дополнительно окрашиваются фуксином в красный (розовый) цвет.

Грамотрицательные бактерии:

1. Цитоплазматическая мембрана,
2. Пептидогликан (муреин),
3. Периплазматическое пространство,
4. Внешняя мембрана (ЛПС),
5. Пору

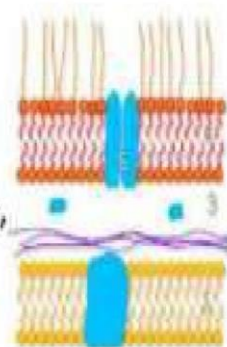


Рисунок 3 - Схема строения клеточной стенки Грам (-) бактерий
Заимствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 4 -Ганс Кристиан Грам (Hans Christian Joachim Gram, 1853-1938 гг.).
Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ганс Кристиан Йоахим Грам — датский бактериолог, разработавший в 1884 году свой метод окраски для разделения бактерий на два основных класса. Способность микроорганизмов окрашиваться по Граму положительно или отрицательно является важным признаком и обязательно учитывается при их идентификации наряду с другими свойствами.

Таблица 1 - Распределение бактерий при окраске по Граму

Морфологическая группа	Грамположительные	Грамотрицательные
Кокки	Все кокки, за исключением вейлонелл и нейссерий	Вейлонеллы, нейссерии (менингококки, гонококки)
Палочки	Листерии Спорообразующие (клостридии, бациллы) Ветвящиеся и способные к ветвлению (микобактерии, коринебактерии)	Энтеробактерии, бордетеллы, бруцеллы, легионеллы, бактериоиды, псевдомонады, фузобактерии.

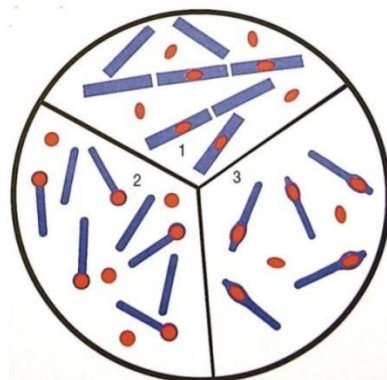
Извитые	-	Все извитые бактерии
---------	---	----------------------

Сложные методы окраски для выявления спор бактерий

Некоторые бактерии в неблагоприятных условиях способны образовывать споры. Спорообразование характерно в основном для грамположительных палочковидных бактерий (бациллы и клостридии). Споры бактерий имеют толстую плотную многослойную оболочку с пластинчатым строением, минимальное количество свободной воды, высокое содержание липидов, кальция, пиколиновой кислоты и поэтому длительно (десятки лет) способны выживать в неблагоприятных условиях.

По форме споры бывают округлыми и овальными, по расположению в клетке – центральными, терминальными, субтерминальными, также отличаются по размеру, что учитывается в идентификации бактерий (рисунок 5). У бактерий рода *Bacillus* диаметр споры не превышает поперечника вегетативной клетки, а у бактерий рода *Clostridium* размер споры больше поперечника клетки.

Споры бактерий характеризуются большой преломляемостью света и при микроскопии живых бактерий в неокрашенном состоянии споры выглядят как блестящие зерна. Также для выявления спор используют специальные методы окраски: по Ожешко (Ауески), Пешкову, Цилю-Нильсену или с помощью фазово-контрастной микроскопии. Примеры спорообразующих бактерий: *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*.



1 – центральные споры у бацилл; 2 – терминальные споры у клостридий столбняка; 3 - субтерминальные споры у клостридий ботулизма

Рисунок 5 - Варианты расположения спор у бактерий (окраска по методу Ожешки). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы:

Для изучения строения клеточной стенки бактерий применяют методику **окраски по Граму** (рисунок 6) в различных модификациях (представляем модификацию А. Синева):

. 1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, заранее пропитанный красителем генциановым фиолетовым и высушенный. На бумагу наносят несколько капель воды и выдерживают 1-2 мин.

2. Убирают пинцетом бумагу, сливают остаток красителя и, не промывая водой, наносят раствор Люголя на 1 мин. Мазок должен почернеть из-за взаимодействия йода с генциановым фиолетовым.
3. Раствор Люголя сливают и, не промывая водой, наносят этиловый спирт, держат до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя примерно 30 сек.
4. Тщательно промывают мазок водой.
5. Наносят фуксин Пфейффера на 1-2 мин.
6. Тщательно промывают мазок водой, просушивают с помощью фильтровальной бумаги.



Рисунок 6 - Последовательность окраски по Граму
 Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет (рисунок 7), грамотрицательные – в красный цвет (рисунок 8).

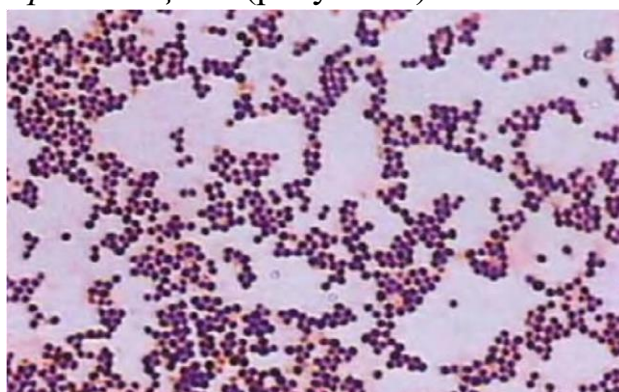


Рисунок 7 - Мазок из чистой культуры *S. aureus*. Окраска по Граму
 Заимствовано из Интернет-ресурсов.

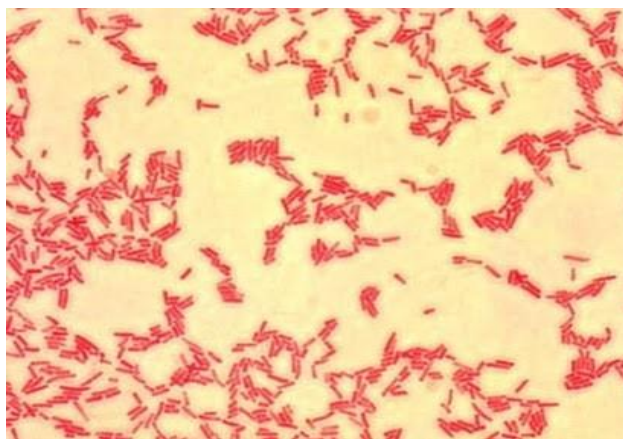


Рисунок 8 - Мазок из чистой культуры E. coli. Окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Методика окраски спор по Пешкову

Метод Пешкова основан на том, что окрашивание бактерий проводят при нагревании до кипения красителя, при этом окрашиваются споры и цитоплазма бактериальной клетки, но при последующем промывании водой цитоплазма обесцвечивается, а спора прочно удерживает краситель.

Ход выполнения лабораторной работы:

1. Мазок фиксируют в пламени горелки.
2. На мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, обильно наливают на него метиленовый синий Леффлера, берут предметное стекло пинцетом и нагревают в пламени спиртовки до кипения краски, кипятят 15-20 секунд,
3. Дают стеклу остыть и промывают мазок водой.
4. Докрашивают 0,5% водным раствором нейтральрот 30-60 секунд.
5. Промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Споры, окрашенные метиленовым синим Леффлера, имеют голубовато-синий цвет, а вегетативные тела бактерий окрашиваются нейтральротом в красный (рисунок 9).

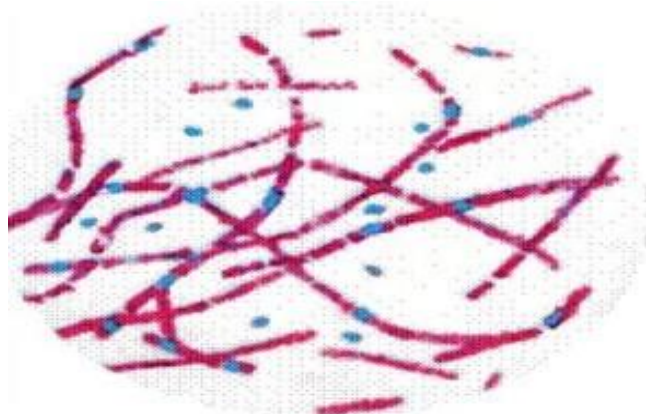


Рисунок 9 - Чистая культура Bac. anthracis, окраска по Пешкову. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

ПРОТОКОЛ №2 Сложные методы окраски: по Граму, Пешкову

День иссл	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	Стафилококк и кишечная палочка на МПА	1. Приготовить мазок. 2. Окрасить по Граму. 3. Микроскопировать. 4. Зарисовать.	
2	Споровая культура на МПА.	1. Приготовить мазок 2. Окрасить по Пешкову. 3. Микроскопировать. 4. Зарисовать.	

Материалы и оборудование бактериологическая петля; спиртовка; чистые культуры стафилококка, кишечной палочки и спорообразующих бактерий на скошенном МПА в пробирках; чистые предметные стекла; физиологический раствор, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло; наборы красителей по Граму, по Пешкову.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 31-35.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012,- С. 31-33.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, -С.24-26.

1.3. Лабораторная работа №3

Тема: Выявление кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена

Цель: освоение сложного метода окрашивания кислотоустойчивых бактерий (метод Циля-Нильсена)

Студент должен знать:

1. Особенности строения и химического состава клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий;
2. Методику и механизм сложного метода окрашивания по Цилю-Нильсену.

Студент должен уметь:

1. Окрашивать микропрепарат по методу Циля-Нильсена;

2.Микроскопировать с иммерсионной системой биологического микроскопа.

Основные теоретические положения

Метод назван именами немецких медиков — микробиолога Франца Циля и патологоанатома Фридриха Нильсена (Нильсена), которые разработали его в 1882—1883 гг.

Сложный метод окраски по Цилю-Нильсену используют для выявления кислотоустойчивых микобактерий – возбудителей лепры (*Mycobacterium leprae*) и туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*).

Так как кислотоустойчивые бактерии имеют уникальный химический состав клеточной стенки (большое количество восков, липидов, миколовых кислот), то они слабо воспринимают анилиновые красители. Для того чтобы окрасить эти бактерии, применяют специальный метод окраски по Цилю–Нильсену с применением концентрированного фенолового фуксина Циля (рисунок 10).

Особенность данного метода заключается в том, что в процессе окрашивания карболовым фуксином Циля микропрепарат трижды подогревают в пламени спиртовки до отхождения паров красителя. При нагревании липиды в клеточной стенке кислотоустойчивых бактерий растворяются, и клетка окрашивается фуксином Циля в красный цвет. Затем при остывании микропрепарата липиды восстанавливают свою структуру, и при последующей обработке 5% раствором серной кислоты или солянокислым спиртом кислотоустойчивые бактерии не обесцвечиваются в отличие от некислотоустойчивых. На заключительном этапе микропрепарат окрашивается дополнительным красителем (метиленовым синим) для окраски клеток и тканей макроорганизма или посторонней микрофлоры в сине-голубой цвет.

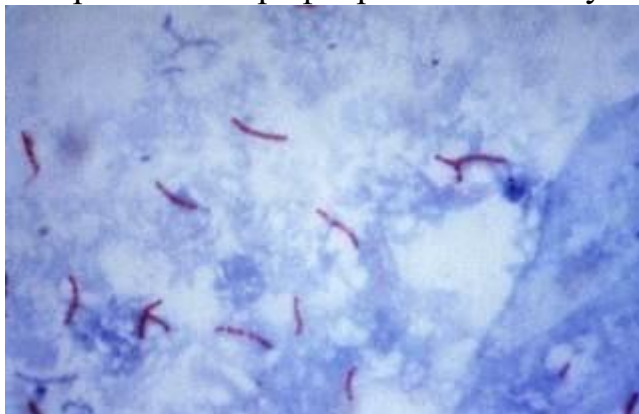


Рисунок 10 - Микобактерии туберкулеза в мокроте, окраска методом ЦиляНильсена. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Кислотоустойчивые микобактерии туберкулеза (0,2 – 0,7x1-10 мкм) видны под микроскопом в виде рубиново-красных тонких прямых или слегка изогнутых палочек с гомогенной или зернистой цитоплазмой, могут располагаться поодиночке, парами или группами и отчетливо видны на голубом фоне других компонентов микропрепарата (рисунок 10).

Ход выполнения лабораторной работы

1. На высушенный и зафиксированный мазок из исследуемого материала или чистой культуры бактерий кладут кусочек фильтровальной бумаги, на него наносят карболовый раствор фуксина Циля, стекло берут пинцетом и подогревают над пламенем спиртовки до появления паров красителя. Наблюдать за появлением паров удобнее, глядя на мазок сбоку. Эту процедуру повторяют 2-3 раза, каждый раз отставляя микропрепарат в сторону для охлаждения. При подсыхании кусочка бумаги вследствие испарения красителя осторожно доливают на него карболовый фуксин Циля.

2. Кусочек фильтровальной бумаги снять пинцетом, мазок охладить и промыть водой;

3. Обесцветить 5 % серной кислотой или солянокислым спиртом, наливая кислоту на препарат на 1-2 мин до полного обесцвечивания;

3. Микропрепарат промыть водой;

4. Окрасить метиленовым синим Леффлера (3-5 мин);

5. Промыть водой и просушить фильтровальной бумагой.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в рубиново-красный цвет, а остальные бактерии – в синий.

ПРОТОКОЛ № 3 Кислотоустойчивые бактерии и их окраска по Цилю-Нильсену

День	Исследуемый материал:	Ход работы:	Результат:
1	Высушенный и зафиксированный микропрепарат мокроты.	1. Окрасить микропрепарат по методу Циля-Нильсена 2. Микроскопировать. 3. Изучить морфологические и тинкториальные свойства бактерий. 4. Зарисовать.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; готовый фиксированный микропрепарат, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло; набор красителей для окраски по Цилю – Нильсену: феноловый фуксин Циля, 5 % раствор H_2SO_4 , метиленовый синий Леффлера.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 35-36.

2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012,- С. 33-34.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, -С.26.

1.4. Лабораторная работа №4

Тема: Исследование бактерий в живом состоянии: приготовление микропрепарата «раздавленная» капля

Цель: освоение методики приготовления микропрепарата «раздавленная» капля

Студент должен знать:

1. Методы изучения бактерий в живом состоянии; **Студент**

должен уметь:

1. Приготовить микропрепарат «раздавленная капля»;

2. Микроскопировать с иммерсионной системой биологического микроскопа

Основные теоретические положения

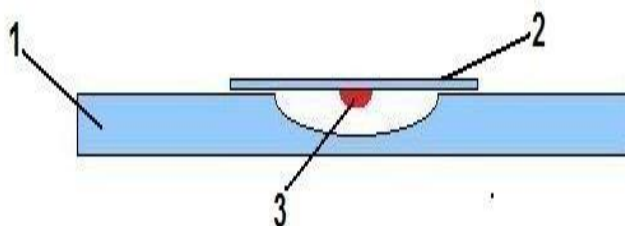
Целями изучения микроорганизмов в живом состоянии является определение их формы, подвижности, а также изучение прижизненной ультраструктуры. Для этого готовят нативные микропрепараты «висячая» (рисунок 11) и «раздавленная» капля (рисунок 12).

Для микроскопии нативных микропрепаратов применяют фазово-контрастный микроскоп и темнопольную микроскопию, т.к. живые микроорганизмы при обычной микроскопии видны плохо, выглядят мало-контрастными и прозрачными.

Препарат «висячая капля»

«Висячей каплей» удобнее пользоваться для наблюдения подвижности микробов, их развития, размножения, прорастания спор.

Для приготовления микропрепарата небольшую каплю исследуемого материала или взвеси микроорганизмов помещают на середину обезжиренного покровного стекла, на него сверху накладывают предметное стекло с лункой так, чтобы капля находилась в центре лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Далее предметное стекло с прилипшим к нему покровным стеклом переворачивают, при этом капля оказывается свисающей в лунку, не касаясь ее дна и стенок.



1- предметное стекло с лункой в центре; 2 – покровное стекло; 3 – капля взвеси микроорганизмов

Рисунок 11 - «Висячая капля». Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы Препарат «раздавленная капля»



Рисунок 12 - Приготовление препарата «раздавленная капля». Заимствовано из Интернет-ресурсов.

1. Для приготовления «раздавленной капли» на середину обезжиренного предметного стекла бактериологической петлей наносят бульонную культуру и равномерно распределяют на площади в 1 см². Для приготовления микропрепарата из агаровой культуры на предметное стекло сначала наносят каплю физиологического раствора и в ней эмульгируют одну петлю микробов, взятой со среды.

2. Покровное стекло ставят на ребро у края капли и опускают его, вытесняя воздух между покровным и предметным стеклом. Капля «раздавливается» между стёклами, при этом стёкла плотно склеиваются и жидкость тончайшим слоем заполняет пространство между ними, не выходя за пределы покровного стекла.

3. На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом х90, окуляром х7 или х10 при слегка опущенном конденсоре.

При работе с относительно крупными бактериями можно пользоваться сухими объективами х40 и даже х8 и обойтись без иммерсионного масла.

Недостаток метода «раздавленной капли» - быстрое высыхание препарата, поэтому его надо микроскопировать сразу после приготовления.

Оценка результата: неподвижные микробы в препаратах «раздавленной» и «висячей» капли создают картину броуновского движения, подвижные – передвигаются на значительные расстояния с одинаковой скоростью, часто пересекая все поле зрения.

ПРОТОКОЛ №4

Исследование бактерий в живом состоянии: приготовление микропрепарата «раздавленная капля»

День	Исследуемый материал	Ход работы	Результат
------	----------------------	------------	-----------

1.	1. Пробирка с бульонной культурой подвижных бактерий. 2. Чашка Петри с агаровой культурой бактерий.	1. Приготовить препарат «раздавленная капля» 2. Микроскопировать. 3. Зарисовать.	
----	--	--	--

Материалы и оборудование: спиртовка, бактериологическая петля, лоток с «мостиком», покровные стекла, предметные стекла, физиологический раствор хлорида натрия, пробирка с бульонной культурой бактерий, чашка Петри с агаровой культурой бактерий, биологический микроскоп, иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 42-44.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 38-39.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, -С.23-24.

1.5. Лабораторная работа №5

Тема: Изучение культуральных свойств бактерий на твердых и жидких питательных средах

Цель: освоение методики изучения культуральных свойств бактерий на твердых и жидких питательных средах.

Студент должен знать:

1. Виды питательных сред.
2. Характер и особенности роста бактерий на различных питательных средах

Студент должен уметь:

1. Изучить и дать описание характеру роста бактериальной культуры на твердых и жидких питательных средах

Основные теоретические положения

Культуральные свойства микробов представляют собой характер и особенности роста микроорганизмов на питательных средах, а также условия их культивирования. Изучение культуральных свойств является важным для идентификации выделенной культуры, т.к. эти свойства постоянны и характерны для каждого вида.

Культуральный метод – это метод, который заключается в посеве исследуемого материала на искусственные питательные среды с целью выделения чистой культуры возбудителя заболевания и изучения её свойств с

целью идентификации. В бактериологии культуральный метод называется бактериологическим, в вирусологии – вирусологическим, в микологии – микологическим, в протозоологии – протозоологическим.

Чистая культура – это выращенная на питательной среде популяция бактерий одного вида или подвида.

Для успешного культивирования микроорганизмов очень важно правильно подобрать питательные среды.

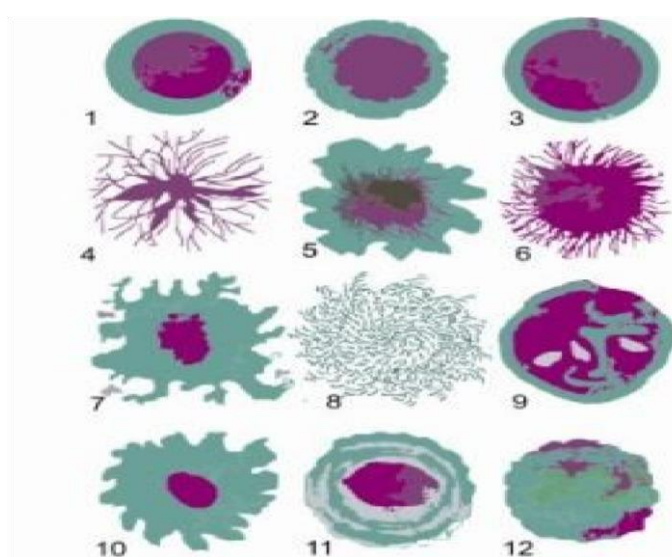
Рост микробов на плотной питательной среде

Для изучения роста микробов на плотных питательных средах необходимо сделать посев исследуемого материала на среду в чашке Петри так, чтобы получить рост изолированных колоний. **Колония** – это видимое скопление бактерий одного вида или биовара, выросших на поверхности или в глубине плотной питательной среды в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток.

Колонии характеризуют по величине, цвету, форме, поверхности, контуру края, рельефу, консистенции, структуре.

Величина колонии зависит от ее диаметра. Если диаметр меньше 1 мм, то это карликовые (точечные) колонии, диаметр 1-2 мм - мелкие, диаметр 2-4 мм средние, диаметр 4-6 мм и более - крупные.

Форма колонии бывает правильная – круглая, неправильная – овальная, амёбовидная, ризоидная (корневидная), звездчатая (рисунок 13).



1- круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6- круглая с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитчатая; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная.

Рисунок 13 - Форма колоний бактерий. Заимствовано из Интернетресурсов.

Характер контура края - для его изучения необходимо детально рассмотреть колонию под малым увеличением микроскопа или под лупой. Края колонии бывают ровные и неровные (рисунок 14). Неровные края в свою очередь делятся на:

- 1) бахромчатые – напоминающие нежные ворсинки;
- 2) зазубренные - острые зубцы различной величины и формы;
- 3) фестончатые в виде крупных, слегка округленных или уплощенных зубцов правильной формы;
- 4) волнистые в виде крупных нечетко выраженных зубцов; 5) расплывчатые, не имеющие четких границ.

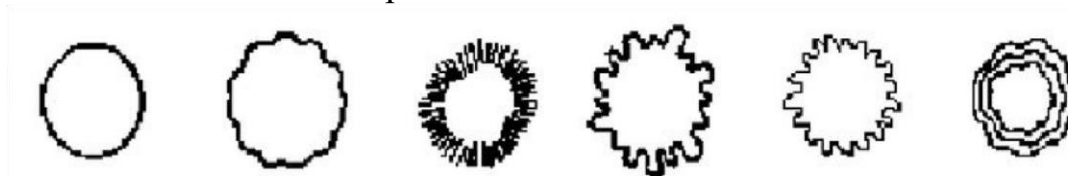
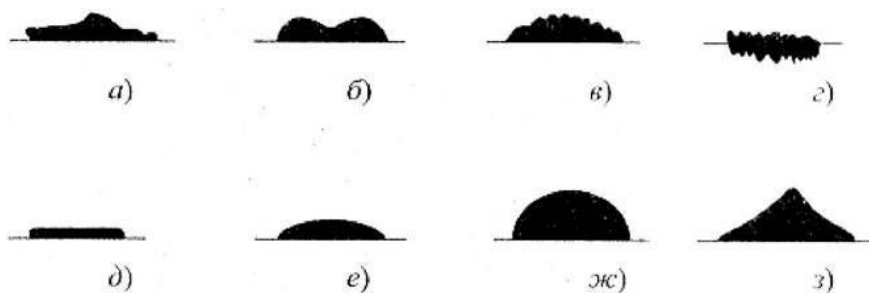


Рисунок 14 - Характер контура края. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Рельеф колонии – это контур формы колонии в вертикальном разрезе и степень её выпуклости. Изучают рельеф колонии, глядя на нее сбоку и сверху невооруженным глазом или с лупой (рисунок 15).

Различают:

- 1) куполообразные (каплевидные) колонии правильной круглой формы, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара и отличаются только длиной радиуса. Колонии слабовыпуклые имеют большую длину радиуса, куполообразные – меньшую;
- 2) колонии плоско-выпуклые с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями, имеют в вертикальном разрезе форму трапеции;
- 3) колонии плоские, стелющиеся по поверхности среды;
- 4) кратеровидные колонии с вдавленным центром;
- 5) колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии;
- 6) колонии конусовидные, имеющие в вертикальном разрезе форму



треугольника. а - изогнутый; б - кратеровидный; в - бугристый; г - врастающий в агар; д плоский; е - выпуклый; ж - каплевидный; з – конусовидный

Рисунок 15 - Рельеф колоний микроорганизмов. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает сухая или влажная, матовая или блестящая, гладкая или шероховатая (рисунок 16). Гладкие колонии обозначают буквой S (англ. smooth) (рисунок 17), шероховатые – буквой R (англ. rough) (рисунок 18).

Переход S-форм колоний в R-формы происходит в результате мутаций и называется диссоциацией. Кроме этих двух основных типов в процессе диссоциации образуется еще слизистый M-тип (лат. mucus) колоний.

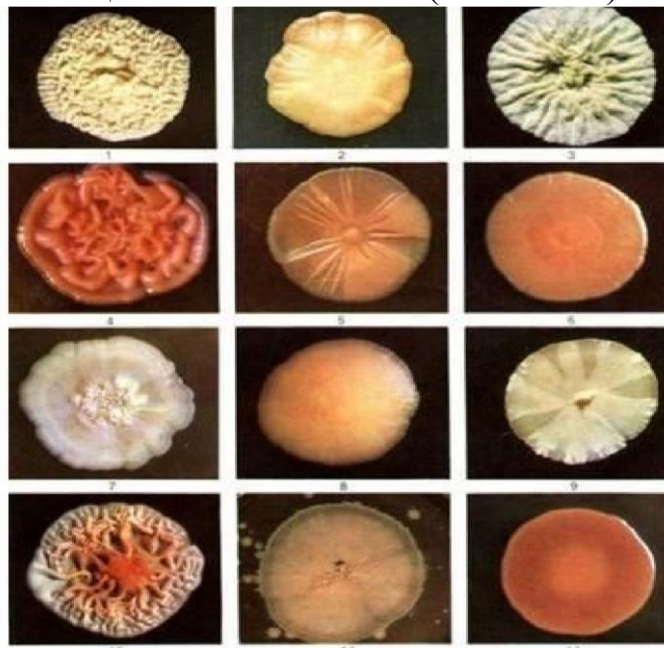


Рисунок 16 - Колонии бактерий с разными видами поверхности.
Займствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 17 - S-форма колоний. Займствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 18 - R – форма колоний. Займствовано из Интернет-ресурсов.

Цвет колонии зависит от пигмента, который синтезируют бактерии (рисунок 19). Большинство патогенных бактерий пигмента не образует, поэтому колонии их бесцветны и прозрачны в разной степени. Пигментообразующие виды микробов образуют колонии различных цветов: молочно-белые, кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, зеленые, коричневые, красные, сиреневые, черные и др. (рисунок 20).



Рисунок 19 - Колонии пигментообразующих бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

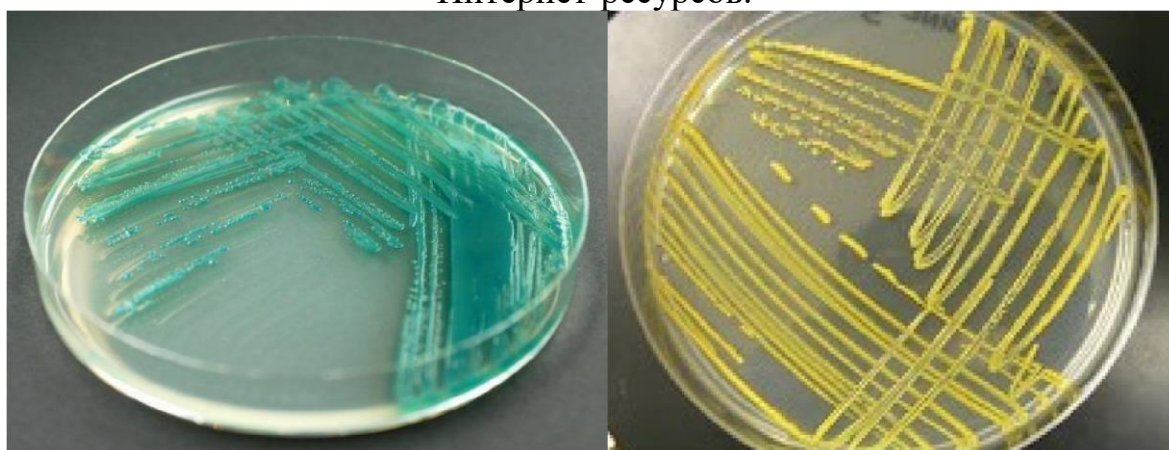


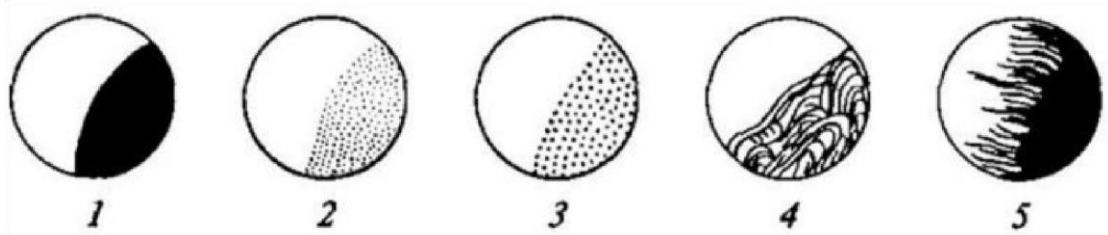
Рисунок 20 - Колонии *Pseudomonas aeruginosa* (слева) с пигментом пиоцианином сине-зеленого цвета и колонии золотистого стафилококка с желтым пигментом. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Структура колонии изучается в проходящем свете при малом увеличении микроскопа и суженной диафрагме (рисунок 21).

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

- 1) гомогенные – без видимой определенной структуры;
- 2) зернистые – в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и крупно-зернистые;
- 3) нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колоний.

Колонии бывают однородные и неоднородные. У неоднородных колоний центральная часть отличается от периферической или отдельные части имеют неодинаковое строение.



1- однородная, 2- мелкозернистая, 3-крупнозернистая, 4- струйчатая, 5-волоконнистая.

Рисунок 21 - Структура колонии. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

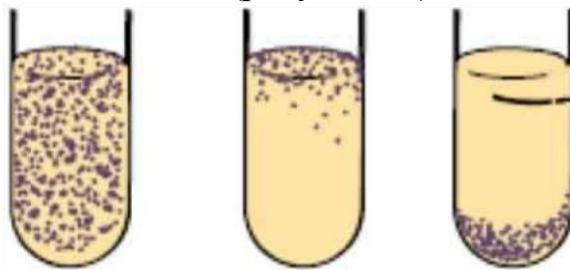
Консистенцию колонии изучают с помощью бактериальной петли посредством прикосновения к ней.

По консистенции колонии различают:

- 1) маслянистые или пастообразные, которые легко снимаются и размазываются по поверхности питательной среды как сливочное масло;
- 2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- 3) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли;
- 4) волокнистые или кожистые, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки.

Микробный рост на жидких питательных средах.

На жидких питательных средах выявлены следующие формы роста бактерий: помутнение, осадок, пленка (рисунок 22).



Равномерное помутнение, поверхностный рост (пленка), придонный рост (осадок).

Рисунок 22 - Рост бактерий на жидких средах. Заимствовано из Интернетресурсов.

1. Рост бактерий в виде равномерного помутнения среды разной степени выраженности, присущ факультативным анаэробам.

2. Поверхностный рост бактерий в виде пленки, отличающейся у разных видов:

- 1) пленка едва заметная, тонкая, нежная, бесцветная;
- 2) пленка толстая, вязкая, слизистой консистенции, прилипает к петле и тянется за ней;
- 3) пленка плотная, сухая, морщинистая.

Цвет пленки зависит от наличия пигмента. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для облигатных аэробов.

3. Пристеночный рост заключается в том, что бактерии растут в виде рыхлых хлопьев или зерен, прикрепленных к стенкам пробирки, а питательная среда в пробирке остается совершенно прозрачной,

4. Придонный рост бактерий в виде осадка разного характера и разной степени выраженности на дне пробирки. Осадок может быть обильным или скудным, гомогенным или хлопьевидным, по консистенции вязким или хрупким. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Придонный рост характерен для анаэробных бактерий.

Рост на полужидкой питательной среде.

Для изучения характера микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают уколом в столбик 0,2-0,5% полужидкого агара. Подвижные бактерии в столбике полужидкого агара вызывают выраженное помутнение всей питательной среды, т.е. растут не только по ходу укола (рисунок 23).

Неподвижные формы микробов растут только по ходу прокола среды. При этом питательная среда остается совершенно прозрачной.



Рисунок 23 - Рост в столбике полужидкого агара (в первых 2-х пробирках рост подвижных бактерий). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения работы

1. Изучить характер роста *E. coli* и *S. aureus* на питательном бульоне.
2. Описать в альбоме культуральные свойства *E. coli* и *S. aureus* на МПБ: степень помутнения, наличие пленки на поверхности, наличие пристеночного кольца, наличие осадка, цвет среды.
3. Зарисовать в альбоме рост на МПБ.
4. Изучить характер роста бактерий на твердых питательных средах.
5. Зарисовать в альбоме рост бактерий на МПА в чашке Петри (посев воздуха) б. Письменно описать культуральные свойства одной из выделенных колоний на МПА: форма колонии, диаметр колонии, цвет колонии, рельеф, поверхность колонии, характер краев, структура колонии, консистенция, блеск, прозрачность.

ПРОТОКОЛ №5

Изучение культуральных свойств бактерий на твердых и жидких питательных средах

День иссл	Исследуемый материал	Ход работы	Результат
1	Рост E. coli, S. aureus на МПБ	1. Изучить, описать, зарисовать характер роста бактерий на жидких питательных средах. Описать макроскопические свойства: 1. Степень помутнения 2. Наличие пленки на поверхности	
		3. Наличие пристеночного кольца 4. Наличие осадка 5. Цвет среды	
1	Рост бактерий на МПА в чашке Петри (посев воздуха)	1. Изучение и описание колоний по схеме: Макроскопические свойства: 1. Форма колонии 2. Диаметр колонии 3. Цвет колонии 4. Рельеф 5. Поверхность колонии 6. Характер краев 7. Структура колонии 8. Консистенция 9. Блеск 10. Прозрачность	

Материалы и оборудование: чистые культуры E. coli, S. aureus на МПБ в пробирках, МПА в чашке Петри с ростом колоний бактерий (посев воздуха).

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - С. 50-51.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, -С.42-60.

1.6. Лабораторная работа №6

Тема: Выделение и идентификация чистой культуры аэробных бактерий

Цель: освоение основных этапов выделения и идентификации чистой культуры аэробных микроорганизмов

Студент должен знать:

1. Суть, достоинства и недостатки бактериологического метода исследования; 2. Основные принципы и методы культивирования аэробных бактерий; 3. Методы идентификации бактерий по биохимическим свойствам.

Студент должен уметь:

1. Провести посев петлей на МПА в чашке Петри, на скошенный МПА, среды Гисса, МПБ.
2. Интерпретировать результаты роста бактерий на средах Гисса.

Основные теоретические положения

Бактериологический метод исследования является важнейшим в практической деятельности любой микробиологической лаборатории. От правильного его выполнения зависит определение этиологического фактора, который вызвал заболевание, и соответственно, выбор тактики лечения. Важность этого метода объясняется тем, что во многих случаях врачи имеют дело с микробными ассоциациями, тогда необходимо устанавливать роль каждого из микробов в возникновении болезни.

Выделение чистой культуры микробов является обязательным этапом бактериологического метода исследования. **Чистыми культурами бактерий** называют культуры, состоящие из особей одного вида или подвида. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Для выделения чистой культуры производится посев исследуемого материала на питательные среды. В зависимости от техники посева и концентрации микробов в исследуемом материале бактерии на поверхности плотной питательной среды могут давать сплошной рост (рисунок 24) *или "сливной рост"* (при высокой концентрации бактерий) или образовывать *изолированные колонии* (т.е. не соприкасающиеся краями с соседними колониями при низкой концентрации бактерий). Выделить чистую культуру без получения изолированных колоний невозможно.



Рисунок 24 - Изолированные колонии, вверху – сливной рост бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Для того, чтобы получить рост изолированных колоний, в микробиологических лабораториях применяют несколько методов.

Методы выделения чистых культур аэробов.

Метод Дригальского

Этот метод заключается в последовательном рассеивании исследуемого материала петлей или шпателем на три чашки (три сектора) с плотной питательной средой (рисунок 25). В первую чашку вносят одну каплю исследуемого материала и стерильным шпателем втирают её в поверхность питательной среды. Затем этим же шпателем, не прожигая его, делают таким же образом посев на вторую и третью чашки. Наибольшее количество колоний вырастет на первой чашке, наименьшее – на третьей, и колонии на ней будут изолированными.

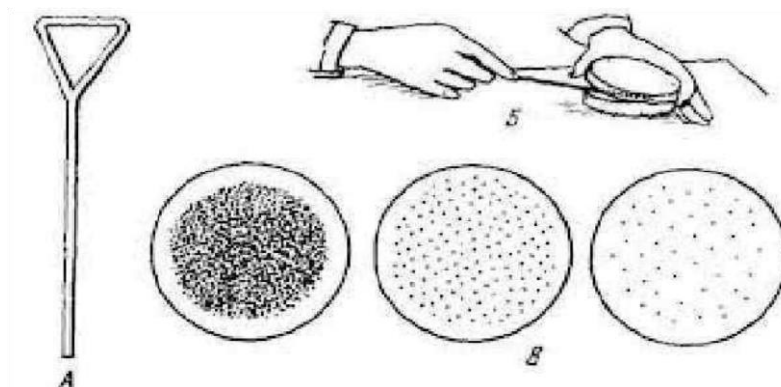


Рисунок 25 - Метод Дригальского Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Метод Коха (метод пластинчатых разведений)

Для этого метода используют несколько пробирок с 15 мл расплавленного и остуженного до 43-45°C питательного агара. В первую пробирку вносят одну бактериальную петлю исследуемого материала и перемешивают. Таким образом получают разведение исследуемого материала 10^{-1} , т.е. в 10 раз. После этого прокаленной и остуженной петлей содержимое 1-й пробирки переносят во 2-ю, перемешивают и получают разведение 10^{-2} , и таким же образом из 2-й в 3-ю и т. д. и получают необходимое количество 10-кратных разведений. Приготовленные разведения выливают из пробирок в стерильные чашки Петри, обозначенные номерами, соответствующими номерам пробирок. После застывания питательного агара с исследуемым материалом чашки помещают в термостат при 37°C на 18-24 часа (рисунок 26). Количество выросших колоний в чашках уменьшается по мере разведения исследуемого материала и колонии будут изолированными (рисунок 27).

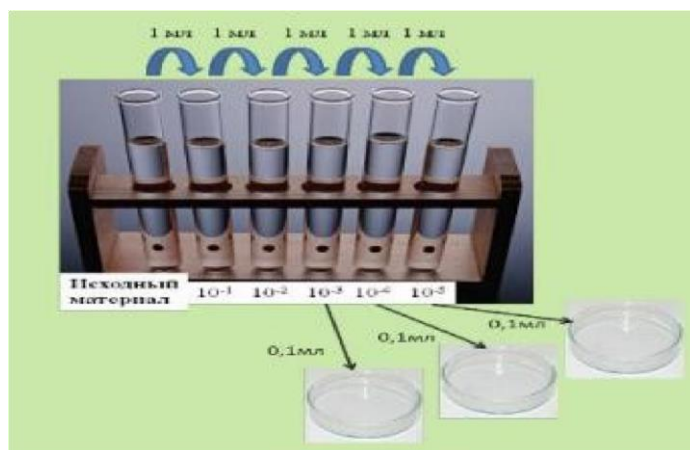


Рисунок 26 - Приготовление разведений исходного материала по методу Коха. Заимствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 27- Метод Коха (готовый результат). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Метод посева истощающим штрихом

Этот метод применяют для выделения чистых культур из исследуемого материала, содержащего обильную смешанную микрофлору. Берут 1 петлю материала и на поверхности плотной питательной среды делают посев так, как указано на рисунке (рисунок 28). Посев можно сделать по всей поверхности питательной среды или сделать посев секторами, прокаливая петлю перед каждым сектором.

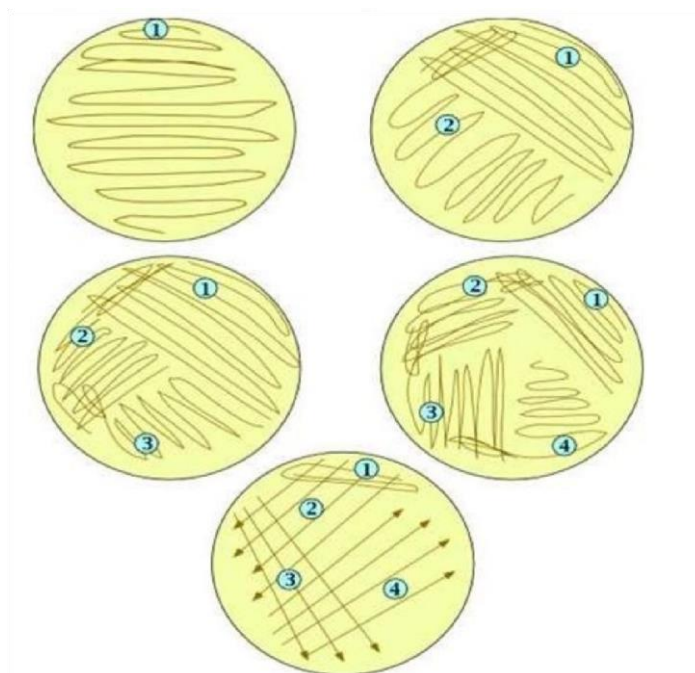


Рисунок 28 – Варианты посева истощающим штрихом. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Метод посева петлей секторами

Питательную среду в чашке Петри делят на 4-5 радиальных секторов. Исследуемый материал засевают петлей во все сектора по очереди, не прокалывая её (рисунок 29). Количество выросших колоний от сектора к сектору будет уменьшаться.

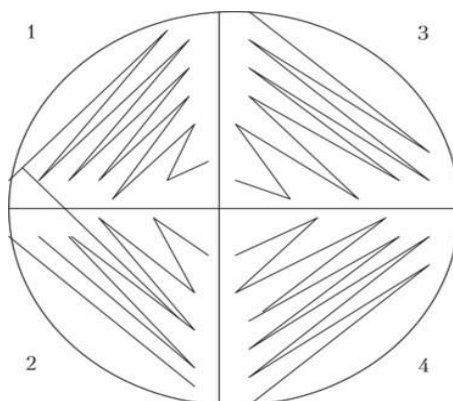


Рисунок 29 - Схема посева петлей секторами на МПА в чашке. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Метод Голда

Чашку Петри с питательной средой со стороны дна расчерчивают на четыре сектора. В первом секторе делают посев исследуемого материала 20-30 штрихами. Петлю прокалывают и проводят 3-4 штриха из материала первого сектора во второй сектор. Петлю снова прокалывают и проводят 3-4 штриха из второго сектора в третий, захватывая последовательно материал от первого, затем второго штриха, далее - третьего и четвертого штрихов. Опять прокалывают петлю и проводят 3-4 штриха из третьего сектора в четвертый, следя за тем, чтобы штрихи первого и четвертого секторов не пересекались

(рисунок 30). Самый обильный рост будет в первом секторе, далее – по убывающей вплоть до получения изолированных колоний.

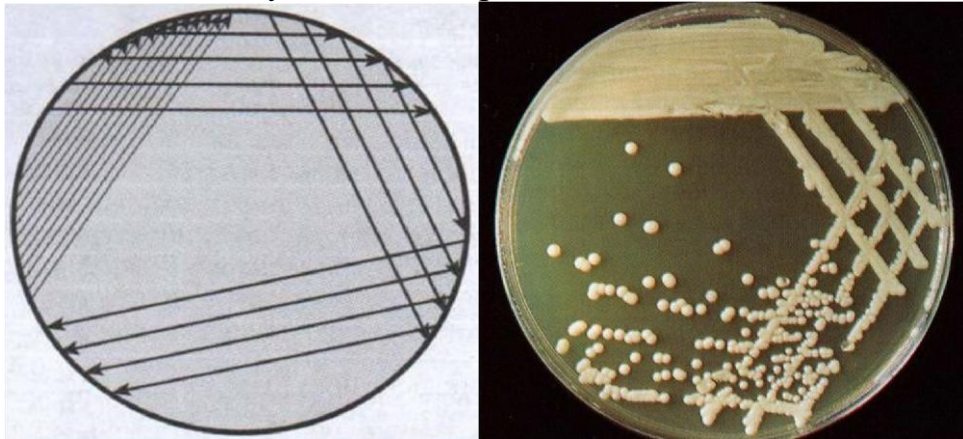


Рисунок 30 - Техника посева по Голду и готовый результат. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Также чистые культуры бактерий можно получить посевом исследуемого материала на **элективные питательные среды**. Например, если посеять исследуемый материал с обильной смешанной микрофлорой на желточносолевой агар (ЖСА), то на нем вырастут только колонии стафилококка в связи с повышенной концентрацией NaCl, угнетающей рост других бактерий. Еще применяется метод создания **особых условий культивирования** с учетом устойчивости некоторых микробов к определенной температуре, кислотам, щелочам, парциальному давлению кислорода, pH и др. Например, мокроту больного туберкулезом перед посевом обрабатывают кислотами или щелочами для освобождения от сопутствующей микрофлоры, т.к. микобактерии туберкулеза обладают кислото- и щелочеустойчивостью. Применяется также комбинированный способ, сочетающий механическое и биологическое разобшение. Для выделения чистой культуры бактерий и одновременного определения концентрации этого вида бактерий в исследуемом материале перед посевом проводят серийные разведения этого материала в физиологическом растворе.

После выделения чистой культуры проводится её **идентификация**, т.е. установление вида и подвида бактерий, для этого подробно изучают комплекс свойств (морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, чувствительности к фагам, антибиотикам и т.д.).

Изучение биохимических свойств выделенных бактерий

Биохимические (ферментативные свойства) — это способность бактерий при помощи ферментов расщеплять сложные органические соединения. Каждый вид микроорганизмов синтезирует определенный набор ферментов, эта способность связана с набором генов, отличающимся у разных видов, поэтому по наличию или отсутствию фермента можно определить вид микроорганизмов. Для изучения ферментативных свойств используют питательные среды строго определенного состава, в которые бактериологической петлей вносят чистую культуру изучаемых микроорганизмов.

К изучению биохимических свойств приступают на III этапе выделения чистой культуры аэробов, после проверки на чистоту культуры. В обязательном порядке изучаются сахаролитические (сбраживание углеводов) и протеолитические (расщепление белков) свойства у выделенной чистой культуры. При необходимости изучают и наличие других ферментов, например каталазы, оксидазы и т.д.

Изучение сахаролитических свойств бактерий

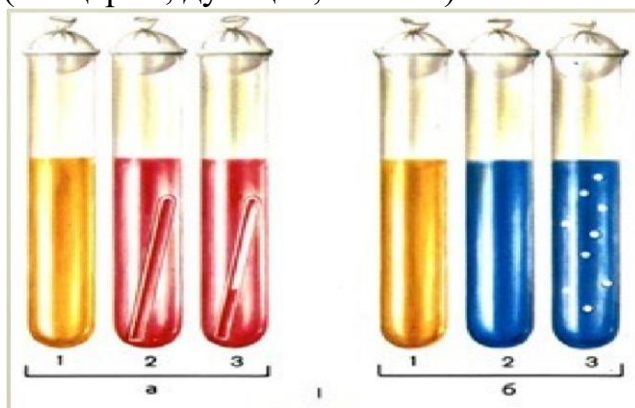
В зависимости от вида микроорганизмов сбраживание углеводов происходит с образованием различных веществ (маслянокислое, уксуснокислое, спиртовое и другие виды брожения). Способность разлагать различные углеводы (как принято называть “сахара”) с образованием альдегидов, кислот и газообразных продуктов (CO_2 , H_2 , CH_4) обнаруживается при посеве на жидкие или полужидкие среды Гисса с различными углеводами (лактоза, глюкоза и др.) и реактивом Андрее или индикатором ВР.

Состав сред Гисса:

1. жидкая или полужидкая питательная (МПБ, МПА) основа;
2. субстрат (1% раствор углевода или многоатомного спирта) - глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маннит и т.д.
3. индикатор рН.

В жидких средах используют индикатор Андрее, имеющий в своем составе кислый фуксин и гидроксид натрия. Готовая среда Гисса имеет рН 7,27,4, при таком значении рН индикатор Андрее бесцветный, а при образовании кислоты вследствие брожения среда краснеет. Для улавливания газообразования используют стеклянный поплавок. В полужидких средах используют индикатор ВР (водный голубой и розоловая кислота), готовая среда бесцветная. При образовании кислоты среда синееет, щелочи – краснеет. Если еще образуются и газообразные продукты, то образующийся газ разрывает столбик.

Среды Гисса еще называют «пестрым» рядом вследствие того, что из-за разного набора ферментов у разных видов бактерий получается чередование разноцветных пробирок (рисунок 31). Различают короткий пестрый ряд (рисунок 32), состоящий из 5 углеводов (глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, маннит) и длинный, в который кроме углеводов короткого ряда добавлены другие моносахариды (арабиноза, ксилоза и т.д.), полисахариды (инулин, крахмал, гликоген) и спирты (глицерин, дульцит, инозин).




а – жидкая среда с углеводами и индикатором Андрее; б – полужидкая среда с индикатором ВР; 1 - нет ферментации углевода; 2 - ферментация углевода с

образованием кислоты; 3 - ферментация углевода с образованием кислоты и газообразных продуктов

Рисунок 31 - Среда Гисса. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Escherichia coli				
Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза
КГ	КГ	КГ	КГ	-



Сахароза не ферментируется, остальные углеводы ферментируются с образованием кислоты и газа

Рисунок 32 - Короткий пестрый ряд E.coli. Заимствовано из Интернетресурсов.

Сахаролитические свойства изучают также и на других дифференциальнодиагностических средах – Клиглера, Ресселя, Олькеницкого, Эндо, Левина, Плоскирева и др.

Например, **среда Эндо** содержит МПА в качестве основы, углевод лактозу, фуксин и натрия сульфит. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет. При росте на этой среде бактерий, сбрасывающих лактозу, рН смещается в кислую сторону в результате образования ацетилальдегида, который взаимодействует с сульфитом натрия и приводит к восстановлению фуксина. Поэтому лактозоположительные бактерии (эшерихии) на среде Эндо образуют темно-красные колонии, а лактозонегативные (шигеллы, сальмонеллы) образуют бледно-розовые колонии (рисунок 33).

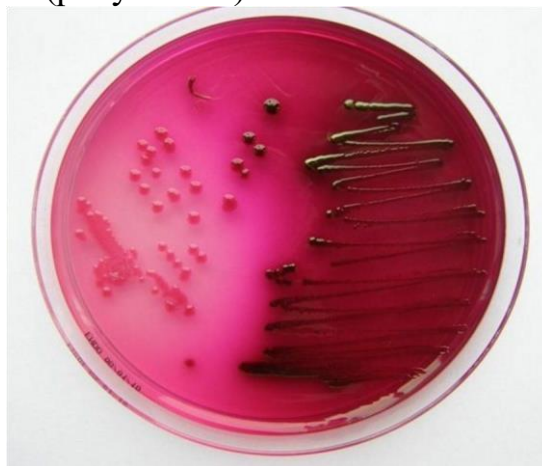


Рисунок 33 - Среда Эндо с ростом лактозонегативных (слева) и лактозопозитивных (справа) бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Изучение протеолитических свойств бактерий.

Для изучения протеолитических свойств чистую культуру засевают на среды с пептоном, желатином, сывороткой, молоком.

Разжижение желатина. Для выявления фермента желатиназы проводят посев культуры уколом в столбик желатина до дна пробирки. Инкубируют при 22°C несколько дней. При наличии желатиназы происходит разжижение желатина, образуется воронка или «елочка» (рисунок 34). Процесс разжижения идет сверху, причем различные виды микробов дают характерную для них форму разжижения: в форме гвоздя - холерный вибрион, в форме чулка стафилококк, послойное, т. е. идущее ровно сверху вниз - синегнойная палочка, в виде перевернутой елочки – сибиреязвенная палочка.

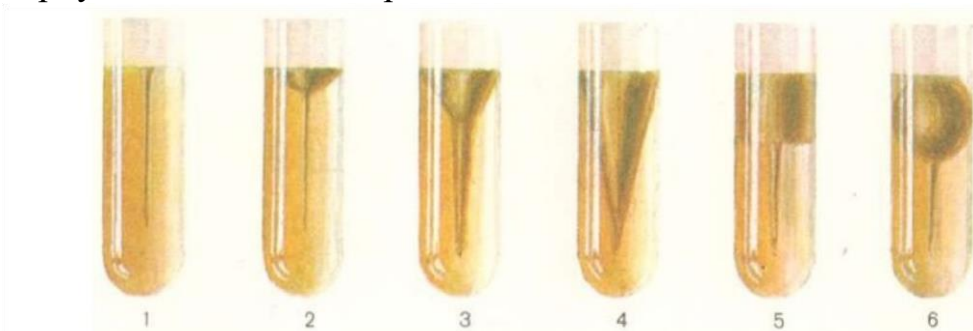


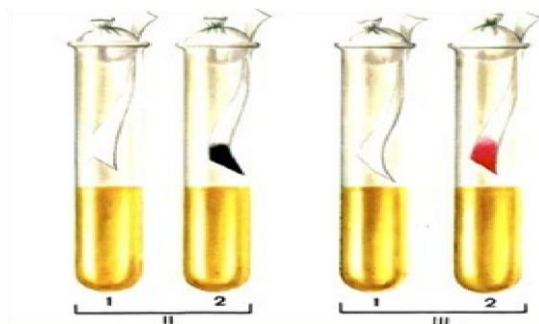
Рисунок 34 - Разные формы разжижения желатина (в виде гвоздика, воронки, чулка, сталактита, послойно сверху вниз). Заимствовано из Интернетресурсов.

Для изучения **казеинолитической активности**, т.е. способности разлагать молочный белок казеин, чистую культуру засевают на молочный агар Эйкмана. Инкубируют в термостате при 36° С 24-48 часов. Положительный результат проявляется в пептонизации (просветлении молока), т.е. вокруг колоний образуются прозрачные зоны на белом молочном фоне питательной среды. Для изучения ферментации **пептонов** бактериями делают посев на пептонную воду или мясо-пептонный бульон. Конечные продукты ферментации пептонов - это индол (C_8H_7N), сероводород (H_2S), аммиак (NH_3) и другие соединения.

Для обнаружения сероводорода в пробирку с МПБ или пептонной водой после посева чистой культуры под пробку помещают узкую полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца. При образовании сероводорода индикаторная бумага чернеет вследствие образования сульфида свинца PbS .

Для выявления индола под пробку помещают индикаторную бумагу, пропитанную насыщенным раствором щавелевой кислоты, при образовании индола бумага краснеет (рисунок 35).

Аммиак определяют при помощи увлажненной лакмусовой бумаги, которую тоже помещают под пробку. В присутствии аммиака бумага синееет.



1- Отрицательный результат 2-Положительный результат

Рисунок 35 - II- определение сероводорода, III – определение индола.

Заимствовано из Интернет-ресурсов.

При необходимости изучают и наличие других ферментов, например уреазы (рисунок 36), цистиназы (рисунок 37), декарбоксилаз аминокислот, фенилаланиндезаминазы, лецитиназы и т.д.

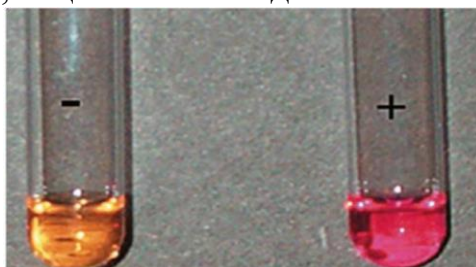


Рисунок 36 - Расщепление мочевины (тест на уреазу). Заимствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 37- Тест на цистиназу (проба Пизу). Заимствовано из Интернетресурсов.

Определение активности окислительно-восстановительных ферментов

Тест на наличие **каталазы** применяется для дифференциальной диагностики стафилококков, энтеробактерий, микобактерий и других микроорганизмов. Каталаза расщепляет перекись водорода на молекулярный кислород и воду. Этим ферментом обладают облигатные аэробы и факультативные анаэробы, т.к. у них в процессе дыхания образуется перекись водорода и для ее расщепления необходим этот фермент. Для определения каталазы в пробирку с 2 мл жидкой

бактериальной культуры добавляют несколько капель свежеприготовленной 3% перекиси водорода. Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазы. Или на предметное стекло наносят каплю взвеси исследуемой чистой культуры и добавляют к ней каплю 1-3% раствора перекиси водорода. При наличии каталазы через 3-5 секунд появляются пузырьки газа (рисунок 38).



Рисунок 38 - Проба на каталазу. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Тест на наличие **оксидазы** применяют для дифференцировки псевдомонад (оксидазоположительные) от энтеробактерий (оксидазоотрицательные). Для определения оксидазы на поверхность выросших на плотной среде колоний бактерий добавляют несколько капель 1% спиртового раствора альфа-нафтола, 1% водного раствора метола. Появление сине-лиловой окраски вследствие образования индофенола доказывает наличие оксидазы (метод Эрлиха).

Также для этого теста часто используются индикаторные полоски **ОКСИтест** (А/О Лахема, Брно, Чешская республика), пропитанные фенилендиамином. Чистую 18-часовую культуру платиновой петлей (под действием других металлов происходит каталитическое окисление фенилендиамина) растирают на индикаторной полоске и при наличии оксидазы примерно через 1 мин появляется сине-пурпурное окрашивание (рисунок 39).

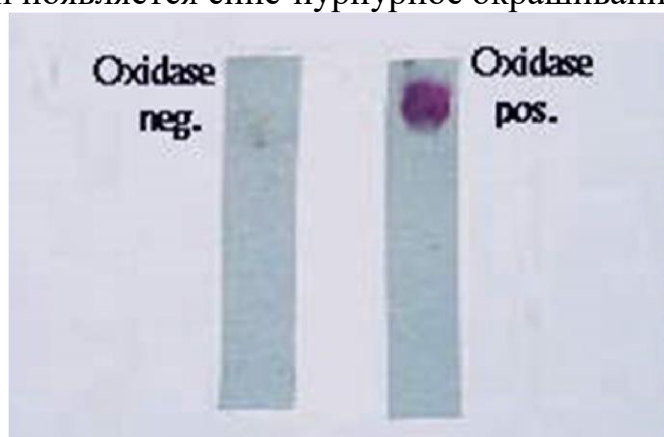


Рисунок 39 - Тест на оксидазу. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Современные методы биохимической идентификации бактерий

В настоящее время для биохимической идентификации бактерий часто вместо дифференциально-диагностических сред используют коммерческие микротест-системы – это полистироловые панели с лунками, в которые

помещены сухие дифференциально-диагностические среды или субстраты, на которые должен подействовать искомый бактериальный фермент (рисунок 40). В практических лабораториях используют диагностические панели API (фирма «bioMérieux», Франция), BBL Crystal (фирма «Becton Dickinson» США), MICRO-LA-TEST (фирма «PLIVA-Lachema», Чехия) и др. Идентификацию выделенной чистой культуры в тест-системах проводят следующим образом:

- Из чистой культуры готовят бактериальную суспензию заданной концентрации в физиологическом растворе или в прилагаемом буфере.
- Вносят приготовленную суспензию в необходимом количестве в лунки панели.
- Инкубируют в термостате (обычно при температуре 37°C в течение 18-24 ч).
- В течение времени инкубации в лунках происходят биохимические реакции, результат которых оценивают по изменению окраски индикатора визуально или с помощью приборов-фотометров.
- Анализируют полученные данные и идентифицируют культуру бактерий спомощью таблиц биохимической активности, компьютерной программы или книг кодов.



Вид системы для энтеробактерий после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительны, нижний – все отрицательны.



Вид системы для стафилококков после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительны, нижний – все отрицательны.

Рисунок 40 - Микротест-системы API для биохимической идентификации. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения работы

Процесс выделения чистой культуры состоит из четырех этапов и занимает как минимум 4 (и более) дня:

I этап – приготовление микропрепарата из исследуемого материала (смеси бактерий), окраска его по Граму, микроскопия, ориентировочное представление о составе смеси и принятие решения о подборе необходимых питательных сред. Посев исследуемого материала на плотную среду в чашке Петри (большая площадь) в целях механического разобщения бактерий и получения изолированных колоний.

II этап – изучают характер роста колоний на питательной среде (рисунок 41). Из изолированных колоний готовят мазок, окрашивают по Граму

и микроскопируют с целью изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий. Остаток колонии отсевают петлей в пробирку на скошенный МПА для получения чистой культуры. Посевы ставят в термостат при 37°C на 18-24 ч.

III этап – проверка чистоты культуры, выросшей на скошенном агаре макроскопически и микроскопически (окраска по Граму), если культура чистая, то ее засевают на дифференциально-диагностические среды Гисса и МПБ для изучения сахаролитических и протеолитических свойств.

IV этап – оценивают результаты биохимических исследований. На средах Гисса отмечают наличие кислых продуктов расщепления углеводов и газообразование. На МПБ обращают внимание на характер роста, отмечают наличие продуктов гидролиза белков (сероводорода и индола). По результатам изучения комплекса свойств выделенных чистых культур определяют виды микроорганизмов с использованием Международного определителя бактерий Берджи.

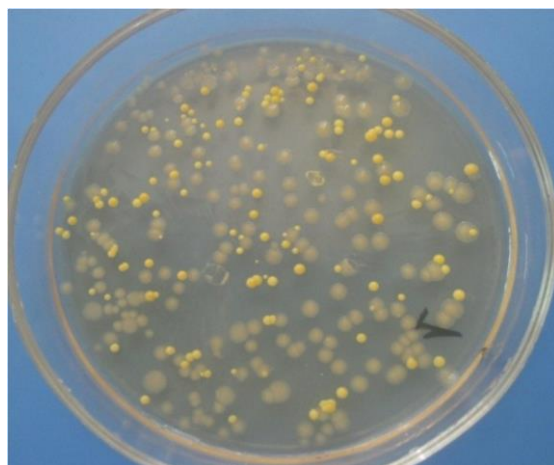


Рисунок 41 - II этап выделения чистой культуры аэробов. Рост смеси бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

ПРОТОКОЛ №6 Выделение чистой культуры аэробов

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1 день	Смесь бактерий в физиологическом растворе в пробирке.	1.Мазок, окраска по Граму, бактериоскопия; 2.Отсев петлей на МПА в чашке Петри по методу Голда; 3.Посевы помещают в термостат 37°C на 24 ч.	

2 день	Рост колоний на МПА в чашке.	1.Изучить и описать рост колоний (по схеме) 2.Выбор изолированных колоний, мазок из части выбранной колонии, окраска по Граму, микроскопия. 3.Отсев оставшейся части колоний на скошенный МПА; 4. Посевы помещают в термостат при 37 ⁰ С на 24 ч.	
3 день	Рост культуры на скошенном МПА	1. Изучение и описание роста. 2. Проверка чистоты культуры – мазок, окраска по Граму, микроскопия; 3.Отсев на пестрый ряд (среды Гисса), МПБ.	
4 день	Рост на средах Гисса и МПБ	1. Учет ферментативных свойств. 2. Заключение о выделенной культуре.	

Материалы и оборудование: смесь бактерий в физиологическом растворе в пробирке, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, чашки Петри с МПА, термостат, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, наборы красителей по Граму, среды Гисса чистые и засеянные, МПБ в пробирке, скошенный МПА в пробирке, индикаторные полоски на индол и сероводород.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 46-54.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 66-69.

1.7. Лабораторная работа №7

Тема: Выделение чистой культуры анаэробов

Цель: освоение методов выделения чистой культуры анаэробов

Студент должен знать:

- 1.Методы создания анаэробных условий и принципы культивирования облигатных анаэробов. **Студент должен уметь:**

1. Сделать посев материала на среду Китт-Тароцци и среду Вильсона-Блера пометоду Перетца.
2. Приготовить фиксированный микропрепарат и окрасить его по Граму.
3. Микроскопировать с иммерсионной системой микроскопа.
4. Дифференцировать микроорганизмы по морфологическим и тинкториальным свойствам в микропрепарате.

Основные теоретические положения

По типу дыхания различают аэробные и анаэробные микроорганизмы. **Облигатные анаэробы** получают энергию путем ферментативного метаболизма и не могут расти в присутствии кислорода воздуха, который токсичен для них. Поэтому для выделения и идентификации чистой культуры облигатных анаэробов нужно создать анаэробные условия. Необходимо также позаботиться о том, чтобы исследуемый материал как можно быстрее был засеян на питательную среду.

Для облигатных анаэробов готовят особые питательные среды с низким окислительно-восстановительным потенциалом, т.е. от -10 до -40 мВ. В такие питательные среды в качестве редуцирующих веществ добавляют цистеин, глюкозу, аскорбиновую кислоту и др. Также эти среды должны содержать все необходимые питательные вещества, витамины и факторы роста, т.к. анаэробный тип дыхания энергетически менее выгоден, чем аэробный. В практических лабораториях чаще всего используют следующие среды:

1. **Среда Китт-Тароцци** – готовится на основе бульона Хоттингера с добавлением 0.5% глюкозы и кусочков говяжьей печени или фарша (для адсорбции растворенного в среде кислорода, т.к. животные ткани паренхиматозных органов активно связывают кислород) и разливается по пробиркам. Перед посевом среду кипятят (регенерируют) для удаления растворенного в ней воздуха, быстро охлаждают до 45⁰С, засевают и заливают стерильным вазелиновым маслом слоем в 1 см для предупреждения диффузии кислорода из воздуха (рисунок 42).



Рисунок 42 - Среда Китт-Тароцци с ростом бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

2. **Среда Вильсона-Блера** – к питательному агару добавляют 1% глюкозы, 1% сульфата натрия, 0,08% хлорида железа.

Сульфитредуцирующие анаэробы, например клостридии, растут на этой среде в виде черных колоний за счет восстановления Na_2SO_3 в Na_2S и его взаимодействия с FeCl_2 с образованием FeS черного цвета (рисунок 43).

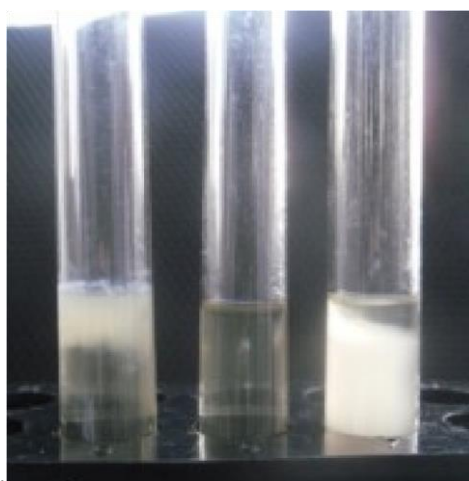


Рисунок 43 - Среда Вильсона-Блера с ростом *Cl. perfringens*. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

3. **Анаэробный кровяной агар** – к эритрит-агару добавляют среду 199, цитратную кровь, гемин, менадион, твин 80.

4. **Сахарный агар** – в качестве основы используют эритрит-агар, к которому добавляют 1% глюкозы.

5. **Тиогликолевая среда, или среда для контроля стерильности** – состоит из пептона, глюкозы, хлорида натрия, тиогликолята натрия, сульфита и бикарбоната натрия, 0,7% агар-агара. При росте на этой среде аэробов она мутнеет в верхней части (рисунок 44), анаэробов - в нижней части (пробирка справа, пробирка в центре – контроль). Это достигается благодаря агар-агару, который обеспечивает полужидкое состояние среды и тиогликоляту натрия, который поддерживает анаэробные условия в нижней части пробирки.



Пробирка в центре – контроль, слева – рост аэробов, справа – рост анаэробов
Рисунок 44 - Тиогликолевая среда. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

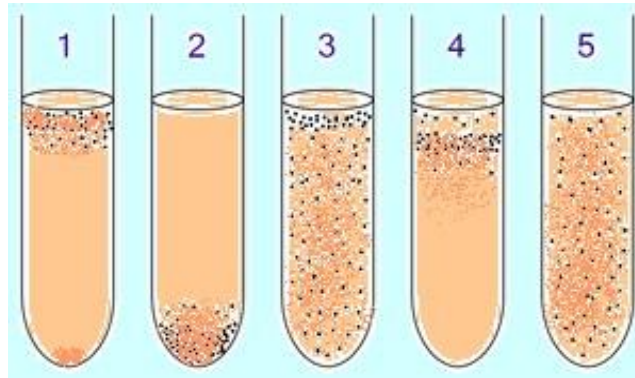
Для создания анаэробных условий разработаны и применяются физические, химические и биологические методы.

Методы создания анаэробных условий

Физические методы

1. Культивирование в высоком столбике плотной или полужидкой среды.

Для приготовления высокого столбика питательную среду наливают в пробирку в количестве не менее 10 мл, чтобы питательная среда занимала 3/4 объема пробирки. Посев делают уколом в столбик, при этом облигатные аэробы будут расти в верхней части пробирки, где кислорода больше, а облигатные анаэробы – в нижней, где низкий окислительно-восстановительный потенциал. Факультативные анаэробы растут в основном в верхней части (окислительное фосфорилирование является энергетически более выгодным, чем гликолиз), однако они могут расти и на всем протяжении среды, так как от O_2 не зависят (рисунок 45).



1 аэробы; 2 облигатные анаэробы; 3 факультативные анаэробы;
4 микроаэрофилы; 5 аэротолерантные бактерии.

Рисунок 45 - Характер роста в высоком столбике полужидкого питательного агара. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Микроаэрофилы нуждаются в пониженной концентрации кислорода и растут в верхней части пробирки.

Аэротолерантные анаэробы безразличны к кислороду и равномерно распределяются по пробирке.

2. Регенерация жидких питательных сред перед посевом путем кипячения в течение 15-20 мин с последующим быстрым охлаждением до $45^{\circ}C$ и посевом исследуемого материала. Затем среду сразу заливают стерильным вазелиновым маслом слоем в 1-2 см для предупреждения диффузии кислорода из воздуха.

3. Механический метод - это откачивание воздуха из герметически закрытой емкости, например анаэроостата, с помощью вакуумного насоса. Затем емкость заполняют каким либо инертным газом (азот) или природным газом (рисунок 46).



Рисунок 46 – Анаэростат. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Химические методы

1. **Газогенерирующие системы типа GasPak** создают анаэробноз за счет образования H_2 и CO_2 и поглощения кислорода такими химическими соединениями как металлическое железо, щелочной раствор пирогаллола, гидросульфит натрия и др. (рисунок 47). Для контроля степени анаэробноза имеется специальный индикатор.

Например, система *GasPak Anaerocult-A* создает анаэробные условия для культивирования анаэробных бактерий родов *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*. Система *GasPak Anaerocult-C* создает микроаэрофильные условия с концентрацией CO_2 8-10% , O_2 5-6%. Такая атмосфера необходима для культивирования бактерий родов *Neisseria*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

2. **Добавление в питательные среды редуцирующих веществ** для снижения окислительно-восстановительного потенциала (глюкоза и другие сахара, тиогликолевая кислота, муравьинокислый натрий и др.).



GasPak — система химическим путем обеспечивает постоянство газовой смеси приемлемой для роста большинства анаэробных микроорганизмов. В герметично контейнере, в результате реакции воды с таблетками бикарбоната натрия образуется водород и углекислый газ. Водород затем реагирует с кислородом газовой смеси на катализаторе с образованием воды.

Рисунок 47 - Газогенерирующие системы типа *GasPak*. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Биологические методы

1. **Метод Фортнера** заключается в совместном культивировании на питательной среде аэробных и анаэробных бактерий. Для этого питательную среду (кровяной агар) в чашке Петри делят пополам, вырезая стерильным скальпелем полосу агара в центре. Аэробные бактерии засевают на одну половину, анаэробные – на другую (рисунок 48). Обе половины чашки Петри герметично закрывают с помощью парафина, воска, пластилина и инкубируют в термостате. Первыми растут аэробы, потребляя кислород и снижая его концентрацию до нужного анаэробам уровня, и они растут во вторую очередь.

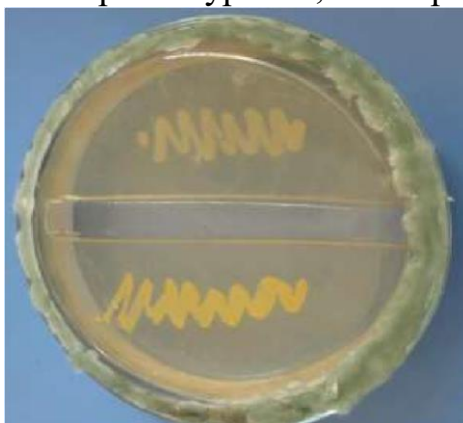


Рисунок 48 - Метод Фортнера. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

2. **Добавление к питательным средам животных тканей** (кусочков печени, почек и других внутренних органов) для адсорбции содержащегося в среде кислорода (например, кусочки печени в среде Китт-Тароцци).

Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов Метод Цейслера.

Исследуемый материал рассеивают штрихами по поверхности плотной питательной среды для анаэробов (сахарный, кровяной агар и др.) и помещают в анаэроостат или систему типа *GasPak*. Отдельные выросшие колонии пересеивают на тиогликолевую среду или среду Китт-Тароцци для получения чистой культуры и ее изучения.

Метод Вейнберга.

Делают посев уколом в высокий столбик сахарного агара, рост облигатных анаэробов будет располагаться у дна пробирки.

Метод Вейона-Виньяля.

Засевают в растопленный и остуженный до 45°C питательный агар исследуемый материал, перемешивают и насыщают засеянный агар в стерилизованную стеклянную трубку размерами 30x0,5 см. Оба конца трубки закрывают пробками и помещают ее в термостат. Если посев был не слишком густой, то в среде вырастают ясно видимые снаружи колонии бактерий, которые можно извлечь, распилив трубку в месте нужной колонии (рисунок 49).

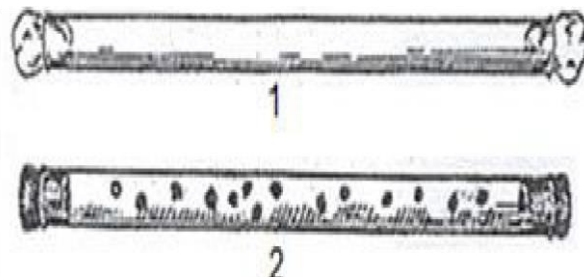


Рисунок 49 - Метод Вейона-Виньяля. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Метод Перетца.

Исследуемый материал вносят в 10-15 мл расплавленной и остуженной до 45°C плотной питательной среды (сахарный агар, среда Вильсона-Блера), перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри, на дне которой на двух стеклянных или деревянных палочках лежит стерильное предметное стекло. Содержимое пробирки заливают сбоку под стекло так, чтобы заполнить пространство между стеклом и дном чашки Петри и вытеснить из него весь воздух (рисунок 50). Чашку закрывают крышкой и помещают в термостат. Колонии анаэробов вырастут в толще питательной среды под стеклом. Далее стекло снимают и отдельные колонии отсеивают на среду Китт-Тароцци для выделения чистой культуры.



Рисунок 50 - Метод Перетца. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы

Выделение чистых культур анаэробов занимает 4 дня.

1 день - накопление материала. Исследуемый материал засевают на среду Китт – Тароцци, прокипяченную в течение 20 минут перед посевом и остуженную. Посев заливают вазелиновым маслом. Можно после посева материала среду прогреть 15 мин при 80° для уничтожения вегетативной флоры; споры анаэробов при этом не уничтожаются. Пробирки с посевом ставят в термостат. **2 день** – через сутки среда мутнеет, иногда в ней видны пузырьки газа. Делают мазки, окрашивают их по Граму и обнаруживают споровые и неспоровые грамположительные палочки. Далее делают пересев со среды Китт-Тароцци на плотную питательную среду (сахарный агар, среда Вильсона-Блера и др.), используя различные методы (Цейслера, Вейнберга, Перетца и др.) **3 день.**

а) просматривают посевы, отмечают изолированные колонии, готовят из них микропрепараты, микроскопируют и пересевают изолированные колонии на среду Китта-Тароцци для выделения чистой культуры. Посев заливают вазелиновым маслом;

б) инкубирование в термостате (37°C).

4 день.

а) готовят микропрепараты со среды Китт-Тароцци, микроскопируют для проверки чистоты культуры (просматривают не менее 40 полей зрения); б) изучение других свойств выделенной чистой культуры.

ПРОТОКОЛ № 7 Выделение чистой культуры анаэробов

День иссл	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	Взвесь почвы в физиологическом растворе	1. Сделать посев почвенной взвеси на среду Китт-Тароцци. 2. Инкубировать в термостате при 37° С 24 часа	
2	Рост в среде Китт-Тароцци	1. Изучить и описать характер роста. 2. Приготовить мазок, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать. 3. Сделать посев на среду Вильсона-Блера по методу Перетца. 4. Инкубировать в термостате при 37° С 24 часа.	
3	Рост колоний в толще среды Вильсона-Блера по методу Перетца	1. Изучить и дать характеристику колониям. 2. Приготовить микропрепарат из изолированных колоний, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать. 3. Отсеять выбранные изолированные колонии на среду Китт-Тароцци. 4. Инкубировать в термостате при 37° С 24 часа.	
4	Рост в среде Китт-Тароцци	1. Изучить и описать характер роста. 2. Для проверки чистоты культуры приготовить мазок, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать. 3. Сделать заключение о выделенной культуре.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; стерильный 0,9% раствор NaCl в пробирке; набор красителей по методу Грама; промывалка; чистые предметные стекла; лоток со стеклянным

«мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло; пробирки с чистой и засеянной средой Китт-Тароцци; пробирка с почвенной взвесью; пробирка с растопленной и остуженной до 45⁰С средой Вильсона–Блера; стерильная чашка Петри с предметным стеклом для посева по методу Перетца; чашка с ростом колоний на среде Вильсона–Блера по Перетцу, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 54-60.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 69-71.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.47-54.

1.8. Лабораторная работа №8

Тема: Индикация вируса в курином эмбрионе с помощью реакции гемагглютинации

Цель: освоение методики постановки и учета реакции вирусной гемагглютинации

Студент должен знать:

1. Особенности культивирования вирусов как облигатных внутриклеточных паразитов;
2. Методы и принципы индикации вирусов в курином эмбрионе, культурах клеток и организме чувствительных животных.

Студент должен уметь:

1. Поставить ориентировочную реакцию гемагглютинации с аллантоисной жидкостью и правильно интерпретировать ее результат.

Основные теоретические положения

В тканях куриного эмбриона (рисунок 51) способны размножаться многие патогенные вирусы человека и животных.

Преимущества данного метода культивирования вирусов: - куриные эмбрионы стерильны и скорлупа надежно защищает их от проникновения микроорганизмов;

- эмбрионы восприимчивы ко многим патогенным вирусам человека; - можно получить большое количество вирусосодержащего материала; - метод прост и доступен в любой вирусологической лаборатории.

Недостатки метода:

- не все вирусы способны репродуцироваться в курином эмбрионе;
- куриный эмбрион представляет собой закрытую систему и поэтому труднонаблюдать за происходящими в нем после заражения патологическими изменениями;
- при вскрытии зараженных куриных эмбрионов часто не наблюдается видимых изменений и для выявления вируса применяют реакцию гемагглютинации и другие методы.

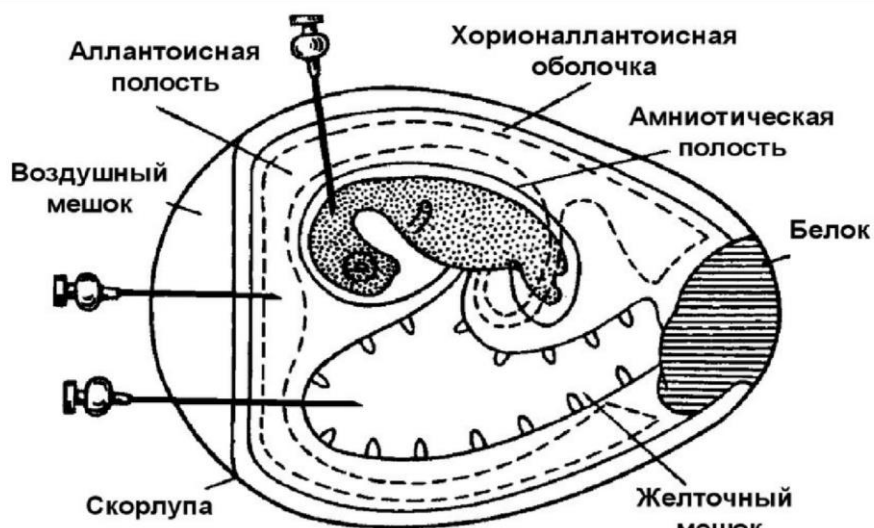


Рисунок 51 - Строение куриного эмбриона. Заимствовано из Интернетресурсов.

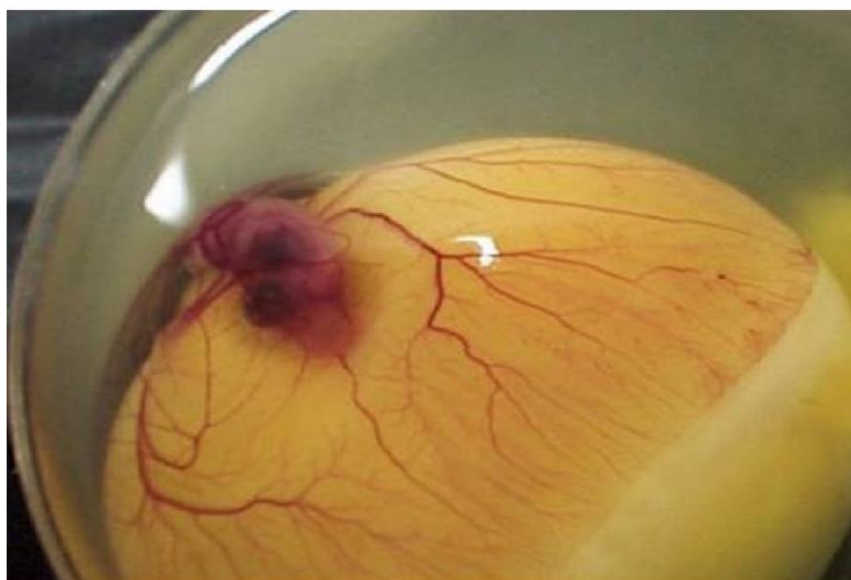
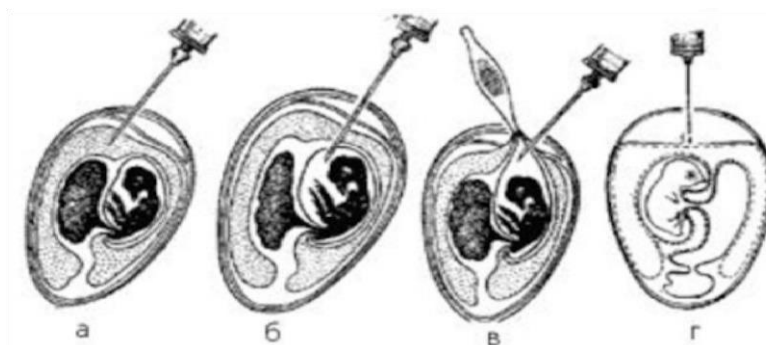


Рисунок 52 - Куриные эмбрионы 10-дневной инкубации. Заимствовано из Интернет-ресурсов.



Рисунок 53 - Развитие куриного эмбриона (по дням). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Для вирусологических исследований используют куриные эмбрионы 7-12дневного возраста (рисунок 52, 53). В зависимости от тропизма и биологических свойств вируса проводят заражение в амниотическую и аллантоисную полости, в желточный мешок, на хорион-аллантоисную оболочку куриного эмбриона открытым или закрытым способом (рисунок 54).



а- в полость аллантоиса; б- в амнион закрытым способом; в- в амнион открытым способом; г- на хорионаллантоисную оболочку

Рисунок 54 - Методы заражения куриных эмбрионов. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на способности вирусов, обладающих гемагглютинидами, вызывать склеивание эритроцитов различных видов животных, птиц, человека и применяется для индикации вирусов в курином эмбрионе (рисунок 55). Впервые явление агглютинации куриных эритроцитов вирусами гриппа описал в 1941 г Г. Хёрст.

Стадии РГА:

- 1) Адсорбция вируса на эритроците за счет взаимодействия вирусного гемагглютинина и комплементарных рецепторов эритроцитов.
- 2) Склеивание эритроцитов.
- 3) Элюция (разрушение вирусными ферментами рецепторов эритроцитов и отрыв вируса с поверхности эритроцита).

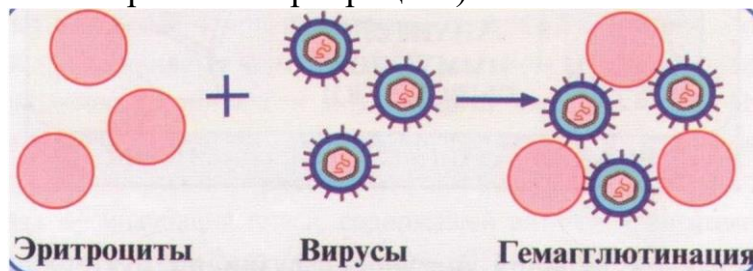


Рисунок 55 - Механизм вирусной гемагглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы:

Для постановки РГА необходимы:

- вирусосодержащий материал (в данном случае – аллантоисная жидкость);
- 5% взвесь эритроцитов (кур, человека) в изотоническом растворе NaCl; - изотонический раствор NaCl (электролит).

На предметное стекло наносят каплю аллантоисной жидкости (опыт) и каплю изотонического раствора NaCl (контроль). В обе капли добавляют 5% взвесь эритроцитов и перемешивают. Через 3-5 мин проводят учет реакции. Если реакция положительная, то опытная капля просветляется и в ней появляется зернистый осадок склеившихся эритроцитов (рисунок 56). Если вирус отсутствует или не обладает гемагглютинином, обе капли остаются мутными без зернистого осадка.

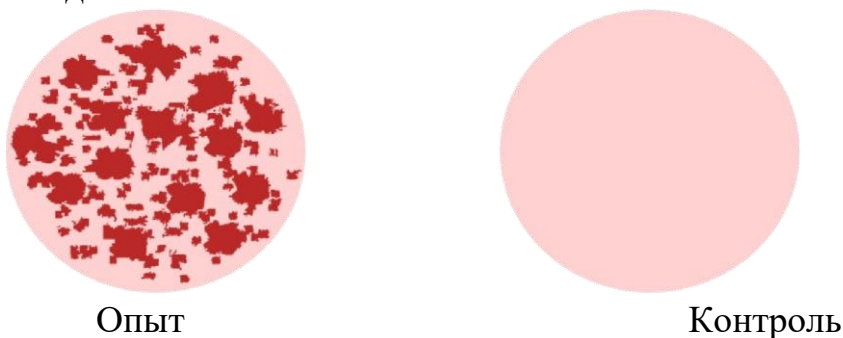


Рисунок 56 - Положительный результат реакции вирусной гемагглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

РГА используют не только для индикации вирусов, но и для определения их количества (титра) (рисунок 57). Титр вируса – это максимальное разведение вирусосодержащего материала, которое полностью агглютинирует стандартную суспензию эритроцитов (рисунок 58). Титр вируса выражается в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ).

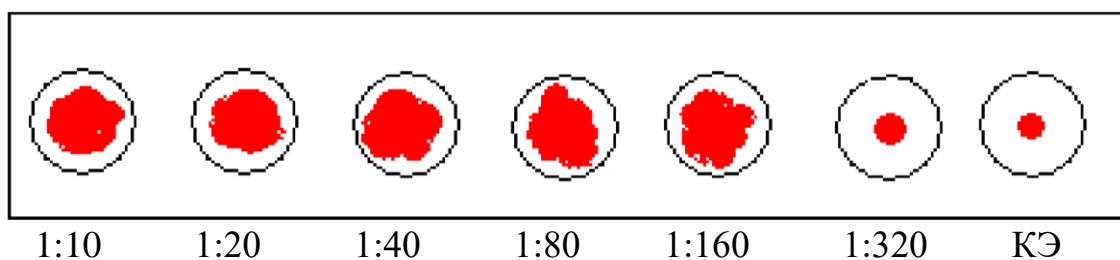


Рисунок 57 - Определение гемагглютинирующего титра вируса. В данном случае – 1:160. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

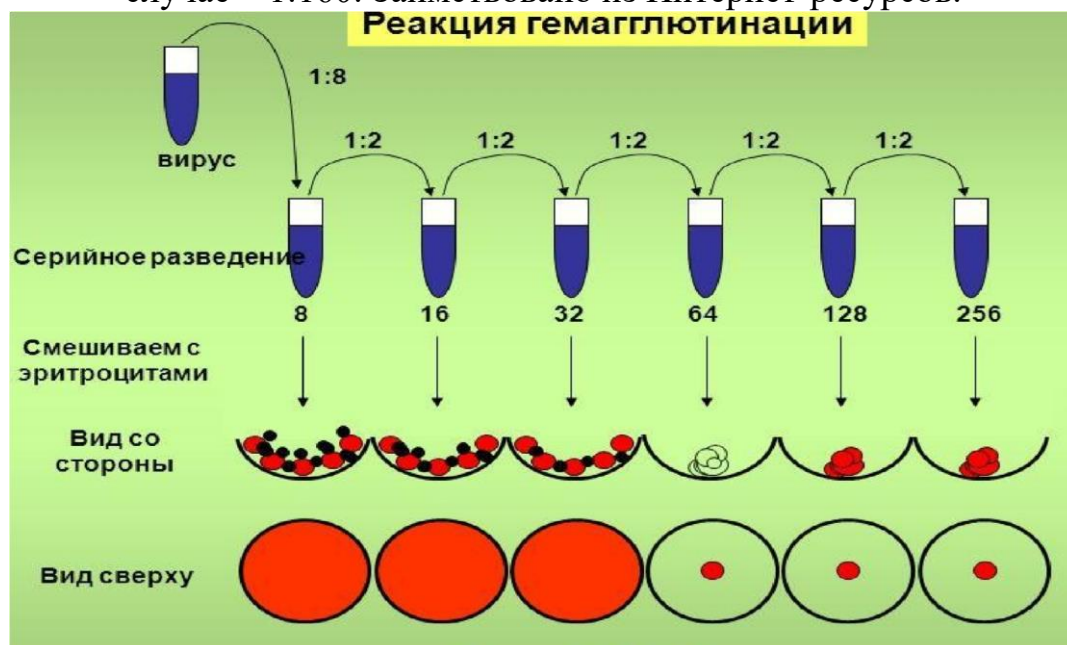


Рисунок 58- Определение гемагглютинирующего титра (ГАЕ) вируса. В данном случае – 1:32. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

ПРОТОКОЛ №8 Тема: «Выявление вируса в курином эмбрионе с помощью реакции гемагглютинации»

День иссл	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	Аллантоисная жидкость зараженного куриного эмбриона	1.Поставить реакцию гемагглютинации (РГА) с 5 % взвесью куриных эритроцитов. 2.Учесть результат, зарисовать. 3.Сделать заключение.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; стерильный 0,9% раствор NaCl в пробирке; чистые предметные стекла; лоток со стеклянным «мостиком»; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; пробирка с аллантоисной жидкостью, пробирка с 5% взвесью куриных эритроцитов.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 281-295.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 87-94.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина»

1.9. Лабораторная работа №9

Тема: **Опыт по трансдукции фага**

Цель: освоение методики постановки опыта по трансдукции и интерпретации его результата

Студент должен знать:

1. Особенности генома бактерий и вирусов;
2. Виды и механизмы мутаций и генетических рекомбинаций у микроорганизмов.

Студент должен уметь:

1. Правильно интерпретировать результат опыта по трансдукции.

Основные теоретические положения

Трансдукция – это перенос генетической информации от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью фага. Трансдукция происходит благодаря тому, что в процессе репродукции фагов в бактериальной клетке могут образовываться фаги, содержащие наряду с фаговой ДНК или вместо нее фрагменты бактериальной ДНК. Такие фаговые частицы называются трансдуцирующими. При заражении новых клеток такие фаги передают бактерии-реципиенту генетический материал донора. Выяснилось, что некоторые фаги переносят разные гены бактерий (неспецифическая трансдукция), а некоторые - строго определенные (специфическая трансдукция).

При специфической трансдукции вирус включает фрагмент ДНК бактерий в свой геном и передает его, лизогенизируя бактерии-реципиенты.

Наиболее известным примером специфической трансдукции является трансдукция, осуществляемая фагом λ . Умеренный фаг λ при лизогенизации бактерий в результате сайтспецифической рекомбинации (разрыв и перекрестное воссоединение цепей ДНК) встраивается в бактериальную хромосому на участке между локусами *bio* и *gal*. Выход ДНК фага из хромосомы при индукции профага осуществляется также по механизму сайтспецифической рекомбинации, но приблизительно с частотой один раз на миллион событий при выходе профага он захватывает расположенные рядом участки *gal* либо *bio* (рисунок 59). В результате этого прилегающая к профагу область бактериального генома выщепляется из состава бактериальной хромосомы и

переходит в состав генома свободного фага. Соответствующая по расположению в петле область генома профага остается в бактериальной хромосоме.



1 Интеграция ДНК умеренного бактериофага в определенный участок хромосомы клетки-донора. 2 – захват соседних бактериальных генов (например «gal» или «bio» в случае фага лямбда) при выходе из хромосомы Рисунок 59 - Основные этапы. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

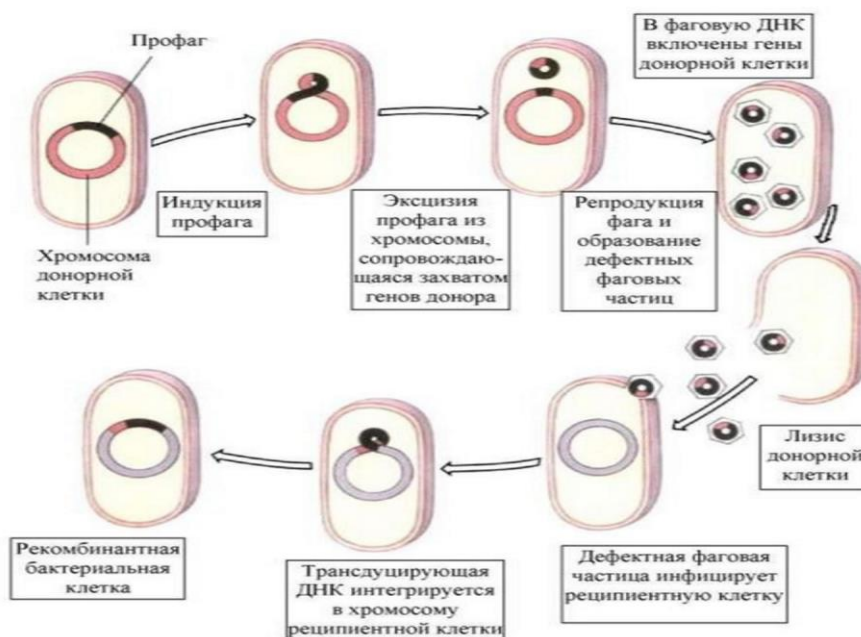


Рисунок 60 - Механизм специфической трансдукции. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Было установлено, что при индукции профага λ чаще образуются дефектные частицы, содержащие гены локуса *gal*. Такие дефектные частицы обозначают λ gal (фаг λ , defective, gal). Если в геноме фага λ содержится ген, ответственный за синтез биотина, то – λ bio. Следовательно, если фаголизатом, полученным после заражения бактерий-доноров фагом λ , в котором содержится дефектные частицы, обработать реципиентные клетки *E. coli* bio⁻ или gal⁻, то с частотой 10^{-5} - 10^{-6} образуются трансдуктанты *E. coli* bio⁺ или gal⁺. Таким образом, для осуществления специфической трансдукции необходима предварительная лизогенизация бактерий-доноров и последующая индукция профага из клеток (рисунок 60). Образовавшиеся при этом дефектные трансдуцирующие частицы фагов заражают клетки реципиентного штамма, происходит их лизогенизация и встраивание профага с участком генома бактерий донора в хромосому реципиента.

Ход выполнения опыта по трансдукции:

Реципиентная культура кишечной палочки, не утилизирующая лактозу (*E. coli lac*⁻), засевадается на ½ среды Эндо в чашке Петри – «контроль». Фаголизат (продукт лизиса *E. coli lac*⁺ умеренным бактериофагом φdgal) смешивают с культурой-реципиентом, выдерживают в термостате при 37°С 60 мин и засевают на вторую половину среды Эндо – «опыт» (рисунок 61). Посевы ставят в термостат при 37°С на сутки. При учете результатов определяют наличие и характер роста микробов на секторах чашки Петри (опыт, контроль).

Фаг φ E. coli lac⁺(лизогения)

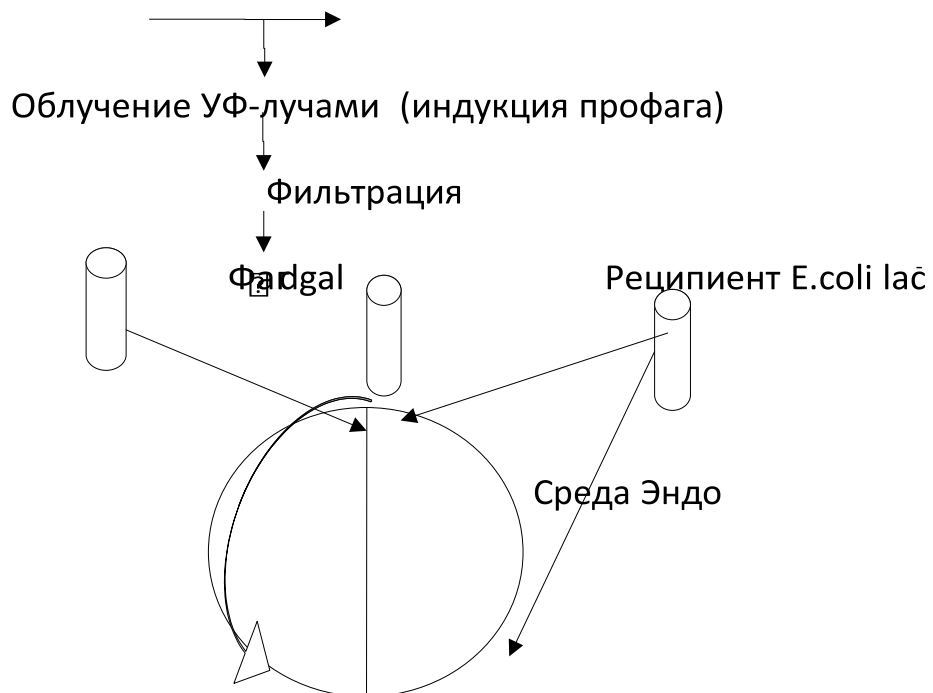


Рисунок 61 - Схема постановки опыта по трансдукции

Примечание.

Среда Эндо содержит МПА, лактозу, фуксин и натрия сульфит. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет. При сбраживании эшерихиями лактозы рН смещается в кислую сторону в результате образования ацетилальдегида, который взаимодействует с сульфитом натрия и приводит к восстановлению фуксина. Поэтому лактозоположительные штаммы кишечной палочки на среде

Эндо образуют темно-красные колонии с металлическим блеском. Лактозонегативные эшерихии образуют бледно-розовые колонии (рисунок 62).



Рисунок 62 - Лактозопозитивные (справа) и лактозонегативные (слева) колонии на среде Эндо. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

ПРОТОКОЛ №9 Опыт по трансдукции фага

День иссл	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	1.Штамм-реципиент E.coli lac ⁻ 2.Трансдуцирующий фаг λdgal	1. На 1/2 среды Эндо в чашке Петризасеять петлей реципиентный штамм. 2. В пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора внести по 1 петле реципиентного штамма и трансдуцирующего фага λdgal. 3. Поставить пробирку с фагом и реципиентом в термостат на 60 мин, затем сделать посев из нее на вторую половину среды Эндо. 4. Поместить чашку с засеянной средой Эндо в термостат на сутки при 37°C.	
2.	Рост на среде Эндо	1. Учет результатов роста колоний. 2. Оформление протокола. 3. Заключение.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; пробирка с 1 мл стерильного физиологического раствора; пробирка с культурой реципиента E.coli lac⁻; пробирка с трансдуцирующим фагом λdgal; чашка Петри с чистой средой Эндо; среда Эндо с ростом колоний; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 70-74

2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина»

1.10. Лабораторная работа №10

Тема: **Микроскопическое исследование зубного налета**

Цель: освоение техники приготовления микропрепарата из зубного налета и его микроскопического исследования

Студент должен знать:

1. Особенности качественного и количественного состава микрофлоры ротовой полости

Студент должен уметь:

1. Приготовить фиксированный микропрепарат из зубного налета и дифференцировать микроорганизмы по морфологическим и тинкториальным свойствам под микроскопом.

Основные теоретические положения

Ротовая полость является практически идеальной средой для микроорганизмов в связи с наличием оптимальной температуры, влажности и питательных веществ. Содержание микроорганизмов в слюне составляет от 5 млн до 5 млрд в 1 мл, в зубном налете – от 1 млн до 1 млрд в 1 г материала. По данным различных исследователей, число видов бактерий, обнаруживаемых в ротовой полости, составляет от 400 до 700. Многообразие видов зависит от возраста человека, его образа жизни, гигиенических привычек, состояния зубов, наследственности, характера питания и др.

Микрофлора полости рта подразделяется на резидентную (постоянную) и факультативную (случайную). Резидентная микрофлора ротовой полости представлена в основном бактериями - облигатными анаэробами (3/4 всех микробных видов), остальные виды представлены факультативными анаэробами и аэробами.

Характеристика наиболее важных представителей микрофлоры полости рта (таблица 1).

Под *Staphylococcus*. Стафилококки – гроздевидные грамположительные кокки, в полости рта здорового человека встречаются в среднем в 30 % случаев. В зубном налете и на деснах здоровых людей присутствуют в основном *Staphylococcus epidermidis*. У некоторых людей в полости рта могут обнаруживаться и *Staphylococcus aureus*, способные вызвать гнойно-воспалительные заболевания ротовой полости.

Род *Streptococcus*. Стрептококки являются основными обитателями полости рта (в 1 мл слюны до 10^8 – 10^{11} стрептококков). В окрашенных мазках стрептококки располагаются в виде цепочек, грамположительны. Большинство из них являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами, но встречаются и строгие анаэробы (например, пептострептококки). Обладая значительной ферментативной активностью, стрептококки сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, вызывая молочнокислое брожение. Кислоты, появляющиеся в результате брожения, подавляют рост ряда гнилостных микробов, встречающихся в полости рта. *S. salivarius* и *S. mitis* в 100 % случаев присутствуют в полости рта. *S. sanguis* обнаруживаются в большом количестве на зубах, а *S. salivarius* – главным образом на поверхности языка. *S. mutans* и *S. sanguis* выявлялись в ротовой полости только после прорезывания зубов. Оральные стрептококки группы *S. mutans* играют ведущую роль в развитии кариеса зубов.

Род *Veillonella*. Вейллонеллы – это мелкие анаэробные грамотрицательные кокки, располагаются кучками, парами или короткими цепочками. Вейллонеллы хорошо ферментируют уксусную, пировиноградную и молочную кислоты, т. е. нейтрализуют кислые продукты метаболизма других бактерий и являются антагонистами кариесогенных стрептококков, препятствуя развитию кариеса.

Род *Neisseria*. Нейссерии – грамотрицательные диплококки бобовидной формы. Строгие аэробы. Нейссерии всегда в большом количестве встречаются в полости рта здоровых людей (до 1–3 млн в 1 мл слюны), где выполняют важную роль как резидентный стабилизирующий бактериальный вид. Являются антагонистами многих патогенных бактерий.

Род *Enterococcus*. Грамположительные овальные кокки, располагаются парами или короткими цепочками. Факультативные анаэробы. Часто обнаруживаются при одонтогенной инфекции, стоматитах, пародонтитах.

Род *Fusobacterium* включает более 10 видов, изолированных из ротовой полости человека и животных. Фузобактерии – грамотрицательные анаэробные палочки, неодинаковые по размеру и форме, особенно в патологическом материале, где они могут выглядеть как кокки, палочки, длинные нити. В культуре выглядят как прямые или искривленные палочки, короткие нити с заостренными концами, напоминающие веретено. Вместе с трепонемами вызывают язвенно-некротический стоматит.

Лептотрихии (род *Leptotrichia*) имеют вид длинных нитей разной толщины с заостренными или вздутыми концами, дают густые сплетения, могут располагаться попарно в виде зернистых палочек. Грамотрицательные анаэробы.

Актиномицеты (*Actinomyces*) - клетки актиномицетов обычно имеют вид длинных и ветвящихся нитей, напоминающих мицелий одноклеточных грибов, но встречаются также палочковидные и кокковидные формы. Нити мицелия имеют длину 100–600 мкм и толщину 0,2–1,2 мкм. Окраска по Граму – положительная. Участвуют в развитии кариеса зубов, пародонтита, актиномикоза.

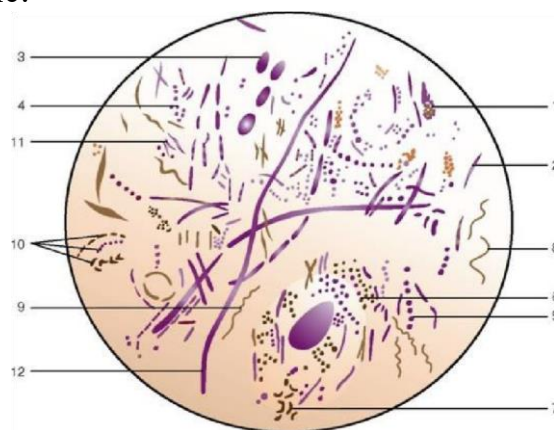
Род *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus brevis*) – грамположительные палочки, часто располагаются цепочками, облигатные анаэробы, вызывают молочнокислое брожение и образуют молочную, уксусную кислоты, спирт, углекислоту. Количество лактобацилл в

полости рта при кариесе возрастает и зависит от величины кариозных поражений. Также лактобациллы играют важнейшую стабилизирующую роль при формировании микробиоценоза полости рта, т.к. синтезируют витамины группы В и К, необходимые для роста других микроорганизмов, например бактероидов и фузобактерий.

Род *Bacteroides* - мелкие грамотрицательные палочки и коккобактерии, облигатные анаэробы, не образуют спор, неподвижны, обитатели десневых карманов.

Род *Treponema* – подвижные извитые микроорганизмы, грамотрицательные, анаэробы, обитатели десневых карманов. Являются возбудителями заболеваний пародонта.

Грибы рода *Candida* – грамположительные овальные почкующиеся клетки, образующие псевдомицелий. При иммунодефицитных состояниях активизируются и вызывают кандидоз слизистых оболочек, висцеральный кандидоз и даже сепсис.



1 - вейлонеллы; 2 - фузиформные бактерии; 3 - грибы *Candida*; 4 - микрококки; 5 - стрептококки; 6 - стафилококки; 7 - вибрионы; 8 - спириллы; 9 - спирохеты; 10 - лактобактерии; 11 - бактероиды; 12 - лептотрихи

Рисунок 63 - Мазок из зубного налета (по Граму). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Таблица 1 - Количественный и качественный состав микроорганизмов ротовой полости

Микроорганизмы	В слюне		Частота обнаружения в зубодесневых карманах
	Частота обнаружения, %	Количество в 1 мл	
Аэробы и факультативные анаэробы			
<i>S. mutans</i>	100	$10^5 - 10^6$	80
<i>S. salivarius</i>	100	10^7	100
<i>S. mitis</i>	100	$10^6 - 10^8$	70

Сапрофитные нейссерии	90	$10^3 - 10^4$	70
Лактобактерии	90	$10^3 - 10^4$	70
Стафилококки	80	$10^3 - 10^4$	50
Дифтероиды	80	вариабельно	50
Гемофилы	50	вариабельно	50
Пневмококки	30	вариабельно	Менее 30
Сапрофитные микобактерии	50	$10^2 - 10^4$	Менее 30
Актиномицеты	60	вариабельно	50
Дрожжеподобные грибы	50	$10^2 - 10^3$	70
Микоплазмы	50	$10^2 - 10^3$	Менее 30
Облигатные анаэробы			
Вейлонеллы	50	$10^2 - 10^3$	70
Анаэробные стрептококки	50	$10^3 - 10^4$	30
Бактероиды	30	$10^2 - 10^3$	100
Фузобактерии	75	$10^2 - 10^3$	100
Лептотрихи	100	$10^2 - 10^4$	100
Актиномицеты и анаэробные дифтероиды	100	вариабельно	100
Спириллы и вибрионы	70	$10^3 - 10^4$	100
Спирохеты	80	$10^2 - 10^4$	100



Рисунок 64 - Зубной налет (электронная микроскопия). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

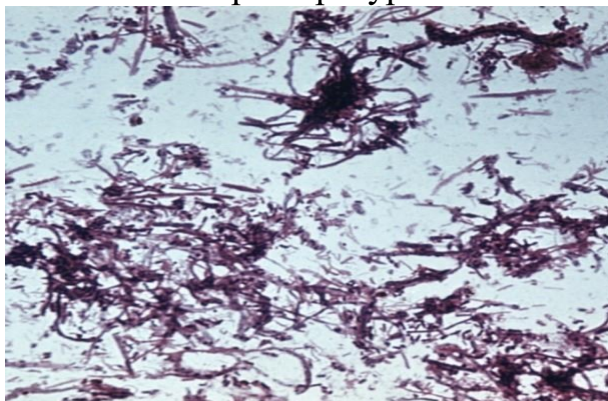


Рисунок 65 - Мазок из зубного налета (окраска по Граму). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы

Зубной налет из межзубных промежутков или у шейки зуба снимают с помощью стерильной зубочистки и растирают его посуху на поверхности обезжиренного предметного стекла рядом с заранее нанесенными 1-2 каплями физиологического раствора. Затем налет петлей смешивают с физиологическим раствором, готовят однородную взвесь и равномерно распределяют ее по поверхности стекла. После высушивания над пламенем спиртовки мазок фиксируют и окрашивают по Граму (рисунок 65).

Микроскопируют с использованием иммерсионной системы (рисунок 63), выявляют характерных представителей микробиоты зубного налета, зарисовывают в альбом, оформляют заключение.

ПРОТОКОЛ № 10 Микрофлора ротовой полости

День иссл.	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	Зубной налет.	1. Забор материала стерильной зубочисткой. 2. Мазок, окраска по Граму, микроскопия. 3. Зарисовать. 4. Оформить заключение.	

Материалы и оборудование:

Стерильные зубочистки, спиртовка, спички, бактериологическая петля, штатив для пробирок; стерильный физиологический раствор в пробирке; набор рабочих растворов анилиновых красителей для окраски по Граму; промывалка; чистые предметные стекла; лоток со стеклянным «мостиком» для окраски микропрепаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); емкость с дезинфицирующим раствором; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 80-87.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина»

1.11. Лабораторная работа №11

Тема: Определение общего микробного числа (ОМЧ) воздуха седиментационным методом

Цель: освоение седиментационного метода для определения ОМЧ воздуха закрытых помещений

Студент должен знать:

1. Микрофлору и перечень санитарно-показательных микроорганизмов воздуха закрытых помещений;
2. Определяемые показатели и сущность методов санитарномикробиологического исследования воздуха закрытых помещений.

Студент должен уметь:

1. Делать посев воздуха седиментационным методом;
2. Рассчитать общее микробное число (ОМЧ) воздуха по формуле Омелянского;
3. Интерпретировать полученные результаты.

Основные теоретические положения

Воздух – неблагоприятная среда для микроорганизмов и не является средой их постоянного обитания, а только временного нахождения или переноса микроорганизмов, однако количество их может быть значительно. В воздухе нет питательных веществ, постоянной оптимальной температуры, часто отсутствует влага, губительно действуют на микробы солнечные лучи. Микроорганизмы попадают в воздух, главным образом, с пылью или каплями жидкости, с поверхности почвы, растений, животных, транспорта, водной поверхности. Особенно сильно загрязняется воздух микроорганизмами при наличии пыли и большой скученности людей. Микробы в воздухе распространены неравномерно. В неочищенном воздухе во взвешенном состоянии находятся инородные включения различных размеров: 0,03-0,30 мкм – вирусы, бактерии; 10,0-100,0 мкм – частицы пыли; 30,0-200 мкм – волокна, волосы. Бактерии находятся в воздухе в виде аэрозоля, который по размерам частиц делится на фазы: а) крупнокапельная или быстро оседающая фаза – капли с диаметром более 100 мкм; б) мелкодерная фаза – капли и частицы с диаметром менее 10

мкм. Они длительно находятся во взвешенном состоянии, и часть из них высыхает раньше, чем оседает (“бактериальная пыль”).

Микрофлора воздуха закрытых помещений складывается из резидентной и транзиторной. Резидентная микрофлора представлена, в основном, сапрофитами: бактерии с липохромным пигментом (сарцины, микрококки, сапрофитный стафилококк и др.), спорообразующие палочки (бациллы), плесневые и дрожжеподобные грибы. Транзиторная представлена преимущественно патогенными и условно-патогенными бактериями, вирусами: золотистый и эпидермальный стафилококк, микобактерии туберкулёза, синегнойная палочка, коринебактерии дифтерии, энтеробактерии, вирусы кори, гриппа и др.

Загрязненность воздуха закрытых помещений микробами определяется по двум показателям:

1) общему микробному числу- количеству МАФАНМ, содержащихся в 1 м³ воздуха (общей бактериальной обсемененности). МАФАНМ – мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, способные расти на обычном питательном агаре.

2) качественному составу микрофлоры воздуха, определяемому выявлению в 1 м³ воздуха санитарно-показательных микроорганизмов (золотистых стафилококков и гемолитических стрептококков). Обнаружение СПМ в воздухе свидетельствует о биологическом загрязнении, степень которого прямо пропорциональна количеству обнаруженных СПМ.

Для исследования загрязненности воздуха микроорганизмами предложено несколько методов. Наиболее простым является метод оседания микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды (седиментационный метод Коха).

Седиментационный метод очень удобен для практической работы. Им широко пользуются для выяснения степени загрязнения воздуха в разных помещениях, когда ставят задачи определения общего санитарного состояния или эффективности вентиляции и уборки помещения. Метод заключается в способности микроорганизмов под действием силы тяжести и под влиянием движения воздуха (вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля) оседать на поверхность питательной среды в **открытые чашки Петри**. Метод чрезвычайно прост, но слабо чувствителен и малодостоверен. К тому же на поверхность среды оседают только грубодисперсные фракции аэрозоля; нередко колонии образуются не из единичной клетки, а из нескольких; не все представители микрофлоры воздуха способны расти на обычном питательном агаре. Также седиментационный метод непригоден при исследовании бактериальной загрязненности атмосферного воздуха.

Очень важным является правильное взятие проб, что гарантирует точность и достоверность результатов исследования. В закрытых помещениях точки отбора проб устанавливаются из расчета на каждые 20 м² площади - одна проба воздуха, по типу конверта: 4 точки по углам комнаты (на расстоянии 0,5 м от стен) и 5-я точка - в центре. Пробы воздуха забираются на высоте 1,6—1,8 м от пола - на уровне дыхания в жилых помещениях. Пробы необходимо отбирать днем (в период активной деятельности человека), после влажной уборки и

проветривания помещения. При отборе проб воздуха одновременно происходит и посев воздуха на питательную среду. При определении общей микробной обсемененности чашки с МПА оставляют открытыми на 5—10 мин или дольше. Для выявления санитарно-показательных микробов воздух засевают на кровяной агар (для обнаружения гемолитических стрептококков), молочно-солевой или желточно-солевой агар (для обнаружения золотистых стафилококков), сусло-агар или среду Сабуро (для выявления дрожжей и грибов). Для определения санитарно-показательных микроорганизмов чашки оставляют открытыми на 40—60 мин.

По окончании экспозиции все чашки закрывают, помещают в термостат на 24 ч при 37°C, затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре для образования пигмента пигментообразующими микроорганизмами. Подсчитывают количество колоний на чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м³ (т.е. в 1000 л) воздуха по формуле В.Л. Омелянского, который исходил из того, что на площадь 100 см² за 5 мин оседает такое количество микробов, которое содержится в 10 л воздуха.

Воздух жилых помещений считается чистым, если количество МАФАНМ не превышает 1500 КОЕ/м³ летом, 4500 КОЕ/м³ – зимой (КОЕ колониеобразующие единицы), а гемолитических стрептококков и стафилококков не более 16 в 1 м³.

Аспирационный метод - более точный метод. Аспирационный метод заключается в принудительном оседании микроорганизмов из воздуха на поверхности плотных питательных сред или в улавливающую жидкость. Забор проб воздуха проводится пробоотборными устройствами различной конструкции (импакторами и импинджерами), которые обеспечивают отбор биологического аэрозоля с величиной частиц диаметром до 1,4 мкм.

Импакторы - приборы, в которых происходит принудительное осаждение микроорганизмов из прокачиваемого через прибор воздуха на поверхность плотной питательной среды (пробоотборное устройство ПУ-1Б, прибор Кротова, пробоотборник аэрозольный бактериологический ПАБ-1, ПАБ-2 и др.).

Импинджеры - группа приборов, в которых воздух проходит через жидкость (питательный бульон, стерильную воду, физиологический раствор, среду 199 для обнаружения вирусов), в результате чего микроорганизмы задерживаются в ней и могут быть обнаружены (бактериоуловитель Речменского и др.).

Пробоотборное устройство ПУ-1Б. В настоящее время этот прибор (рисунок 66) широко применяется при исследовании воздуха закрытых помещений. Принцип его работы основан на том, что воздух, просасываемый через отверстия в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды, при этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе. Чашку Петри с тонким слоем среды укрепляют на вращающемся столике аппарата, что обеспечивает равномерное распределение бактерий на ее поверхности. Работает аппарат от электросети. После отбора пробы с определенной экспозицией чашку вынимают, закрывают крышкой и помещают на 48 ч в термостат. Обычно отбор проб проводят со скоростью 200 л/мин в течение 0,5-5 мин. Таким образом, определяется

микрофлора в 100-1000 л воздуха. Для определения общего количества бактерий в воздухе закрытых помещений забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи Пу-1Б.

Прибор Кротова представляет собой цилиндр со съёмной крышкой, в котором находится электромотор с центробежным вентилятором (рисунок 66). Принцип работы прибора основан на инерционном осаждении частиц аэрозоля на поверхность питательной среды. Исследуемый воздух всасывается со скоростью 20-25 л/мин через клиновидную щель в крышке прибора, ударяется о поверхность плотной питательной среды, и микробы задерживаются на ее влажной поверхности. Для равномерного посева микробов чашка Петри с питательной средой помещается на подставку, вращающуюся со скоростью 1 оборот в 1 секунду. Скорость аспирации воздуха регулируется по микроманометру (реометру) прибора. Общий объем пробы при значительном загрязнении воздуха должен составлять 40-50 л, при незначительном более 100 л. Продолжительность аспирации 2-5 мин. После инкубирования отобранных проб при температуре 37°C в течение 1-2 суток в зависимости от выделяемых микроорганизмов производится подсчет выросших колоний (рисунок 67). Учитывая объем взятой пробы воздуха, вычисляется количество микробов в 1 м³ воздуха. При определении СПМ используют две чашки Петри с 3-5% кровяным агаром (для гемолитических стрептококков), а также две чашки Петри с молочно-желточно-солевой средой (для обнаружения золотистых стафилококков). При этом через аппарат пропускают по 250 л воздуха. Через сутки инкубирования в термостате и еще одни сутки сохранения при комнатной температуре производят макро- и микроскопическое исследование колоний, определяют патогенность бактерий и рассчитывают количество СПМ в 1 м³.



Рисунок 66 - Прибор Кротова и пробоотборное устройство ПУ-1Б.
Займствовано из Интернет-ресурсов.

Таблица 2 - Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды помещений лечебных учреждений в зависимости от их функционального назначения

Класс чистоты	Название помещения	Количество плесневых дрожжевых грибов в 1 м ³		Общее количество микроорганизмов, КОЕ/м ³		Количество колоний Staphylococcus aureus, КОЕ/м ³	
		До начала работы	Во время работы	До начала работы	Во время работы	До начала работы	Во время работы
Особо чистые	Операционные, родильные залы, асептические боксы для гематологических, ожоговых пациентов, палаты для недоношенных, асептические боксы аптек, стерилизационные, боксы баклабораторий	Не должно быть	Не должно быть	Не более 200	Не более 500	Не должно быть	Не должно быть
Чистые	Процедурные, перевязочные, предоперационные, реанимационные, детские палаты, фасовочные аптек, бактериологические и клинические лаборатории	Не должно быть	Не должно быть	Не более 500	Не более 750	Не должно быть	Не должно быть
Условночистые	Палаты хирургических отделений, смотровые, боксы и палаты инфекционных	Не должно быть	Не должно быть	Не более 750	Не более 1000	Не должно быть	Не должно быть
	отделений, ординаторские, кладовые чистого белья						
Грязные	Коридоры и помещения административных зданий, лестницы лечебно-диагностических корпусов, туалеты, комнаты для грязного белья и т.д.	Не нормируются					



Рисунок 67 - Рост колоний микробов из воздуха на МПА. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы

1. Чашки Петри с МПА оставить открытыми на столах в лаборатории: 4 чашки по углам помещения и одна в центре на 5-10 мин. Затем чашки закрыть и поместить в термостат при 37°C на 24 ч и еще 48 ч выдержать при комнатной температуре, т.к. некоторые представители микрофлоры воздуха лучше растут при комнатной температуре.

2. Тщательно подсчитать количество всех колоний на каждой чашке сМПА. Подсчет проводят, не открывая чашек Петри. Считают, что из каждой живой клетки вырастает колония.

3. Затем подсчитывают среднее арифметическое число колоний, подставляют его в формулу Омелянского и рассчитывают общее микробное число воздуха лаборатории.

4. По полученным данным сделать заключение и в случае необходимости дать рекомендации по соблюдению санитарного режима в лаборатории. Чем больше микроорганизмов обнаружено в воздухе, тем вероятнее загрязнение его патогенными микроорганизмами, т.е. ОМЧ даёт представление о степени эпидемиологической опасности воздуха помещения (таблица 2).

ПРОТОКОЛ № 11 Определение ОМЧ воздуха лаборатории седиментационным методом

Де нь	Исследу емый материал	Ход исследования	Результат
1.	Воздух лаборатор ии	1. 5 чашек Петри с МПА оставить открытыми пометоду «конверта» в течение 5-10 мин на столах в лаборатории. 2. Посевы поместить в термостат при 37° на 24 ч и еще 48 ч выдержать при комнатной температуре.	

2.	Рост на МПА в чашках.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подсчет количества выросших колоний на каждой чашке и вычисление среднего арифметического числа. 2. Расчет ОМЧ по формуле Омелянского $\frac{a \times 100 \times 1000 \times 5}{V \times 10 \times t}$ <p>a - среднее арифметическое число колоний, в- площадь чашки Петри $S=\pi r^2$, t – время посева воздуха.</p> 3. Заключение о степени микробной обсемененности воздуха лаборатории. 	
----	-----------------------	--	--

Материалы и оборудование: чашки Петри с МПА; чашки Петри с МПА с ростом колоний; калькулятор, стеклограф.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 268-270.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 95-101.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.84-86.

1.12. Лабораторная работа №12

Тема: Микрофлора кефира

Цель: освоение методики микроскопического исследования кефира

Студент должен знать:

1. Состав специфической микрофлоры кисломолочных продуктов и методы ее изучения

Студент должен уметь:

1. Приготовить из кефира фиксированный микропрепарат
2. Микроскопировать с помощью иммерсионной системы биологического микроскопа.
3. Дифференцировать бактерии по морфологическим и тинкториальным свойствам в микропрепарате.

Основные теоретические положения

Молоко и кисломолочные напитки относятся к древнейшим продуктам питания, и в настоящее время является самыми распространенными и доступными. Основное лечебное действие кисломолочных продуктов – подавление жизнедеятельности гнилостной микрофлоры. Микрофлора,

содержащаяся в кисломолочной продукции, приживается в кишечнике человека и является «конкурентом» для болезнетворных микробов. Сбраживание цельного молока приводит к увеличению содержания в нем витаминов группы В, особенно В₂, витаминов А, Е, Д, солей кальция, магния, фосфора. В кисломолочных продуктах содержание незаменимых аминокислот в 7-10 раз больше, чем в свежих.

В настоящее время в промышленном масштабе вырабатывается только один кисломолочный продукт, содержащий многокомпонентную симбиотическую микрофлору - это кефир.

Кефир — кисломолочный продукт, произведенный путем смешанного (молочнокислого и спиртового) брожения с использованием закваски, приготовленной на кефирных зернах (грибках).

Родиной кефира является Северный Кавказ. Народы Кавказа уже давно знали, что кефир – это напиток здоровья и бодрости и считали его «небесным даром». Известно, что старение связано с гнилостными бактериями в кишечнике, которые отравляют организм. А кефир является прекрасным средством, которое уничтожает многие вредные бактерии. Потому то и называют кефир «напитком долголетия». Кроме того, регулярное употребление кефира укрепляет иммунную систему человека, а также избавляет от нарушений сна. Практически все питательные вещества, которые входят в состав этого продукта, с легкостью усваиваются, благодаря чему кефир особенно полезен детям от двух лет, пожилым людям, ослабленным больным. Противопоказан кефир при наличии эпилепсии, в случае индивидуальной непереносимости молочного белка, грудным детям (из-за незначительного содержания в продукте этилового спирта).

Кефирные зерна (грибки), используемые для приготовления кефира, являются примером стойкого симбиоза дрожжей, молочнокислых и уксуснокислых бактерий (рисунок 68).

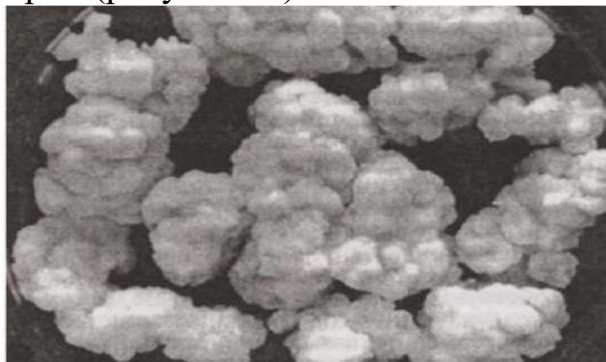
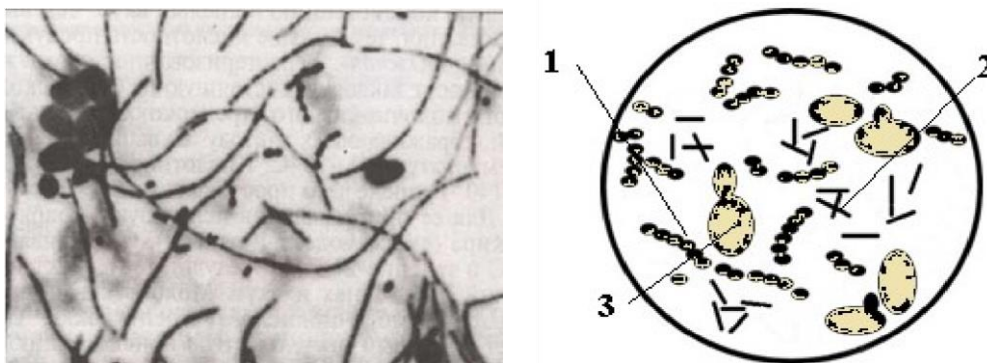


Рисунок 68- Кефирные зерна. Заимствовано из Интернетресурсов.

В состав кефирных зерен (рисунок 68) входят ряд молочнокислых бактерий: мезофильные молочнокислые стрептококки видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*; ароматобразующие бактерии видов *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc dextranicum*; молочнокислые палочки рода *Lactobacillus*; уксуснокислые бактерии; дрожжи. Микрофлора кефира включает до 46 различных штаммов только молочнокислых микроорганизмов и до 23 штаммов дрожжей (рисунок 69, 70). При микроскопировании срезов кефирного

грибка обнаруживаются тесные переплетения палочковидных нитей, которые образуют строуму грибка, удерживающую остальные микроорганизмы.



1- молочнокислые стрептококки, 2- лактобациллы, 3- дрожжи
Рисунок 69 - Микрофлора кефира. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

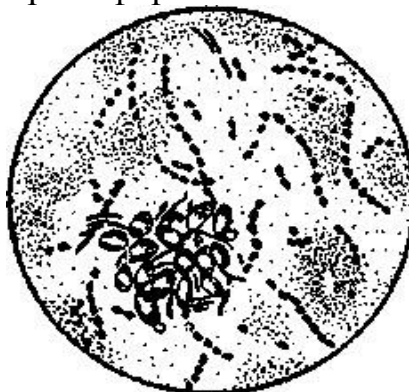


Рисунок 70 - Кефирная закваска под микроскопом. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Характеристика и значение отдельных представителей микрофлоры кефирных зерен

Мезофильные молочнокислые стрептококки обеспечивают активное кислотообразование и формирование сгустка. Их количество в готовом продукте достигает 10^9 в 1 см^3 . Представляют собой грамположительные шаровидные или овальные клетки размером до 1-2 мкм в диаметре, располагающиеся короткими цепочками или попарно.

Ароматобразующие стрептококки образуют ароматические вещества и газ. Их количество в кефире составляет 10^7 - 10^8 в 1 см^3 . Клетки ароматообразующих стрептококков (*Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*) мельче (рисунок 74), чем клетки молочного и сливочного стрептококков (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*), а клетки термофильного стрептококка (*Streptococcus thermophilus*) самые крупные (рисунок 73).

Лактобактерии. Количество молочнокислых палочек в кефире достигает 10^7 - 10^8 в 1 см^3 . Лактобактерии представляют собой палочки, одиночные, соединенные попарно и цепочками размером (4-10 x 0,5-0,6) мкм. Они неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. В молочной промышленности применяются *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus*

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* (рисунок 71). В подрод бета-бактерий входят 11 видов палочек, наиболее изученными из которых являются *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*. Бета-бактерии имеют наиболее мелкие и тонкие клетки (рисунок 72).

Дрожжи развиваются гораздо медленнее, чем молочнокислые бактерии, поэтому увеличение их количества отмечается во время созревания продукта и составляет 10^6 в 1 см^3 . Среди дрожжей кефира преобладает группа не сбраживающих лактозу, но присутствуют также дрожжи сбраживающие лактозу, причем от последних в большей степени зависит количество спирта и антибиотическая активность закваски.

Уксуснокислые бактерии содержатся в кефире в количестве 10^4 - 10^5 в 1 см^3 . Уксуснокислые бактерии находятся в кефире в симбиозе с молочнокислыми (рисунок 75). Они используют в качестве источника энергии молочную кислоту и тем самым снижают кислотность закваски и синтезируют ряд аминокислот и витаминов, в том числе большое количество витамина B_{12} , что создает благоприятные условия для развития молочнокислых бактерий.

Процесс сквашивания и созревания кефира ведут при температуре 20 - 22°C в течение 10 - 12 часов.

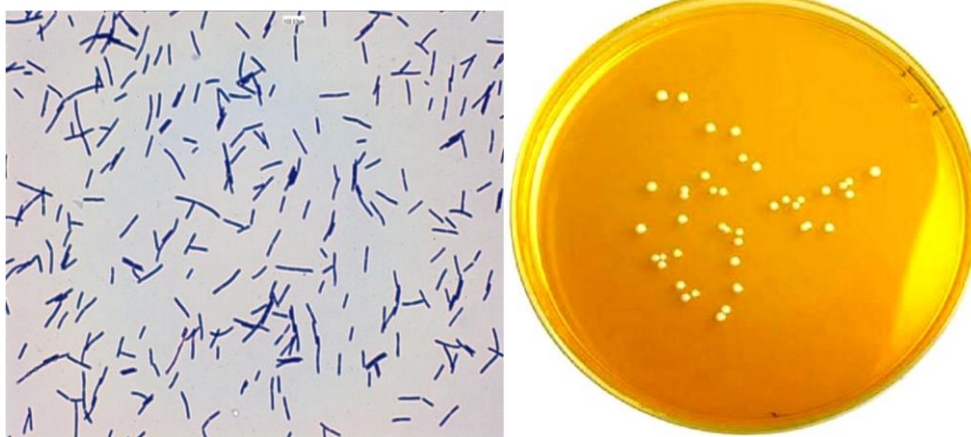
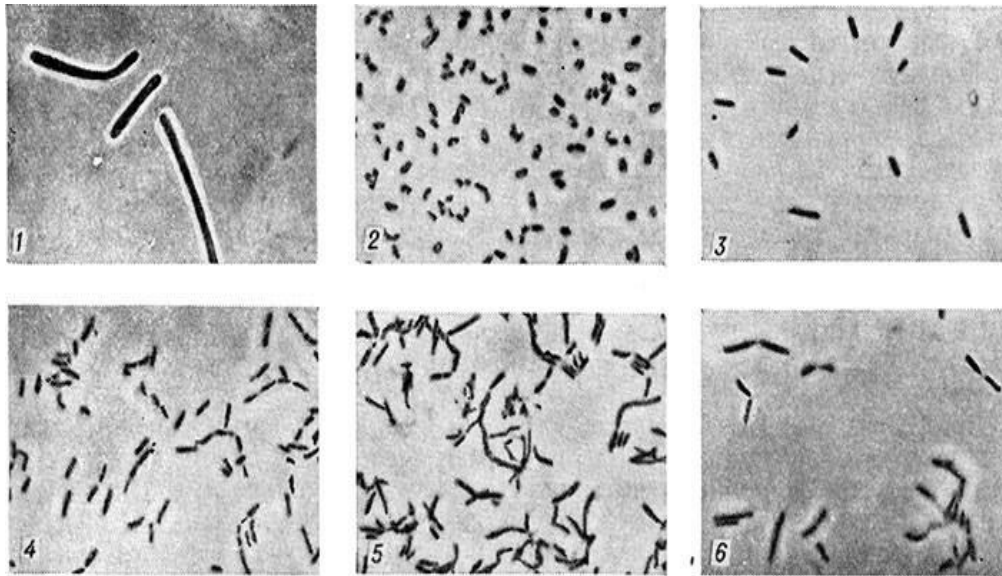


Рисунок 71 - *Lactobacillus plantarum*: чистая культура, окраска по Граму и колонии на лактобакагаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов.



1 — *L. acidophilus*; 2 — *L. fermenti*; 3 — *L. plantarum*; 4 — *L. casei*; 5 — *L. buchneri*; 6 — *L. brevis*; X 1680

Рисунок 72 - Клетки некоторых видов лактобактерий, бульонная культура (96 час). Заимствовано из Интернет-ресурсов.

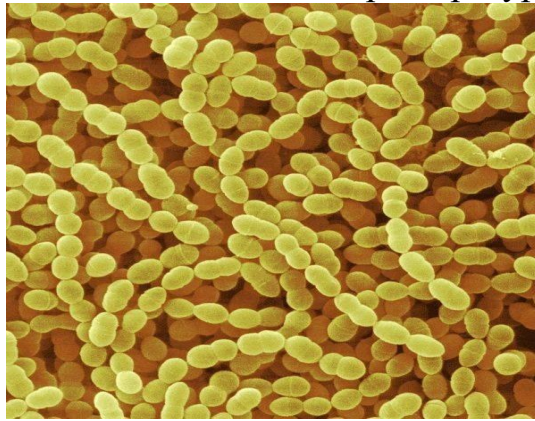
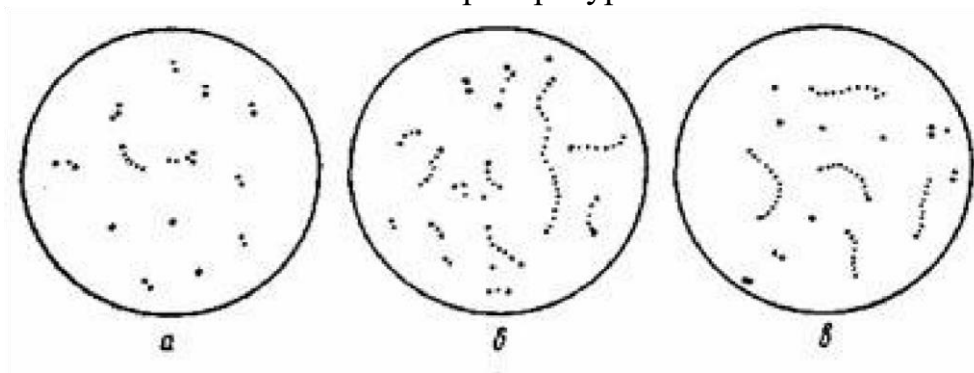


Рисунок 73 - Термофильный стрептококк. Заимствовано из Интернетресурсов.



а—*Str. lactis*; б- *Str. cremoris*; в- *Str. diacetylactis*

Рисунок 74 - Молочнокислые стрептококки. Заимствовано из Интернетресурсов.

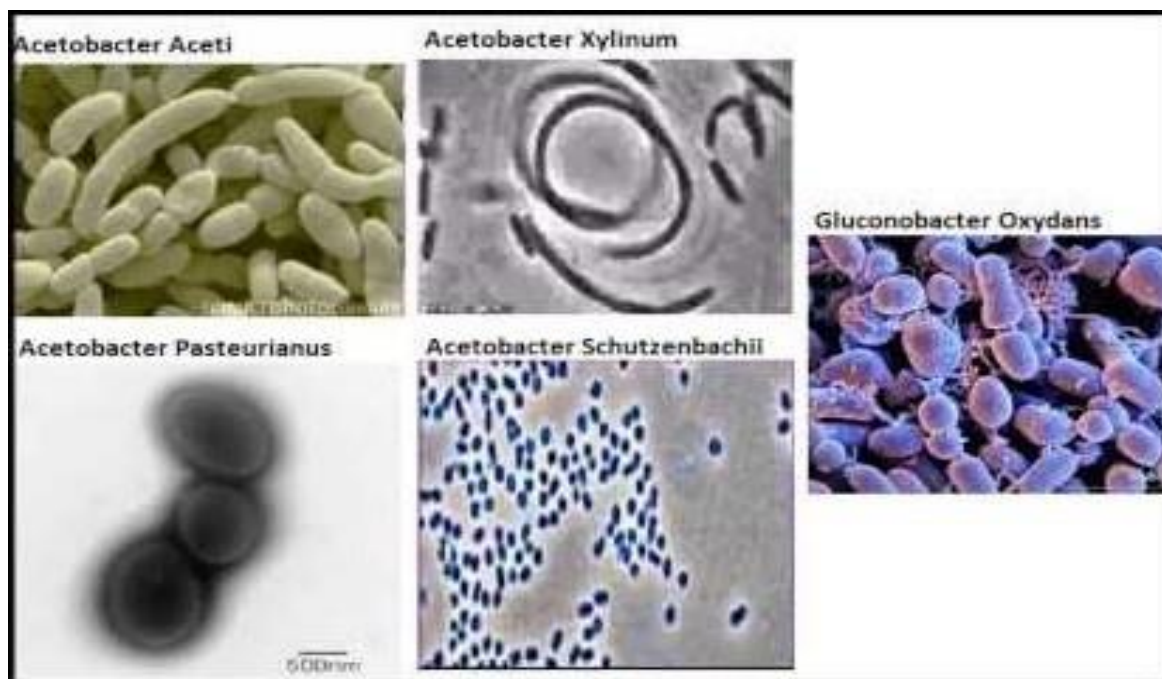


Рисунок 75 - Уксуснокислые бактерии, виды. Заимствовано из Интернетресурсов.

Микробиологический контроль производства кисломолочных продуктов заключается в проведении контроля технологического процесса, санитарно-гигиенического контроля условий производства и готовой продукции.

Для определения качества готовых кисло-молочных продуктов:

1) проводят микроскопическое исследование мазков из кефира, окрашенных водным раствором метиленовой синьки. В мазках из доброкачественного кефира обнаруживают молочнокислые стрептококки, палочки, дрожжи. Молочнокислые стрептококки преобладают над палочками:

они составляют 94-95%, палочки - 4-6%, дрожжи - 1% всей микрофлоры.

2) определяют бродильный титр.

БГКП не допускаются в 0,1 см³ кефира, простокваши, йогурта, ацидофильно-дрожжевого молока и других кисломолочных напитков. В сметане 20%-ой и 25%-ой жирности БГКП не должны обнаруживаться в 0,01 см³, в твороге – в 0,001 г. В твороге нормируется также содержание золотистого стафилококка (не допускаются в 0,01 г). Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы не допускаются в 25 см³(г) всех видов кисломолочных продуктов.

Ход выполнения лабораторной работы

1. На обезжиренное предметное стекло прокаленной петлей поместить каплю физиологического раствора.

2. Петлей или стерильной пипеткой внести в физраствор 1 каплю кефира и после перемешивания распределить мазок тонким слоем по поверхности стекла.

3. Высушить на воздухе и зафиксировать мазок в пламени спиртовки.

4.Окрасить микропрепарат по Граму.

5.Микроскопировать с использованием иммерсионного объектива (x90) в 10 полях зрения.

6.Отметить наличие представителей специфической микрофлоры кефира и зарисовать их в альбом.

7. Сделать вывод по полученным результатам.

ПРОТОКОЛ №12 Микрофлора кефира

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1 день	Кефир	1.Приготовить фиксированный микропрепарат из кефира и окрасить его по Граму. 2.Микроскопировать с иммерсионной системой не менее 10 полей зрения. 3.Обратить внимание на наличие и количественное соотношение представителей специфической микрофлоры кефира. 4.Зарисовать и оформить заключение.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; пробирка с кефиром; пробирка со стерильным физиологическим раствором; набор рабочих растворов анилиновых красителей для окраски по Граму; промывалка; чистые предметные стекла; лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.275-276.

2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.91-92.

1.13. Лабораторная работа №13.

Тема: Влияние температуры на вегетативные и споровые формы бактерий

Цель: изучение влияния температуры на вегетативные и споровые формы бактерий

Студент должен знать:

1. Деление бактерий по отношению к температуре роста;
2. Методы стерилизации, основанные на губительном воздействии высокой температуры;
3. Особенности влияния высокой температуры на вегетативные и споровые формы бактерий.

Студент должен уметь:
1. Провести термическую обработку культур бактерий и интерпретировать полученные результаты.

Основные теоретические положения

Методы стерилизации, основанные на губительном воздействии высокой температуры

Губительное действие высокой температуры на микроорганизмы заключается в денатурации белков, обезвоживании цитоплазмы и повреждении клеточных структур.

К термическим способам стерилизации относятся:

- автоклавирование (стерилизация паром под давлением);
- сухожаровая стерилизация;
- дробная стерилизация текучим паром; - стерилизация прокаливанием на огне.

Выбор способа стерилизации зависит от физических, химических и биологических особенностей стерилизуемого объекта.

Отмечается разная чувствительность к высокой температуре вегетативных и споровых форм бактерий. Вегетативные формы погибают уже при нагревании до 60°С за 30 минут, при нагревании до 100°С – за 1-2 минуты. Споры гораздо более устойчивы к воздействию высокой температуры, например споры сибиреязвенных бацилл выдерживают кипячение в течение 30 минут, а споры клостридий ботулизма – 6 часов. По этой причине кипячение применяют только для уничтожения вегетативных форм бактерий и не считается способом стерилизации. Для уничтожения спор необходима температура 120-134°С (автоклав) или 160-180°С (сухожаровой шкаф).

Автоклавирование – самый эффективный и надежный способ стерилизации, основанный на воздействии насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного, при этом повышается температура кипения воды и соответственно образующегося пара. При избыточном давлении пара 0,5 атм его температура равна 111-112°С, 1 атм - 121°С, 1,5 атм – 127°С, 2 атм – 134°С. Время стерилизации 15-30 минут.

Дробная стерилизация текучим паром используется для объектов, которые портятся при нагревании выше температуры 100°С. Стерилизация

проводится при 100°C по 30-60 минут в течение 3 дней с интервалом 24 час, во время которого материал выдерживается в термостате или при комнатной температуре, чтобы споры проросли и погибли при последующем прогревании. После прогревания в третий раз достигается стерильность объекта.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) используется для стерилизации лабораторной посуды, металлических инструментов и других термостойких объектов. Осуществляют стерилизацию сухим жаром при температуре 160°C в течение 150 мин, 180°C - 60 мин в воздушных стерилизаторах (печах Пастера).

Прокаливание на огне (фламбирование) очень быстрый (5-7 сек) и надежный способ стерилизации, который применяется для металлических изделий (бактериологических петлей, препаровальных игл, пинцетов, скальпелей и др.).

Ход выполнения работы

1. Питательный агар в чашке Петри разделить на 4 сектора.
2. Сделать посев бульонных культур *E.coli* и сенной палочки петлей на ¼ часть питательного агара.
2. Прокипятить культуры на водяной бане 5 минут при 100°C..
3. Термически обработанные культуры засеять на оставшиеся свободными ¼ части МПА в чашке.
4. Поставить посеvy в термостат на 24 часа при 37°C, затем отметить наличие или отсутствие роста в секторах МПА и сделать заключение.

ПРОТОКОЛ №13 Влияние кипячения на вегетативные и споровые формы бактерий

День иссл	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1 день	1. Споры сенной палочки на МПБ 2. <i>E.coli</i> на МПБ	1. Посев каждой из культур петлей на ¼ в чашке Петри. 2. Прокипятить культуры на водяной бане 5 минут 3. Термически обработанные культуры засеять на свободные ¼ МПА в чашке. 4. Инкубировать посеvy в термостате 18-24 часа при 37°C.	
2 день	1. Рост бактерий на МПА в чашке Петри	1. Учет результатов 2. Заключение	

Материалы и оборудование: пробирка с культурой сенной палочки на МПБ, пробирка с культурой E.coli на МПБ, МПА в чашке Петри, спиртовка, бактериологическая петля, водяная баня, термостат, стеклограф.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 92-101.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 115-121.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.36-42.

1.14. Лабораторная работа №14

Тема: Определение антибиотикочувствительности бактерий дискодиффузионным методом.

Цель: освоение диско-диффузионного метода определения антибиотикочувствительности бактерий **Студент должен знать:**

1. Основные механизмы, активность и спектр действия антибиотиков;
2. Принцип и механизм диско-диффузионного метода определения чувствительности микробов к антибиотикам.

Студент должен уметь:

1. Определять антибиотикочувствительность бактерий диско-диффузионным методом;
2. Правильно интерпретировать результаты определения антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом.

Основные теоретические положения

С целью проведения эффективной антибиотикотерапии необходимо знать чувствительность выделенного микроба к антибиотикам.

Задачи проведения исследований по оценке антибиотикочувствительности микроорганизмов:

1. Обоснование назначения оптимальной индивидуальной антибиотикотерапии у конкретного больного.
2. Обоснование эмпирической антибиотикотерапии на основании данных эпидемиологического мониторинга за уровнем антибиотикорезистентности микроорганизмов, циркулирующих в конкретных регионах или лечебнопрофилактических учреждениях (ЛПУ).

Для определения лекарственной чувствительности оптимальным является использование чистой культуры возбудителя, выделить которую необходимо до начала лечения антибиотиками.

Методы изучения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам:

1. Метод серийных разведений (см. следующую лабораторную работу).

2. Автоматизированные системы для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Автоматические бактериологические анализаторы WalkAway-40, WalkAway-96 ATB-expression; Sceptor и др. укомплектованы: автоматическим анализатором с поддержанием постоянной температуры и влажности; компьютером; программным обеспечением; принтером для нанесения штриховых кодов; принтером для распечатки результатов; прибором для стандартизации мутности (рисунок 76).

Недостатки метода:

Автоматизированная система может давать ошибочные результаты при классификации микроорганизмов, которые гетерорезистентны к β -лактамным антибиотикам; обладают индуцибельными механизмами резистентности; отличаются высокой скоростью мутации в генах, контролирующей чувствительность; отличаются по ряду биохимических характеристик от стандартных представителей вида.



Рисунок 76 - Анализаторы для биохимической идентификации и определения антибиотикочувствительности микроорганизмов. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

3. Метод диффузии в агар (диффузионный) – основан на диффузии антибактериального препарата (АБП) в плотную питательную среду и подавлении роста бактерий в той зоне, где концентрация АБП превосходит минимальную подавляющую концентрацию (МПК).

Существуют 2 разновидности диффузионного метода: **дискодиффузионный и E-тест.**

Метод E-тестов.

E-тест представляет собой пластиковую полоску размером 5x50 мм с нанесенным на ней градиентом концентрации антибиотика (от 0,002 до 32, от 0,016 до 256 или от 0,063 до 1024 мг/л в зависимости от препарата). Метод основан на диффузии антибиотиков в агар и позволяет определять значение МПК (рисунок 77). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски E-теста происходит только в той зоне, где концентрация антибактериального препарата,

диффундирующего в питательную среду из полоски, выше МПК; при этом образуется каплевидная зона подавления роста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю (рисунок 78).

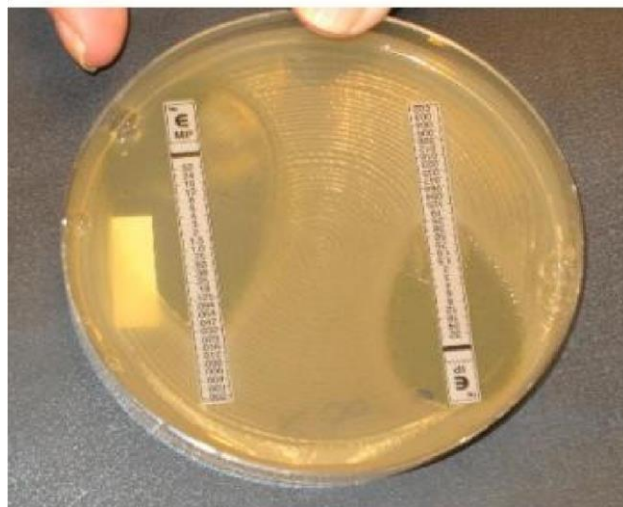


Рисунок 77 - E- тест. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

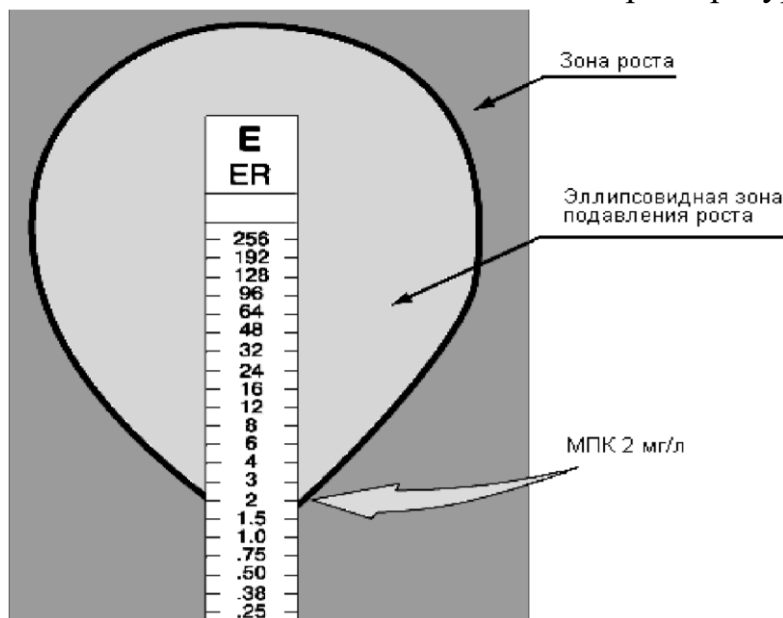


Рисунок 78 - Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом E-тестов. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Недостатки метода: полуколичественная оценка чувствительности, неприемлим для тестирования медленно растущих микроорганизмов (*M. tuberculosis*) и медленно диффундирующих антибиотиков (полипептиды).

Диско-диффузионный метод.

Данный метод основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара (рисунок 79). Размер образующейся вокруг диска зоны задержки роста прямо пропорционален степени чувствительности бактерий к данному антибиотику.

Для диско-диффузионного метода используют специальные питательные среды (среда АГВ, агар Мюллера-Хинтона, и др.), которые разливают по чашкам равномерным слоем в 4 мм, т.к. от глубины и равномерности слоя питательной среды зависит размер и форма зоны задержки роста.



Рисунок 79 - Флаконы с дисками антибиотиков. Диско-диффузионный метод. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Диски для определения чувствительности используются стандартизированные, т.е. каждый диск содержит среднюю терапевтическую дозу антибиотика, которая определяется исходя из терапевтических концентраций антибиотиков и средних значений МПК для патогенных бактерий. Название антибиотика обозначено на каждом диске.

При постановке диско-диффузионного метода (ДДМ) на специальную питательную среду засевают стандартную суспензию бактерий, соответствующую по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащую примерно $1 - 1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (рисунок 80).

Примечание

В 1907 году Джозеф МакФарланд разработал серию прописей растворов сульфата бария для сопоставления количества бактерий в суспензии с раствором соответствующей мутности. В микробиологии стандарты МакФарланда используются в качестве эталона для регулирования мутности бактериальной суспензии, чтобы количество бактерий находилось в заданном диапазоне для стандартизации микробиологического тестирования, например определения антибиотикочувствительности. Если используемая суспензия бактерий слишком густая или слишком разбавленная, может быть получен ошибочный результат (либо ложная устойчивость, либо ложная чувствительность) для исследуемого антибиотика.

Стандарты МакФарланда готовятся путем добавления 1% раствора серной кислоты к водному раствору хлорида бария, в результате реакции образуется суспензия белого преципитата сульфата бария. Мутность этой суспензии является величиной, соответствующей определенной концентрации бактериальной суспензии. Стандарты мутности МакФарланда представляют собой набор пробирок с увеличивающейся концентрацией сульфата бария.

Стандарт мутности визуально или лучше с помощью спектрофотометра сравнивают с суспензией бактерий в стерильном физиологическом растворе или питательном бульоне. Если бактериальная суспензия слишком мутная, то ее разбавляют. Если суспензия недостаточно мутная, добавляют больше бактерий.

Ингредиенты	Стандарты мутности				
	0,5	1	2	3	4
1,175% раствор BaCl_2 , мл	0,5	0,1	0,2	0,3	0,4
1% раствор H_2SO_4 , мл	99,5	9,9	9,8	9,7	9,6
Концентрация бактерий, клетки в 1 мл	$1,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$



Рисунок 80 - Набор стандартов мутности по МакФарланду (с 0,5 по 4).
Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Для приготовления бактериальной суспензии из агаровой культуры отбирают несколько однотипных, изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносят незначительное количество бактериальной массы с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или питательным бульоном, и добавляя физиологический раствор, доводят плотность до 0,5 по стандарту МакФарланда, проводя измерения с помощью спектрофотометра или сравнивая со стандартом мутности (рисунок 80). Также можно использовать 5-6-часовую бульонную культуру бактерий. Суспензию бактерий следует посеять на питательную среду в течение 15 мин после приготовления. Для посева применяют 2 метода:

- стерильным ватным тампоном штриховыми движениями;
- пипеткой набирают 1-2 мл суспензии, наносят на поверхность питательной среды и равномерно распределяют по ней шпателем.

Не позднее чем через 15 мин после посева на поверхность питательной среды накладывают стерильным пинцетом диски с антибактериальными препаратами (АБП). Пинцет стерилизуют в пламени спиртовки. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом. Диски должны располагаться на расстоянии не менее 15-20 мм друг от друга и от краев чашки, т.е. на одной чашке диаметром 100 мм следует размещать не более 6 дисков. Затем чашки Петри инкубируют в термостате кверху дном при температуре 35-37°C в течение 18-24 ч или более (в зависимости от вида бактерий).

Для учета результата чашки помещают кверху дном на темную поверхность и измеряют прозрачной линейкой диаметр зон задержки роста с точностью до 1 мм. Измерять нужно только зону полного подавления роста.

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий (рисунок 81):

■ **S «чувствительный»** - конкретный штамм подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно при применении АБП в рекомендуемых дозах;

■ **I «промежуточный»** - МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах либо при локализации очага инфекции в тех органах или тканях, в которых в силу физиологических особенностей создаются повышенные концентрации АБП;

■ **R «устойчивый»** - штамм не подавляется при концентрациях АБП, возникающих в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего будет неэффективным.



Рисунок 81 - Оценка результатов диско-диффузионного метода.

Займствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы

1. Сделать посев приготовленной суспензии бактерий на среду АГВстерильным тампоном или пипеткой.
2. Обжечь пинцет в пламени спиртовки, взять из флакона диск с антибиотиком и поместить диск на агар, слегка прижать, чтобы поверхность диска равномерно контактировала с поверхностью агара.
3. Повторить п.2 с разными антибиотиками (не более 6 дисков на чашку).
4. Засеянную чашку с дисками антибиотиков поместить в термостат при 37°C на 18-24 ч.
5. Измерить линейкой диаметр зон задержки роста бактерий с точностью до 1 мм и интерпретировать полученные данные (таблица 3). Если зона задержки роста отсутствует и бактерии растут вплотную к диску, то измеряется диаметр самого диска.

**ПРОТОКОЛ №14 Определение чувствительности
бактериальной культуры к антибиотикам диско-
диффузионным методом**

День иссл	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	1.Суспензия бактерий в физрастворе плотностью 0,5 по Мак-Фарланду. 2.Набор дисков с антибиотиками.	1.Сделать посев бактериальной суспензии тампоном или пипеткой на среду АГВ в чашке Петри. 2.Пинцетом поместить на засеянную среду диски с антибиотиками, аккуратно прижимая их к агару. 3.Поставить в термостат на сутки при 37°С.	
2	Рост бактерий на среде АГВ в чашке с дисками антибиотиков.	1.Учесть и интерпретировать результат. 2.Зарисовать антибиотикограмму. 3.Оформить заключение.	

Таблица 3 - Показатели для интерпретации чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом

Антибиотик	Диаметр зоны, зона задержки роста (мм)		
	Устойчивые (R)	Промежуточные (I)	Чувствительные (S)
Название препаратов			
Пенициллины Бензилпенициллин: · при испытании стафилококков; · при испытании других бактерий.	≤20 ≤10	21-28 11-16	≥29 ≥17
Ампициллин: · при испытании стафилококков; при испытании грамотрицательных бактерий и энтерококков.	≤20 ≤9	21 - 28 10 - 13	≥29 ≥14
Карбенициллин (25 мкг)	≤14	15 – 18	≥19
Карбенициллин (100 мкг) при испытании <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤11	12 - 14	≥15
Метициллин	≤13	14 - 18	≥19
Оксациллин (10 мкг)	≤15	16 - 19	≥20
Азлоциллин (для <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	≤13	14 - 16	≥16
Пиперрациллин (для <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	≤17	-	≥18
Азтреонам	≤15	16 - 21	≥22
Цефалоспорины	≤14	15 – 18	≥19
Новые бета-лактамы Имипенем*	≤13	14 – 15	≥16
Меропенем*	≤13	14 - 15	≥16

Хинолоны Ципрофлоксацин	≤15	16 - 20	≥21
Офлоксацин	≤12	13 – 16	≥17
Налидиксовая кислота	≤12	13 - 17	≥18
Аминогликозиды			
Стрептомицин	≤16	17 – 19	≥20
Канамицин	≤14	15 - 18	≥19
Гентамицин	≤15	15 - 18	≥16
Тетрациклины, макролиды, линкозамиды			
Тетрациклин	≤16	17 – 20	≥22
Доксициклин	≤15	16 - 19	≥20
Эритромицин	≤17	18 – 21	≥22
Азитромицин	≤13	14 - 17	≥18
Хлорамфеникол (левомецитин)	≤15	16 - 18	≥19
Фузидиевая кислота	≤15	17 –20	≥21
Рифампицин	≤16	13 – 15	≥16
Полимиксин	≤12	12 - 14	≥15
Ванкомицин: · для стафилококков; для энтерококков.	≤11	-	≥12
Ристомицин	≤14	15 – 16	≥17
	≤9	10 – 11	≥12

Материалы и оборудование: взвесь бактерий (инокулюм) в физрастворе плотностью 0,5 по МакФарланду, набор дисков с антибиотиками во флаконах, стерильный ватный тампон, стерильная стеклянная пипетка на 1 мл, пинцет, спиртовка, емкость с дезинфицирующим раствором, спички, чашка Петри с чистой средой АГВ, чашка Петри со средой АГВ с дисками антибиотиков и ростом бактерий, стеклограф.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 80-90.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 123-131.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.75-78.

1.15. Лабораторная работа №15

Тема: Определение антибиотикочувствительности бактерий методом серийных разведений

Цель: освоение принципов интерпретации результатов определения антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных разведений

Студент должен знать:

1. Принципы и механизм метода серийных разведений для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов.

Студент должен уметь:

1. Правильно интерпретировать результаты определения антибиотикочувствительности методом серийных разведений на жидкой питательной среде.

Основные теоретические положения Метод серийных разведений для определения антибиотикочувствительности

Метод основан на определении минимальной подавляющей концентрации (МПК) как основного количественного показателя, характеризующего биологическую активность антибактериального препарата. МПК - это минимальная концентрация, подавляющая рост исследуемого микроорганизма (рисунок 82). Чем больше величина МПК, тем ниже антибиотикочувствительность.

Варианты постановки этого метода:

- метод серийных разведений антибиотика в жидкой питательной среде (бульоне);
- метод серийных разведений антибиотика в плотной среде.

Преимущества метода: точность, информативность, количественная оценка антибиотикочувствительности, возможность одномоментного исследования большого числа культур.

Недостатки метода: более сложный и дорогой по сравнению с методом бумажных дисков. В основном применяется для научных исследований. Метод серийных разведений основан на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например, от 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидкую (бульон) или плотную питательную среду. Затем бактериальную суспензию определенной концентрации помещают в приготовленные разведения антибиотиков. После инкубации при температуре 37⁰С в течение 24 часов проводят учет полученных результатов.

Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение) или колоний на агаре свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост, и считают минимальной ингибирующей (подавляющей) концентрацией (МИК/МПК). Измеряется МИК в мкг/мл.

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий:

■ **S «чувствительный»** - конкретный штамм подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах

дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно при применении АБП в рекомендуемых дозах;

■ **I «промежуточный»** - МПК антибиотика в отношении таких бактерий выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах либо при локализации очага инфекции в тех органах или тканях, в которых в силу физиологических особенностей создаются повышенные концентрации АБП;

■ **R «устойчивый»** - штамм не подавляется при концентрациях АБП, возникающих в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего будет неэффективным.



Рисунок 82 - Определение МПК методом серийных разведений. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Таблица 4 - Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к АБП у представителей семейства Enterobacteriaceae (метод серийных разведений)

АБП	МПК (мг/л)		
	Устойчивый	Промежуточный	Чувствительный
Ампициллин	≥32	16	≤8
Цефазолин	≥32	16	≤8
Цефтриаксон	≥64	16-32	≤8
Имипенем	≥16	8	≤4
Гентамицин	≥16	8	≤4
Пефлоксацин	≥8	4	≤1
Тетрациклин	≥16	8	≤4
Хлорамфеникол	≥32	16	≤8

Ход выполнения лабораторной работы

Для исследования необходимы:

1. Оптимальные питательные среды для роста исследуемого микроорганизма и не содержащие веществ, инактивирующих антибиотиков;
2. Исходные (рабочие) растворы антибиотиков;
3. Культуры микроорганизмов, исследуемые на чувствительность к антибиотикам.

Работу начинают с приготовления по схеме (см. ниже) двойных последовательных разведений антибиотика. Для этого в ряд стерильных пробирок наливают по 2 мл жидкой полноценной питательной среды. В первую пробирку вносят 2 мл исходного (рабочего) раствора антибиотика (концентрация препарата – 200 мкг/мл) и тщательно перемешивают смесь. После этого 2 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую, повторяя перемешивание, далее 2 мл из второй пробирки переносят в третью и т. д. Из предпоследней пробирки 2 мл раствора антибиотика удаляют. При таком способе разведения в каждой пробирке будет содержаться по 2 мл раствора антибиотика и в каждой последующей пробирке его концентрация будет в два раза меньше, чем в предыдущей. Среда в последней пробирке антибиотик не содержит и является контрольной для роста культуры. После приготовления разведений во все пробирки вносят по 0,2 мл суспензии бактерий с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось $10^5 - 10^4$ клеток. Пробирки энергично перемешивают и помещают на 18 – 20 часов в термостат для выращивания при оптимальной температуре.

Таблица 5-Схема приготовления двойных последовательных разведений антибиотика

Ингредиенты	Концентрация антибиотика мкг/мл								Контроль
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	
Питательный бульон (мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Разведение 2,0 2,0 2,0 2,0 мкг/мл, (мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Суспензия бактерий 2×10^8 КОЕ/мл, (мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
									2,0

ПРОТОКОЛ №15 Определение антибиотикочувствительности бактерий методом серийных разведений

День иссл.	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	1. Суспензия исследуемых бактерий 2×10^8 КОЕ/мл. 2. Пробирки с питательным бульоном	1. По схеме приготовить разведения антибиотика. 2. Во все разведения и в контрольную пробирку внести по	

	Мюллера-Хинтон. 3. Пробирка с исходным разведением антибиотика 200 мкг/мл	0,2 мл суспензии бактерий. 3.Поставить в термостат на сутки при 37°C.	
2	Засеянные пробирки с разведениями антибиотика.	1.Учесть результат. 2.Оформить заключение.	

Учет результатов: после окончания срока инкубации пробирки с посевами просматривают в проходящем свете, чтобы по помутнению среды определить наличие роста микроорганизмов. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более 10^7 кл/мл). Среда в пробирках, в которых антибиотик находится в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной. Наименьшая концентрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое пробирок остается прозрачным, соответствует минимальной подавляющей концентрации (МПК) данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма.

Материалы и оборудование: спиртовка, пробирка с суспензией исследуемых бактерий 2×10^8 КОЕ/мл, 9 пробирок с питательным бульоном по 2 мл, пробирка с исходным разведением антибиотика 200 мкг/мл, стерильные пипетки на 2 мл, штатив для пробирок, емкость с дезинфицирующим раствором, термостат, стеклоглаф.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 80-90.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 123-131.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.75-78.

1.16. Лабораторная работа № 16

Тема: Титрование лизоцима в слюне.

Цель: освоение методики титрования лизоцима в слюне

Студент должен знать:

1. Химическую природу и роль лизоцима в макроорганизме, механизм его антимикробного и иммуномодулирующего действия, спектр применения лизоцима в медицине
- Студент должен уметь:**

1. Готовить разведения слюны и определять титр лизоцима в слюне

Основные теоретические положения

Фермент лизоцим (мурамидаза, бета-глюкозаминидаза) был открыт английским ученым А.Флемингом в 1922г. В организме человека он секретируется макрофагами, нейтрофилами, хрящевой тканью, клетками синовиальных оболочек, слюнными и молочными железами.

Лизоцим (рисунок 83) содержится в слезной жидкости (7000 мкг/мл), слюне (200 мкг/мл), в носовом и бронхиальном секрете, желудочном и дуоденальном соке, грудном молоке, сыворотке крови (2 мг/л), экстрактах из различных тканей и органов. Особенно много лизоцима в слюне у животных, поэтому они зализывают свои раны. В женском молоке лизоцима содержится в 100 тыс. раз больше, чем в коровьем. В слезной жидкости его в 150 раз больше, чем в сыворотке крови. В сыворотке крови новорожденных уровень лизоцима наиболее высок и держится на высоком уровне до 3-х лет, затем снижается. Лизоцим обнаружен также в яичном белке, икре разных рыб. Присутствие лизоцима установлено и у значительной части растений (хрен, капуста, редька и др.)

Этот низкомолекулярный (15 кД) щелочной фермент разрушает клеточную стенку бактерий (в основном грамположительных кокков), разрывая β -гликозидные связи между аминасахарами пептидогликана. В результате этого образуются протопласты, которые являются нестойкими и подвергаются лизису. Особенно чувствительны к действию лизоцима грамположительные бактерии *Micrococcus lysodeikticus*, которые разрушаются слезной жидкостью в разведении 1:40 000.

Биологическое назначение лизоцима в растительных и животных организмах окончательно не установлено. Основываясь на антибактериальных свойствах лизоцима, большинство исследователей рассматривают его как один из гуморальных факторов видового (врожденного) иммунитета. По материалам экспериментальных исследований, кроме основного антибактериального действия, лизоцим способствует репаративным процессам, стимулирует синтез антител, усиливает фагоцитоз и хемотаксис лейкоцитов. Предполагают, что фрагмент лизоцима Thr-Leu-Lys-Arg обладает иммуномодулирующими свойствами. В случае инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями, лизоцим действует совместно с другим гуморальным фактором видового иммунитета – системой комплемента. Также лизоцим принимает участие в процессах регуляции проницаемости тканевых барьеров, регенерации и заживлении ран полости рта.

Многие патогенные бактерии (например, менингококки) обладают антилизоцимной активностью, которая является их фактором патогенности.

Лизоцим обладает также противовирусными свойствами. В культуре ткани лизоцим тормозит репродукцию вирусов через стимуляцию синтеза интерферона. Интерферон активирует синтез ферментов и ингибиторов, блокирующих трансляцию вирусных иРНК, тем самым предохраняя соседние клетки от вирусной инфекции. Благодаря интерферонам, клетки становятся невосприимчивыми по отношению к вирусу. Исследованы противовирусные

эффекты лизоцима в отношении вирусов герпеса, кори, гепатита, полиомиелита и др.

Так же было обнаружено свойство лизоцима связывать ДНК и РНК. Взаимодействие лизоцима с нуклеиновыми кислотами было подтверждено разными методами (гель-электрофорез, определение ферментативной активности, соосаждение) и позволило сформулировать тезис о том, что именно это свойство лизоцима лежит в основе его способности оказывать подавляющее действие на репликацию ВИЧ-1 и, возможно, других вирусов.

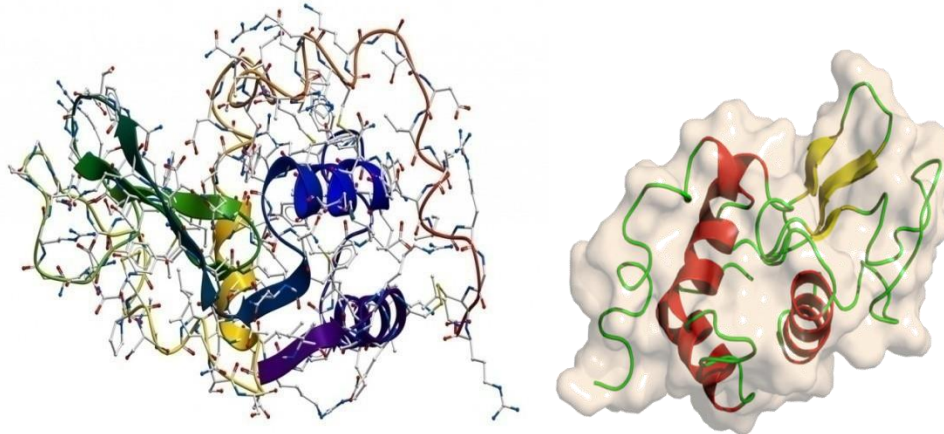


Рисунок 83 - Молекула лизоцима и трехмерная структура лизоцима
Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Присутствуя на поверхности слизистых оболочек, лизоцим повышает неспецифическую резистентность организма и способствует увеличению продукции секреторного IgA – важнейшей составляющей мукозального иммунитета.

Уровень лизоцима в слезной жидкости является показателем уровня мукозального иммунитета и может предсказывать риск развития инфекций верхних дыхательных путей.

Лизоцим оказывает положительное стимулирующее действие на иммунную систему, но при этом ослабляет негативные эффекты чрезмерной реакции иммунной системы на инфекцию.

Применение лизоцима в лечебных целях.

Лизоцим эффективен при лечении гнойных процессов, обморожений, ожогов (примочки и компрессы), конъюнктивитов, эрозий роговицы (глазные капли), афтозных стоматитов (полоскание, ротовые ванночки), гайморитов, фарингитов, ларингитов (ингаляции) (рисунок 84).



Рисунок 84 - Препараты, содержащие лизоцим. Заимствовано из Интернетресурсов.

Для определения лизоцима в сыворотке крови и других биологических жидкостях существует несколько методов. Наиболее точными считаются:

1. Турбидиметрический метод, основанный на определении уменьшения степени мутности тест-микроба под действием лизоцима в определенный интервал времени.
2. Метод диффузии в агар, основанный на том, что раствор лизоцима, диффундируя из лунок, лизирует взвешенный в агаре тест-микроб и вокруг лунок с лизоцимом образуются прозрачные зоны, диаметр которых соответствует концентрации лизоцима в исследуемом субстрате.
3. Иммуноферментный анализ.

Определение уровня лизоцима в слюне является объективным критерием диагностики воспалительных процессов в ротовой полости. Установлено, что при стоматитах, гингивитах и пародонтозе синтез лизоцима снижается.

Ход выполнения лабораторной работы

Лабораторную работу начинают с приготовления исходного разведения слюны 1:50. Для этого в пробирку вносят 4,9 мл стерильного физиологического раствора и 0,1 мл слюны и тщательно перемешивают. 1 мл полученного разведения 1:50 вносят в первую пустую пробирку и во вторую пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора. Содержимое второй пробирки тщательно перемешивают и 1 мл из нее переносят в третью пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора, перемешивают и 1 мл переносят в следующую пробирку и т.д. Из шестой пробирки 1 мл выливают, т. к. седьмая пробирка контрольная для роста тест-культуры и в нее слюну вносить не надо. Затем во все пробирки вносят по 1 мл суспензии тест-культуры *Micrococcus lysodeikticus*, содержащей 1 млрд. микробных тел/мл и только после этого получают окончательные разведения слюны с 1:100 по 1:3200. Все пробирки помещают в термостат при 37°C на 3-4 ч и затем учитывают результат.

Таблица 6 - Схема приготовления разведений слюны

Ингредиенты

Разведения слюны

**Конт
роль**

		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
Стерильный (мл)	- 1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	физиологический раствор	
Разведение слюны (мл)	1:50,	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Суспензия бактерий			→	→	→	→		
Micrococcus lysodeikticus	2×10 ⁸ КОЕ/мл, (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
								1,0

Учет результатов: опытные пробирки поочередно сравнивают с контрольной (мутной) и находят наибольшее разведение слюны, в котором произошел лизис тест-культуры, т.е. содержимое пробирки стало прозрачным. Степень разведения слюны в этой пробирке и будет титром лизоцима.

Протокол №16 Титрование лизоцима в слюне

День иссл	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	1. Слюна. 2. Стерильный физиологический раствор. 3. Суспензия тесткультуры Micrococcus lysodeikticus 1 млрд. микробных тел/мл	1. По схеме приготовить разведения слюны. 2. Во все разведения и в контрольную пробирку внести по 1 мл суспензии тест-культуры. 3. Пробирки поставить в термостат на 3-4 ч при 37°C. 4. Учесть результат. 5. Оформить заключение.	

Материалы и оборудование: штатив со стерильными пробирками, стерильный физиологический раствор, стерильные пипетки на 1 мл, пробирка со слюной, суспензия тест-культуры Micrococcus lysodeikticus 1 млрд. микробных тел/мл, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - С. 109-110.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.104.

1.17. Лабораторная работа №17

Тема: **Реакция агглютинации на стекле**

Цель: освоение техники постановки и учета реакции агглютинации на стекле.

Студент должен знать:

1. Механизм и диапазон применения реакции агглютинации на стекле (ориентировочной).

Студент должен уметь:

1. Ставить и учитывать реакцию агглютинации на стекле.

Основные теоретические положения

Иммунодиагностические (серологические) реакции – это реакции, протекающие между антигенами и антителами.

Иммунодиагностические реакции применяются для решения следующих задач:

- поиск антител в сыворотке крови больного по известным антигенам возбудителя для подтверждения диагноза (серодиагностика);
- определение антигенов возбудителя по известным антителам, содержащимся в диагностической сыворотке. Это исследование проводят для идентификации выделенной из материала больного чистой культуры возбудителя, а также при обнаружении антигенов микробов и их токсинов в крови и других биологических жидкостях.

Реакция агглютинации - иммунодиагностическая реакция, при которой происходит связывание антителами (агглютинидами) корпускулярных антигенов (агглютиногенов). В роли корпускулярных антигенов могут быть бактерии, эритроциты, нерастворимые частицы с адсорбированными на них антигенами, макромолекулярные комплексы. Взаимодействие антигенов с антителами протекает в две фазы. Первая фаза – специфическая, при которой происходит быстрое связывание антигенной детерминанты (эпитопа) с активным центром (паратопом) антитела. После специфической фазы наступает более медленная – неспецифическая, которая проявляется образованием видимых простым глазом хлопьев или зерен и выпадением их в осадок. Реакция протекает в присутствии электролита, т.е. 0,85% раствора натрия хлорида. Образовавшийся осадок называют агглютинатом. Образование хлопьев происходит за счет того, что антитела имеют два и более активных центра, а антигены поливалентны, т.е. имеют несколько эпитопов.

Применяются различные варианты реакции агглютинации: развернутая (в пробирках), ориентировочная (на стекле), непрямая и др.

Ориентировочную реакцию агглютинации ставят с целью идентификации выделенной от больного чистой культуры возбудителя, применяя для этого диагностические агглютинирующие сыворотки, т. е. проводят серотипирование возбудителя. Ориентировочную реакцию ставят на предметном стекле. К капле диагностической агглютинирующей сыворотки в разведении 1:10 или 1:20

петлей добавляют чистую культуру возбудителя. Рядом ставят контроль: вместо сыворотки наносят каплю раствора натрия хлорида, в которую также добавляют чистую культуру. При положительном результате реакции, т.е. появлении в капле с сывороткой и микробами хлопьевидного осадка, ставят развернутую реакцию агглютинации в пробирках. Агглютинацию учитывают по количеству хлопьевидного осадка и степени просветления жидкости. Реакцию считают положительной, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки (рисунок 85). Одновременно учитывают контроли: сыворотка, разведенная изотоническим раствором натрия хлорида, должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе — равномерно мутной, без осадка. Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой, что затрудняет их идентификацию. Поэтому пользуются адсорбированными агглютинирующими сыворотками, из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии.



1 – контроль; 2- агглютинат (хлопья), положительная реакция

Рисунок 85 - Схема реакции агглютинации на стекле.

Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения лабораторной работы

На обезжиренное предметное стекло наносят каплю специфической адсорбированной сыворотки (опыт) и каплю изотонического раствора хлорида натрия (контроль антигена). Чистую культуру бактерий прокаленной петлей вносят в каплю изотонического раствора и в каплю сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси. Нельзя переносить культуру из сыворотки в каплю изотонического раствора. Реакция протекает при комнатной температуре в течение 1—3 мин.

Учет результатов. Положительная реакция агглютинации характеризуется появлением агглютината (хлопьев) не менее чем на 3+ в течение 3 мин, особенно заметного на темном фоне при косом освещении. В контроле антигена не должно быть спонтанной агглютинации микробной взвеси, но допускается слабая (+)

зернистость. Учет результатов проводят при косом освещении на темном фоне без или с помощью лупы 5-7- кратного увеличения по 4-крестовой системе.

- 4+ - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- 3+ - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- 2+ - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости;
- 1+ - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости.

Отсутствие агглютината соответствует отрицательному результату.

Реакцию агглютинации на стекле чаще всего используют для определения вида (или серовара) микроорганизма, выделенного в чистой культуре. При применении агглютинирующих неадсорбированных сывороток реакция является ориентировочной.

Протокол №17 Реакция агглютинации на стекле

День иссл.	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1	1. Культура бактерий на скошенном МПА. 2. Агглютинирующая диагностическая эшерихиозная сыворотка. 3. Физиологический раствор.	1. На обезжиренное предметное стекло нанести каплю агглютинирующей сыворотки (опыт), рядом – каплю физиологического раствора (контроль). 2. Прокаленной бактериологической петлей внести культуру бактерий сначала в контроль, затем в опыт и размешать. 3. Через 1-3 мин учесть результат реакции и зарисовать. 4. Сделать вывод о видовой принадлежности культуры	
		бактерий.	

Материалы и оборудование: чистая культура бактерий на скошенном МПА в пробирке, пробирка с агглютинирующей диагностической эшерихиозной сывороткой, пробирка с физиологическим раствором, чистые предметные стекла, мыло, салфетка, стеклограф, спиртовка, бактериологическая петля, лоток с «мостиком», спички.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.129-134.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С.143-150.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.107-112.

1.18. Лабораторная работа № 18

Тема: Развернутая реакция агглютинации.

Цель: освоение принципов постановки и учета развернутой реакции агглютинации.

Студент должен знать:

1. Механизм и диапазон применения развернутой реакции агглютинации.

Студент должен уметь:

1. Интерпретировать результат развернутой реакции агглютинации.

Основные теоретические положения

Для определения наличия в крови больного антител ставят развернутую реакцию агглютинации (рисунок 86): к разведениям сыворотки крови больного добавляют диагностикум (взвесь убитых микробов) и через несколько часов инкубации при 37 °С отмечают наибольшее разведение сыворотки (титр сыворотки), при котором произошла агглютинация, т. е. образовался хлопьевидный осадок (рисунок 87). Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител, участвующих в реакции. Примером являются особенности взаимодействия диагностикумов (О- и Н-антигенов) со специфическими антителами. Реакция агглютинации с О-диагностикумом (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие термостабильный О-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации. Реакция агглютинации с Н-диагностикумом (бактерии, убитые формалином, сохранившие термолабильный жгутиковый Н-антиген) — крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Данную реакцию используют чаще для обнаружения антител в сыворотке обследуемого (например, при бруцеллезе - реакция Райта, при брюшном тифе реакция Видаля). Также возможно применение развернутой реакции агглютинации для определения вида (или серовара) микроорганизма.

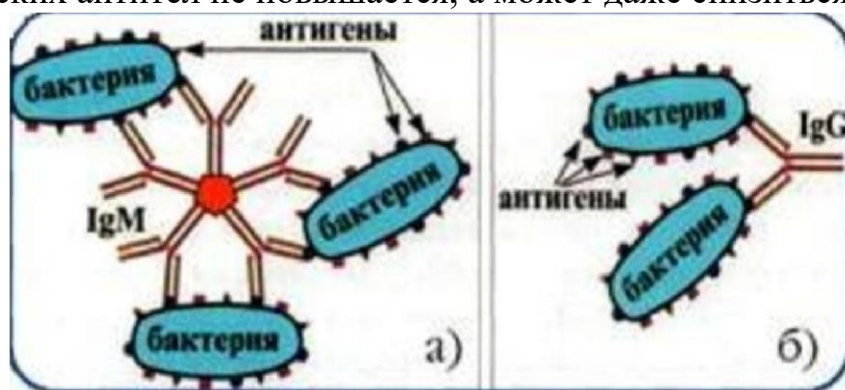
Возможные ошибки при постановке реакции агглютинации:

1. Спонтанная (самопроизвольная) агглютинация. Некоторые клетки, особенно бактерии в R-форме, не дают однородной (гомогенной) взвеси, быстро выпадают в осадок. Во избежание этого следует пользоваться культурой в S-форме, которая не дает спонтанной агглютинации.

2. В сыворотке здоровых людей имеются антитела к некоторым микроорганизмам — представителям микрофлоры человека (так называемые «нормальные антитела»). Титр их невысок, поэтому положительный результат реакции в разведении 1:100 и выше говорит о ее достоверности и специфичности.

3. Групповая реакция с близкими по антигенному строению микробами. Например, сыворотка больного брюшным тифом может также агглютинировать родственные бактерии паратифа А и В. В отличие от специфической, групповая реакция идет в более низких титрах. Адсорбированные сыворотки не дают групповой реакции, поэтому лучше пользоваться ими.

4. Следует учесть, что специфические антитела после перенесенной болезни и даже после прививок могут сохраняться длительное время. Они называются анамнестическими. Чтобы отличить их от инфекционных антител, образующихся в течение текущей болезни, реакцию ставят в динамике, то есть исследуют сыворотку больного, взятую повторно через 7-10 дней. Повышение титра антител в парных сыворотках говорит о наличии болезни; титр анамнестических антител не повышается, а может даже снизиться.



а - с IgM; б – с IgG

Рисунок 86 - Механизм реакции агглютинации. Заимствовано из Интернетресурсов.

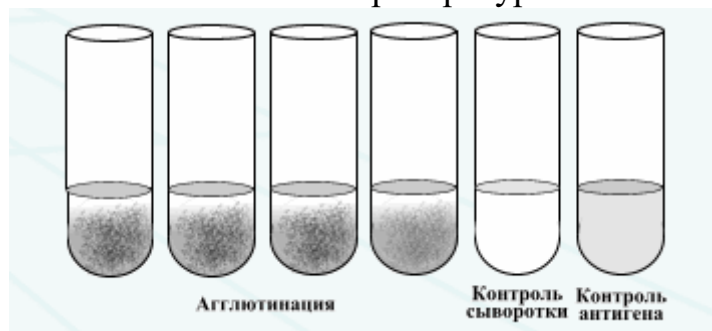


Рисунок 87 - Развернутая реакция агглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Агглютиноскоп (agglutinoscopum) — это прибор, при помощи которого определяются результаты реакции агглютинации и производится визуальная оценка осадка, образовавшегося в результате реакции при боковом освещении (рисунок 88).

Агглютиноскоп состоит из литого штатива, вверху которого расположена трубка тройник, также он имеет отверстия для пробирок. Над горизонтальной трубкой поверх смотрового отверстия располагается гнездо с окуляром, это элемент аппарата, используемый для увеличения исследуемого объекта, он должен располагаться перед глазами исследователя. Окуляр представляет собой

короткую трубку с двояковыпуклой линзой, линза обладает фокусным расстоянием в 36 мм и увеличивает изображение исследуемого объекта в 7 раз.



Рисунок 88 – Агглютиноскоп. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Внизу штатива располагается вилка, на которой закреплено круглое зеркало, его функцией является фиксированное направление света в смотровое отверстие. Зеркало необходимо настраивать таким образом, чтобы свет попал в смотровое окно. На трубке крепится и затемнитель, регулируя который можно устранить ненужные блики.

В отверстия (гнезда) на горизонтальной трубке нужно вставить пробирки с жидкостью, предназначенной для исследования, затем поработать с зеркалом и затемнителем, настроив оптимальный уровень освещения, после этого настроить резкость изображения путем вращения окулярной трубки. При помощи агглютиноскопа определяется микроскопическая (мелкозернистая) агглютинация. В агглютиноскоп рассматривается **агглютинат** – осадок, образовавшийся после реакции, оцениваются результаты осадочных реакций.

Ход выполнения лабораторной работы

- Исследуемую сыворотку получают из крови, взятой стерильно из локтевой вены или из пальца в количестве 1-2 мл.
- Перед постановкой реакции готовят исходное разведение испытуемой сыворотки 1:50, для этого 0,1 мл цельной сыворотки смешивают с 4,9 мл физиологического раствора. Полученное разведение сыворотки прогревают 30 мин при температуре 56°C в водяной бане.
- Диагностикум (антигены известных бактерий) перед постановкой реакции тщательно размешивают встряхиванием и разводят в 10 раз (до 10⁹ КОЕ/мл) 0,85% раствором натрия хлорида.
- Далее по схеме готовят серийные разведения сыворотки больного. Для этого берут 5 пробирок, в которые вносят по 1,0 мл 0,85% раствора натрия хлорида. Затем в первую пробирку вносят 1,0 мл сыворотки в рабочем разведении (1:50). Изотонический раствор натрия хлорида и сыворотку тщательно перемешивают, набирая смесь в пипетку и выливая в пробирку (в результате в первой пробирке

получается разведение 1:100). Смесь из первой пробирки в количестве 1,0 мл переносят во вторую пробирку, перемешивают и получают разведение 1:200, из второй - в третью и т.д. Из пятой пробирки 1,0 мл смеси выливают, т.к. во всех пробирках должен быть равный объем. Таким образом получают последовательные двукратные серийные разведения сыворотки - 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600.

- Во все пробирки вносят по 2 капли суспензии диагностикума. Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания.
- В шестой пробирке готовят контроль сыворотки (1,0 мл сыворотки 1:50), седьмой – контроль диагностикума (1,0 мл физраствора + 2 капли диагностикума).
- Пробирки инкубируют в термостате при 37°C 2 часа (предварительный учет) с последующим выдерживанием при комнатной температуре (16-22°C) до следующего дня и лишь затем учитывают окончательный результат реакции.

Таблица 7 - Схема постановки развернутой реакции агглютинации.

Ингредиенты	Разведения сыворотки					КС	КД
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600		
Стерильный физиологический раствор (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Сыворотка крови больного 1:50, (мл)	1,0	→ 1,0	→ 1,0	→ 1,0	→ 1,0	1,0	-
Диагностикум (капли)	2	2	2	2	2	-	2

1,0

Учет результатов проводят, начиная с контрольных пробирок: сыворотка должна быть абсолютно прозрачной, без хлопьев, в контроле антигена равномерное помутнение (некоторые бактериальные культуры могут давать спонтанную агглютинацию, в этом случае реакция не может быть учтена). При положительном результате реакции на дне опытной пробирки образуется осадок из склеившихся бактерий, жидкость в пробирке в большей или меньшей степени просветляется; при осторожном встряхивании пробирки осадок превращается в хлопья. Учет результатов проводят визуально или с помощью агглютиноскопа (при мелкозернистой агглютинации) по 4-крестовой системе: 4+ - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями; 3+ - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями; 2+ - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости; 1+ - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости. Отсутствие агглютината соответствует отрицательному результату.

РА считают положительной при оценке не менее чем на 3+ при отсутствии спонтанной агглютинации в контролях сыворотки и диагностикума. Определяют титр реакции - наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается положительная реакция.

ПРОТОКОЛ №18 Развернутая реакция агглютинации

День исс л.	Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1.	Сыворотка крови больного 1:50	1. По схеме приготовить последовательные разведения сыворотки и добавить в них диагностикум. 2. Инкубировать пробирки в термостате 2 часа при 37°C. 3. Учесть предварительный результат развернутой реакции агглютинации. 4. Зарисовать результат реакции и оформить заключение.	

Материалы и оборудование: исследуемая сыворотка, диагностикум, физиологический раствор, штатив с пробирками, пипетки на 1 мл, термостат, агглютиноскоп.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.129-134.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С.143-150.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.107-112.

1.19. Лабораторная работа №19

Тема: Реакция преципитации

Цель: освоение методики постановки реакции преципитации в пробирке.

Студент должен знать:

1. Механизм, методики постановки и диапазон применения в микробиологической диагностике реакции преципитации.

Студент должен уметь:

1. Ставить реакцию преципитации в пробирке и правильно интерпретировать ее результат.

Основные теоретические положения

Реакция преципитации

Сущность данной реакции состоит во взаимодействии растворимого высокодисперсного антигена (преципитиногена) с антителами-преципитинами в присутствии электролита (физиологического раствора) с образованием мелкого осадка (преципитата). Реакцию преципитации можно ставить как с полноценными антигенами - веществами белковой природы, так и с неполноценными антигенами - гаптенами. Реакция преципитации характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью и позволяет обнаружить ничтожно малые количества белка-антигена (до разведения 1:100 000 и выше).

Реакция преципитации широко применяется в лабораторной практике для диагностики инфекционных заболеваний (чумы, туляремии, сибирской язвы, оспы), а также в судебной медицинской экспертизе для определения видовой принадлежности белков (кровяных пятен, спермы и т. д.). С помощью этой реакции в санитарной практике определяют фальсификацию рыбных, мясных, мучных изделий, выявляют добавление искусственного меда к натуральному и молока одного вида животного к молоку другого вида. В биологии реакция преципитации используется для установки степени филогенетического родства различных видов животных и растений.

Основными методами реакции преципитации являются реакция кольцепреципитации и реакция преципитации в геле. Реакция кольцепреципитации ставится в специальных узких пробирках, при этом последовательные разведения антигена наслаивают на стандартное разведение диагностической сыворотки и на границе двух жидкостей вследствие осаждения антигена образуется осадок в виде кольца (кольцепреципитация). Реакцию оценивают по максимальному разведению антигена, при котором визуально наблюдается кольцо преципитации. Кроме того, помутнение может быть зафиксировано инструментальными методами - нефелометрией и др. **Ход выполнения работы**

При постановке реакции кольцепреципитации в пробирку с малым диаметром наливают 0,5 мл преципитирующей сыворотки, затем с помощью пастеровской пипетки осторожно сверху наслаивают на сыворотку 0,5 мл растворенного антигена. Пробирку при этом следует держать в наклонном положении, а наслаивание антигена проводить осторожным спусканием жидкости по стенке пробирки так, чтобы он не смешивался с сывороткой, а образовал над ней верхний слой. После добавления антигена пробирку осторожно переводят в вертикальное положение и ставят в штатив. При положительном результате на границе двух растворов сразу или через 5-10 мин образуется мутное кольцо непрозрачного преципитата (рисунок 89).

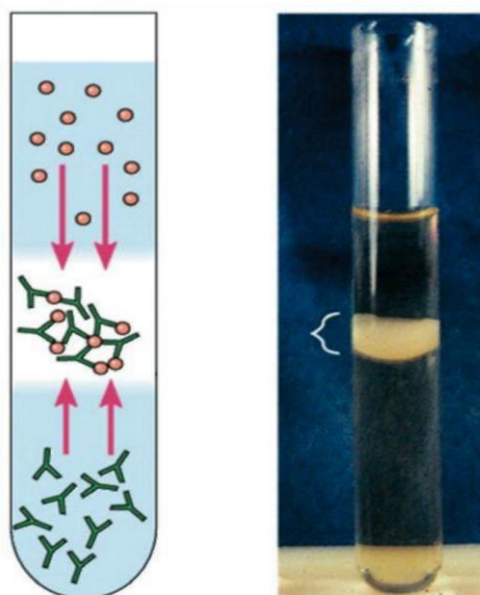


Рисунок 89 - Реакция кольцепреципитации. Заимствовано из Интернетресурсов.

ПРОТОКОЛ №19 Реакция преципитации

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1 день	<ol style="list-style-type: none"> 1. Растворимый антиген 2. Преципитирующая сыворотка 	<ol style="list-style-type: none"> 1. В пробирку внести 0,5 мл преципитирующей сыворотки 2. Осторожно пипеткой наслаивать раствор антигена. 3. Учесть результат, зарисовать. 4. Оформить заключение. 	

Материалы и оборудование: растворимый антиген, преципитирующая сыворотка, пипетки, штатив, пробирки.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 129-139.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 115-121.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.36-42.

1.20. Лабораторная работа №20

Тема: Реакция связывания комплемента

Цель: освоение техники постановки и учета реакции связывания комплемента.

Студент должен знать:

1. Механизм и диапазон применения в лабораторной диагностике реакции связывания комплемента.

Студент должен уметь:

1. Правильно интерпретировать результат реакции связывания комплемента.

Основные теоретические положения

Реакцию связывания комплемента (РСК) широко применяют для обнаружения антител в сыворотке крови больных при бактериальных, риккетсиозных, вирусных и протозойных инфекциях, а также для определения и типирования вирусов в ходе вирусологического исследования. РСК, применяемая для диагностики сифилиса, получила название реакции Вассермана, гонореи - реакция Борде-Жангу в честь микробиологов, предложивших ее использование для диагностики этих заболеваний. РСК относится к сложным серологическим реакциям, в которых, кроме основной системы (антигена, антитела и комплемента), участвует еще и гемолитическая (индикаторная) система, выявляющая результаты реакции.

РСК протекает в две фазы: первая — взаимодействие антигена с антителом и связывание комплемента и вторая — выявление степени связывания комплемента при помощи гемолитической системы. Эта система состоит из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, полученной путем иммунизации лабораторных животных (кроликов) эритроцитами барана. Эритроциты обрабатывают — сенсibiliзируют, присоединяя к ним гемолитическую сыворотку при температуре 37°C, в течение 30 мин. Лизис сенсibiliзированных эритроцитов барана наступает только в случае присоединения к гемолитической системе комплемента. В отсутствие комплемента лизис эритроцитов не происходит.

Результаты РСК зависят от наличия в исследуемой сыворотке антител. Если сыворотка содержит искомые антитела, гомологичные антигену, используемому в реакции, то образующийся комплекс антиген — антитело связывает комплемент. При добавлении гемолитической системы в этом случае гемолиза не произойдет, так как весь комплемент расходуется на специфическую связь с комплексом антиген — антитело. Таким образом, отсутствие гемолиза указывает на положительный результат РСК (рисунок 90).



Рисунок 90 - Механизм РСК (положительный результат) Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Если же в исследуемой сыворотке искомые антитела отсутствуют, то комплекс АГ-АТ не образуется, комплемент остается свободным, присоединяется к гемолитической системе, активируется по классическому пути с образованием мембраноатакующего комплекса, разрушающего эритроциты. То есть наступление гемолиза указывает на отрицательный результат РСК (рисунок 91).

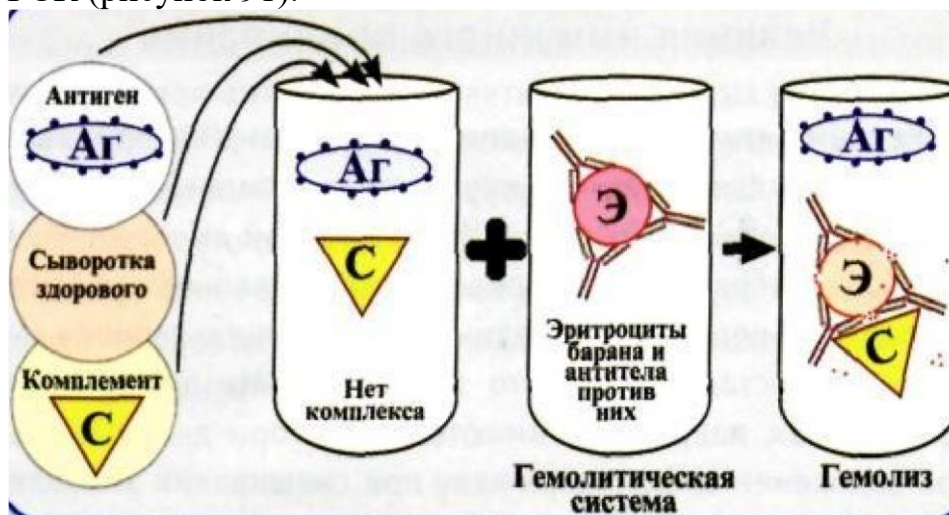


Рисунок 91 - Механизм РСК (отрицательный результат) Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Для постановки РСК необходимы следующие **компоненты**:

- 1. Испытуемая сыворотка** (ее предварительно инактивируют нагреванием при 56°C в течение 30 минут для разрушения собственного комплемента).
- 2. Антиген** (изготавливается из взвесей убитых микробов, лизатов микробов, отдельных химических фракций микробов, полных АГ, гаптен, экстрактов тканевых липидов). Основное требование к антигену — отсутствие угнетения активности комплемента. Для выявления этого свойства антигена комплемент дополнительно титруют в присутствии используемого в реакции антигена.
- 3. Комплемент** (в качестве комплемента используют свежую сыворотку крови морской свинки, т. к. в крови морской свинки комплемент содержится в наибольшем количестве и присутствует постоянно, или сухой комплемент из крови морской свинки в ампулах). Предварительно перед постановкой РСК комплемент разводят 1:10 и титруют в реакции гемолиза для установления титра — наименьшего количества комплемента, которое дает гемолиз эритроцитов при соединении с гемолитической системой, используемой в данной реакции. Учитывая возможные антикомплементарные свойства антигена, при постановке реакции к установленному титру комплемента делают 20—30% надбавку и получают рабочую дозу комплемента. Если для РСК взять концентрацию комплемента больше рабочей дозы, то после связывания комплемента с иммунным комплексом часть комплемента останется свободной и вызовет гемолиз (ложноотрицательную реакцию). Если взять концентрацию комплемента ниже рабочей дозы, гемолиза не будет даже в случае отрицательной реакции (ложноположительная реакция).

Таблица 8 - Схема титрования комплемента

Ингредиенты, мл	Пробирки											
	Опыт										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Гемолитической системы	Эритроцитов
Изотонический раствор	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Комплемент 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	-	0,5
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		-
3% взвесь эритроцитов барана	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,5
Пробирки тщательно встряхивают и инкубируют при 37°C 1 ч.												
Результат	Нет гемолиза		Гемолиз								Нет гемолиза	

В данном примере титр комплемента равен 0,15 мл, рабочая доза – 0,2 мл

4. Гемолитическая сыворотка, которую получают путем иммунизации животных, например кролика эритроцитами барана. На этикетке ампулы с гемолитической сывороткой указан ее титр, т. е. максимальное разведение сыворотки, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии комплемента. При постановке реакции сыворотку используют в тройном титре, т.к. другие участники реакции разведут ее в 3 раза, т.е. до титра. Например, титр гемолитической сыворотки 1:1200, а рабочее разведение (тройной титр) 1:400.

5. 3% взвесь эритроцитов барана. Эритроциты получают из дефибринированной крови барана путем троекратного отмывания их изотоническим раствором хлорида натрия.

6. Физиологический раствор (0,85% раствор хлорида натрия).

Ход выполнения работы

Для постановки реакции необходимо подготовить 4 пробирки.

В пробирку №1 (опытную) вносят по 0,5 мл исследуемой сыворотки, антигена и комплемента.

В пробирку №2 (контроль сыворотки) вносят по 0,5 мл исследуемой сыворотки, комплемента и физиологического раствора вместо антигена.

В пробирку №3 (контроль антигена) вносят по 0,5 мл комплемента, антигена и физиологического раствора вместо исследуемой сыворотки.

В пробирке №4 готовят гемолитическую систему из 2 мл гемолитической сыворотки в тройном титре (1/600) и 2 мл 3% взвеси бараньих эритроцитов. Все пробирки помещают в термостат при 37°C на 45-60 мин для осуществления 1-ой фазы реакции.

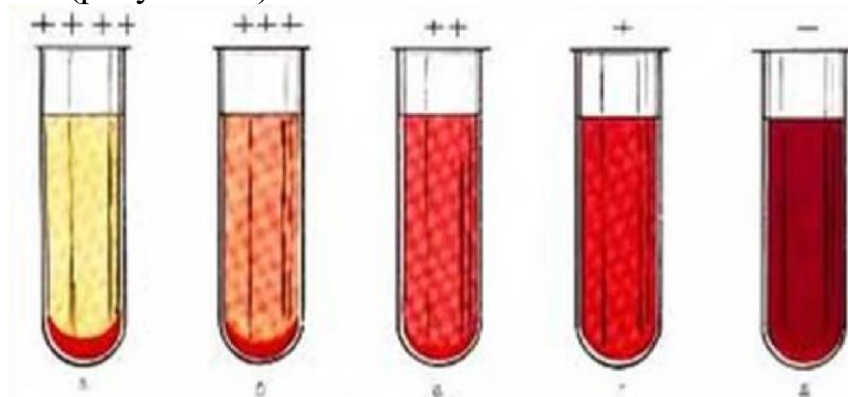
2 фаза: из 4-ой пробирки с гемолитической системой в остальные 3 пробирки внести по 1 мл гемолитической системы, встряхнуть содержимое пробирок и поставить их в термостат при 37°C на 45-60 минут. Учесть результат реакции и сделать заключение (таблица 5).

Таблица 9 - Схема постановки реакции связывания комплемента

Фаза реакции	Номер ингредиента	Ингредиенты, участвующие в реакции	Номер пробирки		
			1 (опытная)	2 (контроль сыворотки)	3 (контроль антигена)
I	1	Исследуемая сыворотка в мл, разведенная физиологическим раствором 1:5	0,5	0,5	-
	2	Антиген в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5
	3	Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5
	4	Физиологический раствор, мл	-		0,5
В термостат при 37°C на 1 ч.					
II	1	Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37°C на 1 ч.					

Результаты реакции учитывают по наличию или отсутствию гемолиза эритроцитов в гемолитической системе. При **отрицательной реакции** эритроциты разрушаются, наблюдают гемолиз («лаковую кровь» - прозрачную красную жидкость, сквозь которую можно прочесть текст). При **положительной реакции** вследствие отсутствия гемолиза наблюдают в пробирке взвесь эритроцитов (мутную красную жидкость, сквозь которую нельзя прочитать текст) или осадок из эритроцитов на дне пробирки в виде «пуговички».

Оценка результатов: при положительном результате наблюдается задержка гемолиза различной степени, которая условно обозначается по четырех крестовой системе (рисунок 92).



4+ полная задержка гемолиза (резко положительный результат);

3+ положительный;

2+ слабоположительный;

+ - сомнительный;

- - отрицательный

Рисунок 92- Оценка результатов РСК. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Количественный вариант постановки РСК заключается в том, что вместо одной опытной пробирки используют несколько пробирок с последовательными разведениями исследуемой сыворотки. Титром РСК считается наибольшее разведение сыворотки, т.е. последняя пробирка, в которой регистрируется положительный результат (рисунок 93).

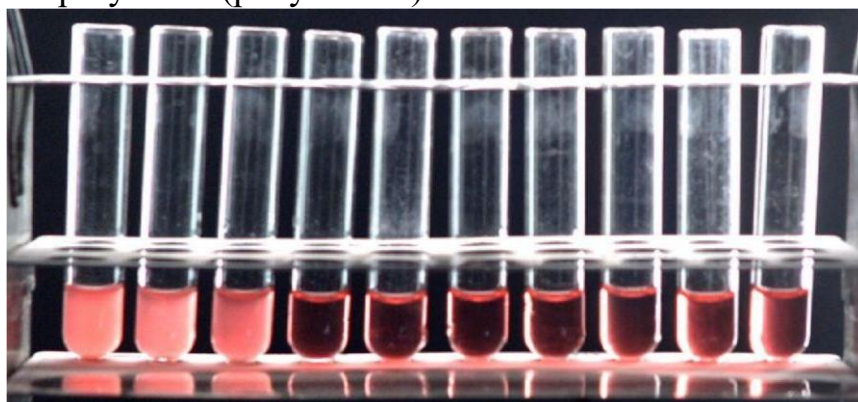


Рисунок 93- Реакция связывания комплемента (количественная)

Заимствовано из Интернет-ресурсов

Протокол №20

Определение комплементсвязывающих АТ в сыворотке больного.

Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1. Сыворотка больного в разведении 1/5	<p><i>1 фаза:</i> С помощью пипетки по схеме внести ингредиенты в 4 пробирки: опытную, контроль сыворотки, контроль антигена и для гемолитической системы. Поставить пробирки в термостат при 37°С на 45 -60 мин.</p> <p><i>2 фаза:</i> Из пробирки с гемолитической системой в остальные 3 пробирки внести по 1 мл, встряхнуть содержимое пробирок и поставить в термостат при 37° С на 45-60 минут.</p> <p>2. Учесть результат, сделать заключение.</p>	

Материалы и оборудование: пробирки, штатив, исследуемая сыворотка, антиген, комплемент, физиологический раствор, пипетки-дозаторы на 1 мл, гемолитическая сыворотка, взвесь эритроцитов барана, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 137-138.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С.156-158.

3.Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.118-122.

1.21.Лабораторная работа №21

Тема: **Исследование фагоцитоза**

Цель: изучение клеточных факторов врожденного иммунитета

Студент должен знать:

1. Характеристика фагоцитирующих клеток. Этапы фагоцитоза.
2. Оценка функциональной активности нейтрофильных фагоцитов.

Студент должен уметь:

1. Определять стадии фагоцитоза

Основные теоретические положения

В конце XIX века русский биолог И. И. Мечников в период своей работы в Институте Пастера (Париж) занимался изучением роли клеток в осуществлении иммунных реакций.

Фагоцитоз, процесс поглощения чужеродного материала, является защитной реакцией, для которой не требуется специфичности, характерной для синтеза антител. С точки зрения эволюции, это — самый древний механизм защиты, присущий всем живым организмам, начиная с простейших.

И. И. Мечников изучал фагоцитоз на морских беспозвоночных (губках и кишечнополостных), наблюдая, как подвижные амёбовидные клетки поглощают частицы угля, попавшие в организм.

Открытое И. И. Мечниковым явление свойственно и человеку.

Фагоцитоз является одной из важнейших реакций, обеспечивающих естественную резистентность организма. Это многостадийный процесс, включающий в себя хемотаксис, захват объекта с последующим образованием фагосомы, слияние фагосомы и лизосомы с образованием фаголизосомы и протеолитическую деградацию поглощенного объекта.

Нарушения на различных этапах фагоцитоза приводят к развитию многочисленных патологических состояний.

Клетки, способные осуществлять фагоцитоз, И.И. Мечников разделил на микрофаги и макрофаги. Первыми в очаг воспаления мигрируют микрофаги (в первые часы, сутки), затем макрофаги (в течение нескольких дней).

К микрофагам относятся гранулоциты, в частности нейтрофилы периферической крови. Для оценки их функциональной активности и поглотительной способности применяется тест фагоцитоза, который позволяет определить фагоцитарный индекс и фагоцитарное число.

Фагоцитарный индекс (фагоцитарный показатель) – процент активных фагоцитов, т.е. содержащих фагоцитированный материал. В норме ФИ (ФП) = у взрослых -60–90%, у детей – 30-65%.

Фагоцитарное число – среднее количество поглощенных частиц на один фагоцит. В норме ФЧ после 30 мин инкубации = 4,5–7,5 частиц.

Несмотря на общность основных этапов нейтрофильного и макрофагального фагоцитоза, существуют особенности, характерные для процесса фагоцитоза, осуществляемого нейтрофилами и макрофагами. Нейтрофил может совершать свою эффекторную функцию (фагоцитоз) один раз, после чего он обычно гибнет. Макрофаг фагоцитирует многократно.

Кроме того, макрофаги осуществляют процессинг и презентацию антигена.

Процесс фагоцитоза состоит из хемотаксиса, адгезии, активации мембраны, погружения объекта с образованием фагосомы, слияния фагосомы и лизосомы, киллинга и расщепления объектов фагоцитоза; выброса продуктов деградации (рисунок 94).

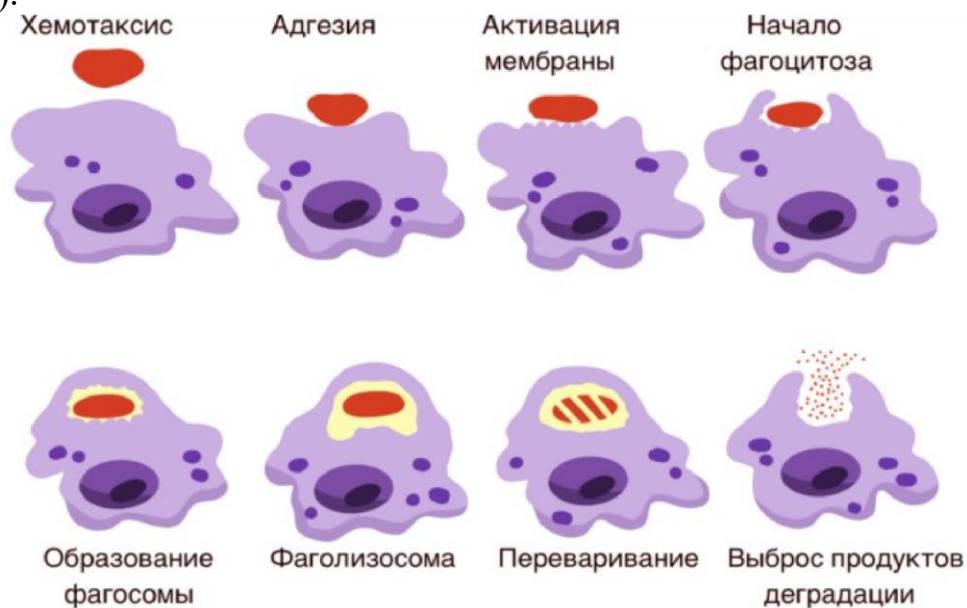


Рисунок 94 - Стадии фагоцитоза. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Ход выполнения работы

Выбор клеток-фагоцитов. Основными клетками для изучения фагоцитоза являются нейтрофилы периферической крови, т.к. макрофаги локализуются в тканях.

Подготовка: Кровь из вены допускается сдавать после 4-х часового периода голодания. Накануне и в день сдачи крови следует исключить интенсивную физическую нагрузку, прием алкоголя, курение. Можно пить воду.

Условия получения клеток-фагоцитов. Можно использовать гепаринизированную венозную или капиллярную кровь, но удобнее работать с лейкоцитарной взвесью. Для получения лейкоцитарной взвеси венозную гепаринизированную кровь инкубируют в пробирке под углом 45° при 37 °С в течение 30–40 мин. После спонтанной седиментации эритроцитов верхний слой состоит преимущественно из плазмы и взвешенных в ней лейкоцитов.

Выбор объекта фагоцитоза. В качестве тест-объекта для изучения фагоцитоза могут использоваться как суспензия микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* или *E. coli*), так и частицы латекса диаметром 3 мкм. При использовании частиц латекса недостатком является невозможность определить

степень завершенности фагоцитоза (т. е. уничтожения и деструкции объекта фагоцитоза).

Условия приготовления объекта фагоцитоза. Со скошенного питательного агара с суточной культурой *S. aureus* или *E. coli* физиологическим раствором смывают колонии микробов и полученный смыв доводят до концентрации 1×10^9 /мл, используя оптический стандарт мутности.

Стандарт мутности представляет собой ампулированный препарат, содержащий суспензию инертных частиц диаметром 1–2 мкм в определенной концентрации (выпускаются стандарты мутности на 1×10^6 частиц в мл, 1×10^9 частиц в мл и др.). При доведении концентрации микробной суспензии до желаемого уровня проводят визуальное сравнение мутности стандарта с суспензией микробов, помещенных в пробирку такого же диаметра, что и ампула стандарта мутности. При видимом превышении концентрации микробной суспензии ее разводят физиологическим раствором. Основным недостатком данного подхода является субъективность учета, поэтому более приемлемым вариантом является автоматизированное определение концентрации микробной суспензии с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК).

Условия проведения реакции. В пробирке смешивают в равных объемах (100 мкл + 100 мкл или 50 мкл + 50 мкл) микробную и лейкоцитарную взвеси (или гепаринизированную кровь), перемешивают и инкубируют при 37°C 30 мин (это время необходимо для миграции нейтрофилов, адгезии микробов на их цитоплазматической мембране и образования фаголизосомы), затем центрифугируют (5 мин со скоростью 1500 об/мин) и из осадка готовят мазки. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют этанолом 15 мин или в смеси Никифорова 10 мин, окрашивают по Романовскому-Гимзе 20–30 мин, ополаскивают в проточной воде и микроскопируют.

Регистрация результатов. Учет результатов проводится под иммерсионной системой микроскопа с увеличением 10×90. Микробы окрашены в темно-фиолетовый (или темно-синий) цвет, хорошо контурируются. Среди 100–200 нейтрофилов подсчитывают число фагоцитирующих клеток и общее число поглощенных микробов.

Показатели активности фагоцитоза:

1. ФИ (фагоцитарный индекс) – процент фагоцитирующих нейтрофилов – процент клеток, вступивших в фагоцитоз от общего их количества, $ФИ = (\text{число фагоцитов, поглотивших бактерии} / \text{число просмотренных нейтрофилов}) \times 100\%$. Например, среди 200 нейтрофилов фагоцитируют микробы 64 клетки, значит $ФИ = (64/200) \times 100\% = 32\%$.

2. ФЧ – фагоцитарное число, среднее число поглощенных микробов – частное от деления общего количества поглощенных микробов на процент фагоцитоза. Например, 64 нейтрофила фагоцитировали 214 бактерий, тогда $ФЧ = 214/64 = 3,34$. Нормальные показатели фагоцитоза при использовании суспензии стафилококка: ФИ 45–75; ФЧ 4,5–7,5.

Показания для проведения исследования:

- иммунодефицитные состояния
- тяжелая соматическая патология
- аутоиммунные заболевания

ПРОТОКОЛ №21 Исследование фагоцитоза

День иссл	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1 день	Готовые мазки различных стадий фагоцитоза	1. Микроскопировать 2. Зарисовать 3. Записать заключение	

Материалы и оборудование: готовые мазки, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 129-139.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 115-121.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.36-42.

2. Частная бактериология с вирусологией

2.1. Лабораторная работа №1

Тема: Бактериологический метод исследования при фурункулезе

Цель: освоение микробиологических методов диагностики стафилококковой инфекции

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики стафилококковой инфекции

Студент должен уметь:

1. Выписать направление и оформить результат микробиологического исследования;
2. Выполнить посев гноя на кокковую флору;
3. Идентифицировать выделенную культуру стафилококков;
4. Интерпретировать результаты определения антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом.

Основные теоретические положения

Впервые стафилококки были описаны в 1878 г. известным немецким микробиологом Р. Кохом (рисунок 100).



Рисунок 95 - Роберт Кох (Heinrich Hermann Robert Koch, 1843-1910 гг.) Заимствовано из Интернет-ресурсов

Стафилококки открыты Л. Пастером (рисунок 95) и Огстоном в 1880 году. Родовое название *Staphylococcus* дал Огстон (staphyle-гроздь, coccus-зернышко, ягода), а описание рода - Розенбах.

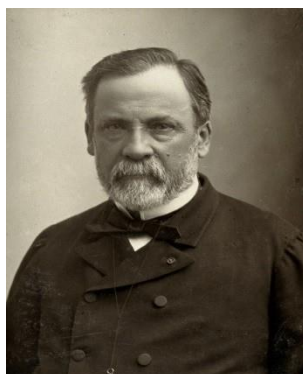


Рисунок 96 - Луи Пастер (Louis Pasteur 1822-1895 гг.)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Клинически значимыми для человека видами стафилококков являются *Staphylococcus aureus* (рисунок 97), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius* и некоторые другие.

Гнойную инфекцию чаще всего вызывают стафилококки, которые относятся к виду *Staph.aureus*, *Staph.epidermidis*, *Staph.saprophyticus*.

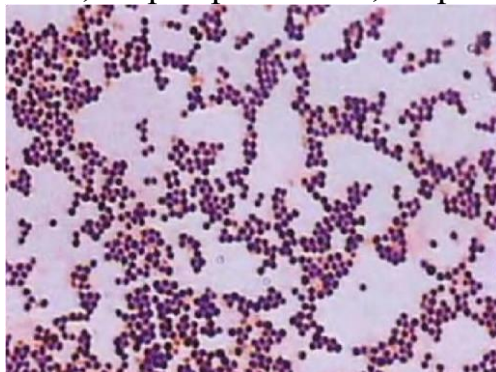


Рисунок 97 - *Staph.aureus* в чистой культуре (по Граму)
Займствовано из Интернет-ресурсов

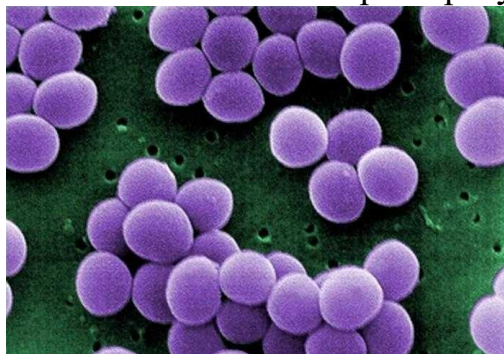


Рисунок 98 - Стафилококки (электронная микроскопия)
Займствовано из Интернет-ресурсов

Это грамположительные кокки 0,5-1,5 мкм в диаметре, располагаются в виде виноградных гроздей. Под микроскопом напоминают гроздь фиолетового винограда. Неподвижные, не образуют спор, могут образовывать микрокапсулу. Факультативные анаэробы по типу дыхания, хемоорганотрофы по типу питания. Восстанавливают нитраты до нитритов, устойчивые к лизоциму.

На кровяном агаре стафилококки образуют гемолитические и негемолитические непрозрачные колонии средних размеров белого или золотистого цвета, гладкие, круглые, с ровными краями, диаметром 1-3 мм.

Колонии стафилококков могут быть окружены зоной гемолиза и в большинстве случаев обладают золотистым, палевым или лимонно-желтым пигментом. На среде ЖСА (желточно-солевой агар) вырастают колонии, окруженные видимым при косом освещении радужным венчиком (рисунок 99).



Рисунок 99 - Колонии *S. aureus* на ЖСА, окруженные видимым при косом освещении радужным венчиком (наличие лецитиназы)
Займствовано из Интернет-ресурсов

На селективно-дифференциальных средах вырастают, как правило, только колонии стафилококков. На ЖСА вокруг колоний выявляется продукция лецитиназы. На маннит-полимиксиновом агаре, инкубированном в анаэробных условиях, в случае ферментации маннита колонии стафилококков и среда вокруг них окрашиваются в желтый цвет. ДНК-аза – один из ферментов патогенности *Staph.aureus*, наличие которого изучают на питательной среде с добавлением ДНК (рисунок 100).

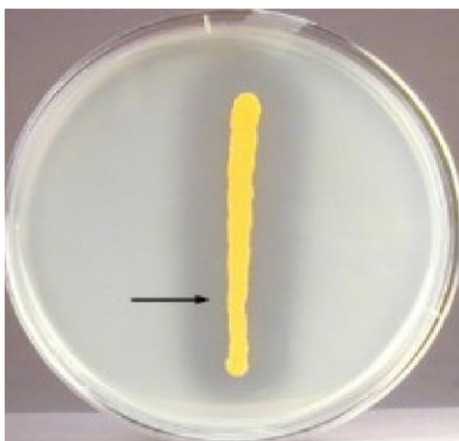


Рисунок 100 - Нуклеазная активность у *Staph. aureus* на ДНК-агаре
 Заимствовано из Интернет-ресурсов

Идентификация стафилококков

1. Проба на каталазу

Чистую культуру изучаемого штамма помещают с помощью стеклянной палочки в каплю 3-10 % раствора перекиси водорода на предметном стекле и растирают круговыми движениями. В положительных случаях наблюдают выделение пузырьков газа (рисунок 101).



а



б

Рисунок 101 - Выявление каталазы стафилококков с помощью перекиси водорода на питательном агаре (а) и на стекле (б).

Заимствовано из Интернет-ресурсов

2. Постановка реакции на плазмокоагулазу

Разведенную в 2 раза плазму крови разливают по 0,4 мл в пробирки, в которые вносят одну петлю исследуемых чистых культур стафилококка, и помещают в термостат при 37°C. Через 2, 4, 24 часа отмечают результаты опыта. При наличии плазмокоагулазы образуется сгусток.

С точки зрения патогенетических признаков важной является классификация стафилококков по способности продуцировать плазмокоагулазу (рисунок 102). По этому признаку стафилококки подразделяются на коагулазоположительные или коагулазопозитивные (к ним относится золотистый стафилококк – *S. aureus*) и коагулазоотрицательные или коагулазонегативные стафилококки (к ним относятся эпидермальный и сапрофитный стафилококки – *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*).

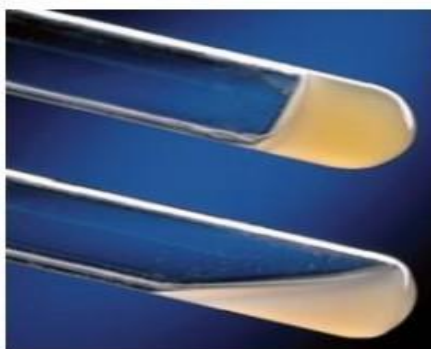


Рисунок 102 - Свертывание плазмы коагулазой (верхняя пробирка) и разжижение сгустка фибринолизинном (нижняя пробирка)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

5. Постановка пробы гемолиза на кровяном агаре

В результате метаболической активности *Staph. aureus* выделяет различные экзотоксины (гемолизины), вызывающие лизис крови (гемолиз). Особенностью кровяного агара является возможность наблюдать гемолитическую активность микроорганизмов и дифференцировать их по типу гемолиза (рисунок 103). β -гемолиз (бета-гемолиз) — полный лизис эритроцитов, при котором в зоне роста микроорганизма питательная среда обесцвечивается. Такой тип гемолиза характерен для [стафилококков](#).



Рисунок 103 - Бета-гемолиз вокруг колоний *Staph. aureus* на кровяном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

6. Постановка пробы на сахаролитическую активность

Стафилококки обладают высокой биохимической активностью: они ферментируют в аэробных условиях многие углеводы до уксусной кислоты без газа. В частности, *S. aureus* разлагает до кислоты глюкозу, сахарозу, лактозу, маннит и не ферментирует мальтозу (рисунок 104).

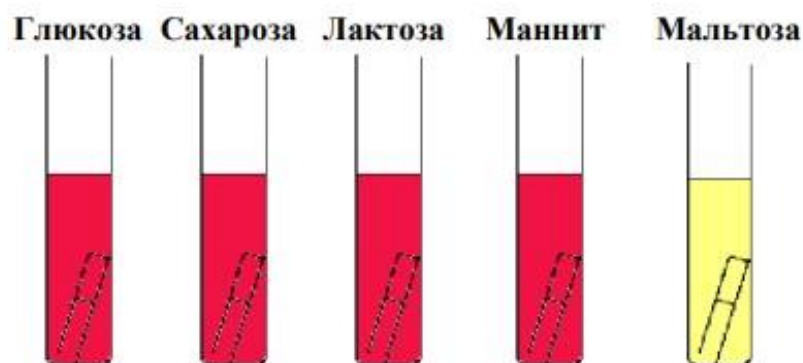


Рисунок 104 - Ферментация углеводов золотистым стафилококком. Среда Гисса. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ход выполнения работы

Микробиологическое исследование гноя при подозрении на стафилококковую инфекцию.

Материал – гной из фурункула. Выписать направление в бак. лабораторию.

I. Бактериоскопическое исследование: приготовить мазок из гноя, окрасить по Граму, микроскопировать, сделать заключение.

II. Бактериологическое исследование:

1 день: посев исследуемого материала петлей на ЖСА в чашку Петри, инкубация в термостате при 37°C 18-24 ч.

2 день: описать выросшие на ЖСА колонии по схеме. Из части колоний приготовить мазок, окрасить по Граму, микроскопировать. Пересеять колонию, в мазке из которой были обнаружены стафилококки, в пробирку со скошенным агаром для получения чистой культуры стафилококков.

3 день: рост на скошенном агаре. Описать характер роста, наличие золотистого пигмента. Для проверки чистоты культуры: приготовить мазок, окрасить по Граму, микроскопировать. Поставить тесты патогенности: проба на плазмокоагулазу; гемолиз на кровяном агаре; ферментация маннита в анаэробных условиях. Посев на МПА в чашки Петри с дисками антибиотиков.

4 день: учет результатов тестов патогенности, антибиотикочувствительности. Сделать заключение, выписать результат исследования на бланке.

Форма направления исследуемого материала

	Нысанның БҚСЖ бойынша қолы Код формь по ОКУД КҰЖЖ бойынша ұйым коды Код организации по ОКПО
--	--

ҚР Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения РК	ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің 2005 жылғы 08 шілдедегі №3326 ұйрығымен бекітілген №204/ені санды Медициналық құжаттама
Ұйымның атауы/Наименование организации М. Оспанов атындағы БҚММУ медицина орталығы Медицинский центр ЗКГМУ им. М. Оспанова.	Медицинская документация Форма № 204 / утверждена приказом Министра здравоохранения РК №332 от «08» июля 2005 года

Микробиологиялық зерттеуге (алғашқырет, қайталап)

ЖОЛДАМА/НАПРАВЛЕНИЕ

На микробиологическое исследование (первичное, повторное)

№ _____
20 ____ ж. (г.) сағ (час) _____ мин.

Материал алыну күнімен уақыты (дата и время взятия материала) в зертханаға (лабораторию)

Тегі, аты, әкесінің аты (Фамилия, имя, отчество) _____
Туған күні (Дата рождения) _____
Медициналық карта (медицинская карта) № _____
Ұйым (организация) _____
Бөлімше (Отделение) _____ палата _____ учаске (участок) _____
Тұрақты мекен-жайы (уақытша болса, қаралушы кімнің үйінде тұрып жатыр, т.а.ә.а. көрсетіңіз) (Адрес постоянного местожительства/временного с указанием ф.и.о. у которого проживает обследуемый)

Жұмыс оқу орны (балалар мекемесінің, мектептің атауы)
(Место работы, учебы (наименование детского учреждения, школы) _____

Диагнозы, ауырған күні (Диагноз, дата заболевания): _____

Зерттелу көрсеткіштері: науқас, бұрын ауырған, реконвалесцент, бактерия тасушы, түйісуші, алдынала зерттеу. (Показания к обследованию: больной, переболевший, реконвалесцент, бактерионоситель, контактный, профилактическое обследование)

астынсызып, толықтырып жазыңыз (подчеркнуть, вписать)

Материал: қан, несеп, нәжіс, қақырық, дуоденум сұйықтығы, жұлын сұйықтығы, пунктат, жарадан аққан сұйықтық, ірің, терleme, кесу материалы, жылбысқы қабықтың жағындысы, қырнама және басқалар (Материал: кровь, моча, кал, мокрота, дуоденальное содержимое, спинномозговая жидкость, пунктат, раневое отделяемое, гной, выпот, секционный материал, мазок со слизистых, соскоб и др.)

астынсызып, материал қайдан қайдан келгенін көрсетіп жазыңыз (подчеркнуть, вписать, указав, откуда получен материал)

Зерттеудің атауы мен мақсаты (цель и наименование исследования):

Қандай жұқпалы ауруларға зерттеу керек (на какие инфекции исследовать)

Материал жіберген адамның лауазымы, тегі, қолы (Должность, фамилия, подпись лица, направляющего материал)

**Навыки чтения и оценки бланков с результатами
микробиологических исследований.**

Результаты микробиологических исследований заполняются на стандартных бланках и подклеиваются к историям болезни или амбулаторным картам. В них указывается наличие или отсутствие предполагаемого патогенного или условно-патогенного возбудителя. Название микроба дается по бинарной номенклатуре, т.е. указывается род и вид возбудителя.

Форма ответа

		Нысанның ТҚЖК бойынша қолы КодформыпоОКУД ҚҰЖК бойынша ұйым коды КодорганизациипоОКПО
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения РК		ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің 2005 жылғы 08 шілдедегі №332 бұйрығымен бекітілген №239/енысанды Медициналық құжаттама
Ұйымның атауы/Наименование организации М. Оспанов атындағы БҚММУ медицина орталығы Медицинский центр ЗКГМУ им.М.Оспанова.		Медицинская документация Форма № 239 / у Утверждена приказом Министра здравоохранения РК №332 от «08» июля 2005года

**МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕСІ
РЕЗУЛЬТАТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ**

№ _____ 20 ж.(г.) _____ 20ж.(г.)
Биоматериал _____ күні _____ (дата поставки)
_____ әкелінген _____ Зерттеу күні (дата
материала) _____
исследования) _____

Тегі, аты, әкесінің аты (Фамилия, имя,отчество)

Туған күні (Дата рождения)

Ұйым (Организация)

Бөлімше (Отделение) _____ палата_учаске (участок)

Медициналық карта (медицинская карта)№

Зерттегенде (при исследовании)

Қандай материал көрсетіңіз (указать какой материал)

« _____ » _____ 20 ж.(г.) Қолы (Подпись) _____

ПРОТОКОЛ №1

Бактериологический метод исследования при фурункулезе.

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Гной из фурункула	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выписать направление. 2. Приготовить мазок из гноя, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать. 3. Посев исследуемого материала петлей на ЖСА в чашку Петри 	
2.	Рост колоний на ЖСА в чашке Петри	<ol style="list-style-type: none"> 1. Описать колонии (по схеме). 2. Обратит внимание на наличие или отсутствие фермента лецитиназы. 3. Из части колоний приготовить мазок, окрасить по Граму, микроскопировать. 4. Отсеять колонию петлей на скошенный агар. 	
3.	Рост на скошенном агаре	<ol style="list-style-type: none"> 1. Описать характер роста (однородность, цвет). 2. Проверить чистоту культуры: приготовить мазок из гноя, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать. 3. Определение тестов патогенности: <ul style="list-style-type: none"> - проба на плазмокоагулазу; - гемолиз на кровяном агаре; - ферментация маннита. 4. Определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков. 	
4.	Рост в столбике с маннитом, на кровяном агаре, в плазме, рост на МПА с дисками антибиотиков.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Учет результатов. 2. Заключение о выделенной культуре. 3. Зарисовать. 4. Выписать результат исследования на бланке. 	

Материалы и оборудование: гной из фурункула, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла,

лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, чашки Петри со стерильной средой ЖСА, пробирки со скошенным агаром (чистым и засеянным), термостат, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, наборы красителей по Граму, диски для определения антибиотикочувствительности, чашки Петри с МПА.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 149-152.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.133-137.
3. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 258-264.

2.2. Лабораторная работа №2

Тема: **Микроскопическая диагностика гонореи**

Цель: освоение микроскопического метода диагностики гонококковой инфекции

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики гонореи **Студент**

должен уметь:

1. Выписать направление и оформить результат микробиологического исследования;
2. Приготовить фиксированный микропрепарат, окрасить его простым методом, по методу Грама;
3. Провести оценку результатов микроскопии окрашенных мазков

Основные теоретические положения

Возбудители гонореи - *Neisseria gonorrhoeae* - грамотрицательные диплококки, которые имеют форму кофейных зерен (рисунок 105), неподвижны, спор не образуют, имеют нежную капсулу и пили. Гонококки - наиболее прихотливые бактерии. Растут на средах с содержанием нативного сывороточного белка в атмосфере 3-10% CO₂. На плотной среде образуют мелкие бесцветные колонии.



Рисунок 105 - *Neisseria gonorrhoeae* (электронная микроскопия)
Займствовано из Интернет-ресурсов

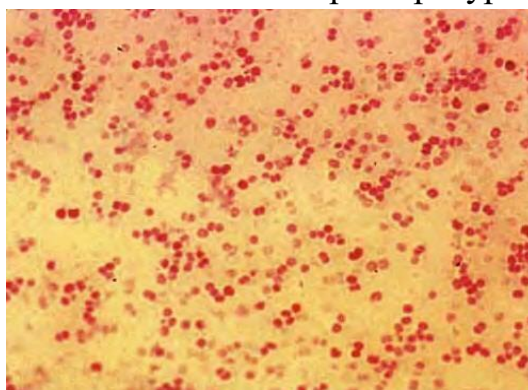


Рисунок 106 - *Neisseria gonorrhoeae*, чистая культура (по Граму)
Займствовано из Интернет-ресурсов

Эффективность бактериологического исследования во многом определяется качеством питательных сред. Среды для культуральной диагностики гонореи готовят на основе мясопептонного агара из мяса кроликов или свежих бычьих сердец с добавлением асцитической жидкости (асцит-агар), сыворотки крови, дрожжевого гидролизата, казеина. Исследуемый материал засевают на поверхность питательной среды и инкубируют при 37°C в течение 24-72 ч в атмосфере, содержащей 10-20 % углекислого газа. Гонококки образуют круглые прозрачные или слегка мутные колонии, напоминающие капли росы.



Рисунок 107 - Рост *Neisseria gonorrhoeae* на кровяном агаре.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Выделенные чистые культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. В конце исследования обязательно определяют наличие ферментов - β -лактамаз для определения резистентности штамма к пенициллину.

При хронической гонорее или на фоне лекарственной терапии бактериоскопическое исследование часто не позволяет сделать вывод о наличии или отсутствии заболевания, так как в этих случаях гонококки могут либо вовсе не обнаруживаться в мазках, либо иметь атипичную форму (в виде шаров или, наоборот, очень мелких образований) и тинкториальные свойства. В таких случаях необходимо проводить бактериологическое исследование. Бактериологический или культуральный метод обязательно применяется также для контроля по окончании лечения больных гонореей, при диагностике заболевания у детей, по требованию судебно-медицинской экспертизы и в некоторых других случаях.

Ход выполнения работы

1. Материал для исследования: у мужчин - отделяемое уретры, сок предстательной железы, сперма; у женщин - отделяемое влагалища, уретры и цервикального канала. Берут также соскобы со слизистых других возможных очагов поражения (прямой кишки, глотки, конъюнктивы глаз). Материал отбирают стерильной петлей, ватным тампоном или ложечкой не ранее чем через 2 ч после последнего мочеиспускания или спринцевания.

Из исследуемого материала готовят два мазка, один из которых окрашивают по Граму, другой - простым методом (метиленовым синим).

Окраска метиленовым синим. Окраска метиленовым синим является ориентировочной. Можно использовать водный или спиртовой растворы метиленового синего. Использование спиртового раствора позволяет сократить время фиксации препарата, не снижая качества окраски. Метиленовый синий наилучшим образом контрастирует гонококк, позволяя четко определить его форму, размер, характер взаимодействия с клетками макроорганизма.

Оценка мазков, окрашенных метиленовым синим. При микроскопии препарата видны: ядра клеток, окрашенные в синий цвет; цитоплазма, окрашенная в голубой цвет разной интенсивности; бактериальная микрофлора, окрашенная в синий цвет разной интенсивности.

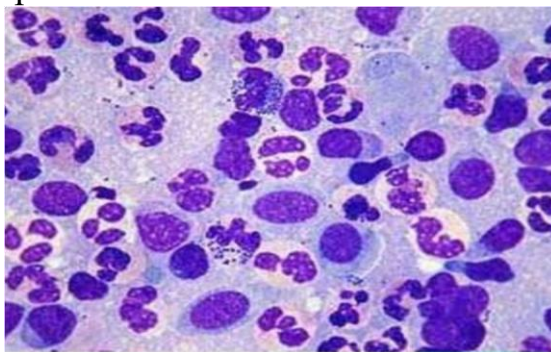


Рисунок 108 - *N. gonorrhoeae* в гное (окраска метиленовым синим)
Займствовано из Интернет-ресурсов

Мазок, окрашенный по Граму, необходим для окончательной видовой дифференциации обнаруженных кокков. При положительном результате в мазках обнаруживают грамотрицательные диплококки бобовидной формы (рисунок 109). Стафилококки и стрептококки являются грамположительными кокками, которые располагаются, как правило, вне лейкоцитов. Гонококки – грамотрицательные диплококки бобовидной формы (1,2-0,8 мкм), располагающиеся внутри лейкоцитов.

Положительный бактериоскопический диагноз ставится, в основном, при острой форме гонореи, до приема антибиотиков.

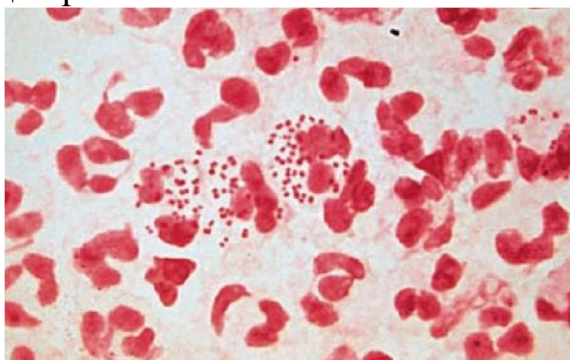


Рисунок 109 - *N. gonorrhoeae* в гное (окраска по Граму), незавершенный фагоцитоз. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Оценка результатов микроскопии окрашенных мазков

На основании микроскопического исследования диагноз гонореи устанавливается по трем признакам гонококка:

- его форме (диплококки бобовидной формы);
- расположению (вне- и внутриклеточно);
- окраске (грамотрицательно).

Только наличие всех трех признаков позволяет поставить диагноз. Если же отсутствует хотя бы один из них, требуется культуральное исследование.

ПРОТОКОЛ №2 Микроскопическая диагностика гонореи

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Отделяемое уретры	1. Выписать направление для микробиологического исследования; 1. Приготовить мазок из отделяемого уретры, окрасить метиленовым синим, микроскопировать, зарисовать 2. Приготовить мазок из отделяемого уретры, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать.	

		3. Записать оценку результатов микроскопии окрашенных мазков, оформить заключение. 4. Выписать результат микробиологического исследования	
--	--	--	--

Материалы и оборудование: отделяемое уретры, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, водно-спиртовый раствор метиленового синего и набор красителей по Граму.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 166-169.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 292-294.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.222.

2.3. Лабораторная работа №3

Тема: Бактериологическая диагностика шигеллеза

Цель: освоение бактериологического метода диагностики шигеллеза

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики шигеллеза.

Студент должен уметь:

1. Выписать направление и результат микробиологического исследования;
2. Провести посев фекалий больного на селективную среду Плоскирева;
3. Описать выросшие колонии бактерий рода *Shigella*;
3. Провести оценку результатов микроскопии окрашенных мазков бактерий рода *Shigella*;
4. Провести посев колоний со среды Плоскирева на среду Ресселя;
5. Оценить результаты изменений цвета среды Ресселя;
6. Поставить реакцию агглютинации на стекле с поливалентной дизентерийной сывороткой (смесь №1) и видовыми сыворотками (Флекснер, Ньюкастл, Зонне).

Основные теоретические положения

Бактериальная дизентерия, или шигеллез - инфекционное заболевание с поражением толстой кишки, развитием колита и интоксикацией организма. Возбудители - бактерии рода *Shigella*:

- *Shigella dysenteriae* (группа А);
- *Shigella flexneri* (группа В);
- *Shigella boydii* (группа С); • *Shigella sonnei* (группа D).

Шигеллы - мелкие грамотрицательные неподвижные палочки (рисунок 110). Все виды шигелл инвазируют слизистую оболочку толстой кишки с последующим межклеточным распространением (рисунок 111). Эта способность связана с крупной плазмидой, которая детерминирует синтез чувствительных к трипсину белков-инвазинов и фактор распространения микроорганизма через межклеточные пространства. Кроме того, все шигеллы продуцируют белковые шига- и шигаподобные цитотоксины, поражающие эндотелий, следствием чего является появление в кале крови.

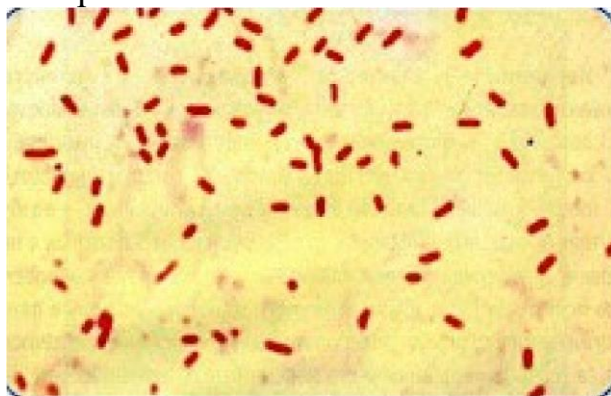


Рисунок 110 - Шигеллы, чистая культура (по Граму)
Займствовано из Интернет-ресурсов

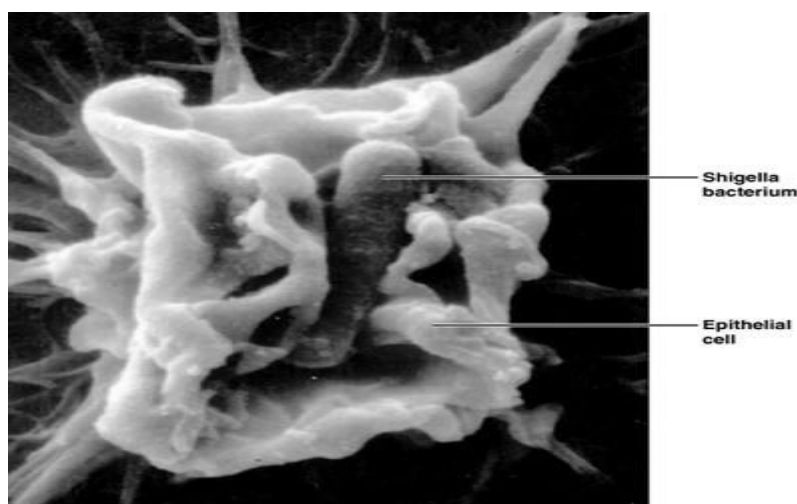


Рисунок 111 - Шигелла в складках слизистой оболочки толстого кишечника. Займствовано из Интернет-ресурсов

Лабораторную диагностику шигеллезозов осуществляют бактериологическим методом.

В соответствии с особенностями патогенеза шигеллы локализуются в эпителиальных клетках толстой кишки, поэтому основным материалом для бактериологического исследования служат испражнения или материал из прямой кишки, взятый с помощью ватно-марлевого тампона или ректальной петли.

При сборе испражнений для выделения шигелл следует учитывать следующее:

- Шигеллы находятся главным образом в слизи и гное, поэтому отбирают пробы, содержащие слизь и гной.
- Первые порции кала представляют собой пробку в нижней части кишки, где микроорганизмы могли погибнуть, поэтому для посева отбирают последующие порции кала, происходящие из верхней части прямой и сигмовидной кишки.
- Для исследования не следует брать последние, жидкие порции испражнений, которые являются содержимым нижнего отрезка тонкой кишки.
- Прямой посев фекалий для выделения шигелл можно проводить только в том случае, если его выполняют непосредственно в палате, иначе в постоявших испражнениях возникают процессы брожения, обуславливающие кислую реакцию, при которой шигеллы гибнут.

Транспортной средой служат среды обогащения (20% желчный и селенитовый бульоны). Консервант - глицериновая смесь (химически чистый глицерин и изотонический раствор натрия хлорида). Объем вносимых испражнений не должен превышать 1/5 объема транспортных сред. После доставки в лабораторию в транспортной среде материал высевают на плотные селективно-дифференциальные среды. Испражнения, доставленные в консерванте, хранят до посева при температуре 4°C. Посев осуществляют одновременно на несколько сред - Плоскирева, Эндо, Левина.

В 1904 г. Эндо разработал питательную среду для выделения тифоидных палочек из фекалий, получившую широкое практическое применение.

В состав среды Эндо входят мясной пептон, натрий фосфорнокислый двузамещенный, основной фуксин, лактоза, сульфит натрия и агар. Сульфит натрия и основной фуксин необходимы для подавления роста грамположительных микроорганизмов. Дифференцирующие свойства среды Эндо основаны на способности микроорганизмов ферментировать лактозу. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют на среде бесцветные прозрачные колонии. Лактозоположительные микроорганизмы ферментируют лактозу до образования ацетальдегида, который, реагируя с натрием сернистокислым, окрашивает колонии в красный цвет. Рост грамположительной микрофлоры на среде полностью отсутствует, благодаря наличию сульфита натрия и фуксина основного (рисунок 112).

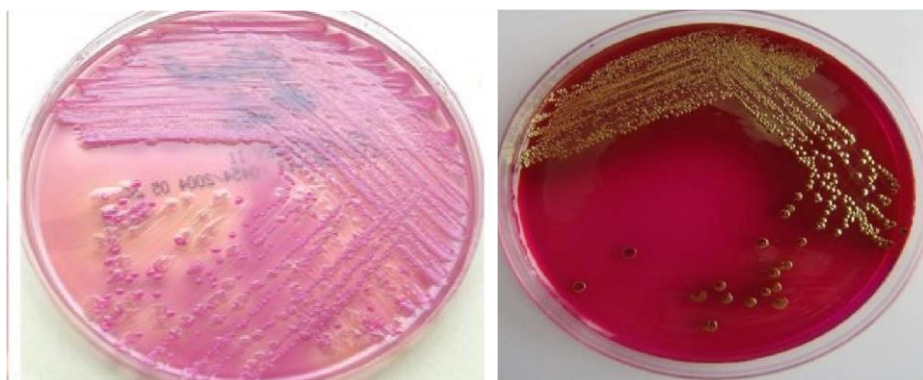


Рисунок 112 - Справа колонии эшерихий (малиновые) с металлическим блеском, слева колонии шигелл (бесцветные) на среде Эндо.

Займствовано из Интернет-ресурсов

Дифференциально-диагностическая среда Левина - питательная среда с эозин-метиленовым синим. Эта среда используется при лабораторной диагностике дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллезов и других кишечных инфекций. Впервые агар с эозином и метиленовым синим был предложен в 1916г. Холт-Харрисом и О.Тигом (J.E. Holt-Harris, O. Teague), позднее, в 1918 г., состав среды был модифицирован Левином. Он упростил первоначальную пропись, используя только пептон в качестве основы и добавив к нему калия фосфат однозамещенный в качестве буферной системы, также он исключил из состава среды сахарозу и увеличил концентрацию лактозы.

Дифференцирующая способность этой среды основана на изменении pH под действием кислоты, образующейся при ферментации бактериями лактозы. Комплекс индикатора выпадает в осадок при pH 4,7, окрашивая колонии кислотообразующих бактерий в темно-сине-фиолетовый, почти черный цвет, часто с зеленым блеском. Бактерии, не ферментирующие лактозу, образуют бесцветные или розоватые колонии (рисунок 113).

Среда Левина имеет следующий состав: пептон или панкреатический гидролизат желатина, лактоза, калия фосфат двузамещенный, эозин, метиленовый синий, агар. Цвет готовой среды красновато-кирпичный.

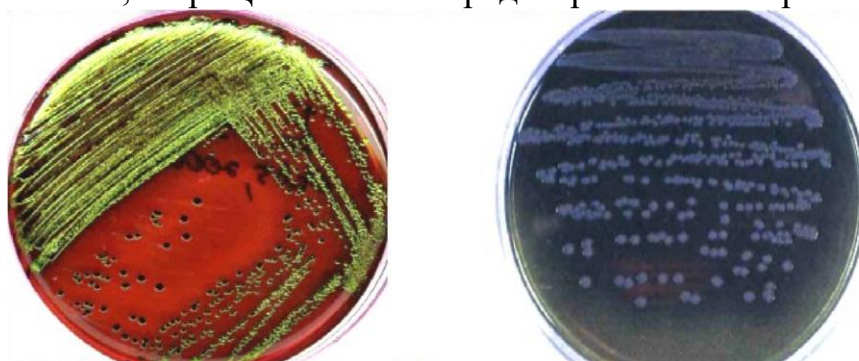


Рисунок 113 - Рост энтеробактерий на среде Левина. Слева – *E.coli*, темнофиолетовые колонии с зеленым блеском. Справа – *S. flexneri*, бесцветные

колонии. Займствовано из Интернет-ресурсов

Среда Плоскирева используется для выделения чистой культуры энтеробактерий на 1-м этапе; позволяет дифференцировать бактерии по признаку ферментации лактозы. В связи с наличием в составе среды ингибиторов (соли желчных кислот, йод, индикаторы) среда подавляет рост грамположительных бактерий. Лактозоотрицательные бактерии (шигеллы, сальмонеллы) растут на данной среде в виде бесцветных колоний. Лактозоположительные бактерии (эшерихии) образуют колонии малинового цвета (рисунок 114).

Дифференцирующие свойства среды основаны на изменении pH в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют на агаре Плоскирева за счет индикатора нейтрального красного колонии малинового цвета. Среда Плоскирева имеет следующий состав: гидролизат рыбной муки, тиосульфат и цитрат натрия, лактоза, эстракт пекарских дрожжей, желчь крупного рогатого скота, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрий хлористый, нейтральный красный, бриллиантовый зеленый, йод кристаллический, агар.

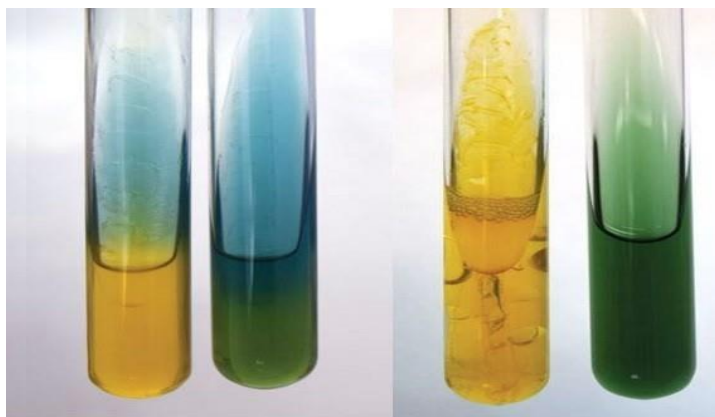


Рисунок 114 - Среда Плоскирева

На левой половине среды Плоскирева - лактозоотрицательные бактерии (шигеллы и сальмонеллы), их колонии бесцветные. Справа колонии лактозоположительных бактерий (эшерихии) – малинового цвета. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Среду Ресселя используют для дифференциации грамотрицательных бактерий кишечной группы, особенно эшерихий, сальмонелл и шигелл, по их способности ферментировать глюкозу и лактозу. Образование кислоты в ходе инкубирования определяют по изменению цвета индикатора фенолового красного в скошенной части (аэробная ферментация) и в столбике среды (анаэробная ферментация). На образование газа в ходе ферментации указывают пузырьки и разрывы среды в столбике. По результатам анализа, бактерии разделяют на три группы: лактозоферментирующие, глюкозоферментирующие, и бактерии, не ферментирующие углеводы. После посева на среду Ресселя результат оценивают не ранее чем через 19-20 часов инкубации в термостате, потому что раньше он может быть ошибочным, в связи с поэтапной ферментацией компонентов среды. Обязательно оставляют одну контрольную пробирку (исходный цвет – зеленый).

При росте микроорганизмов, ферментирующих лактозу, происходит смещение pH среды в кислую сторону и наблюдается пожелтение скошенной части агара, глюкозы – пожелтение столбика среды. Рост микроорганизмов, не ферментирующих лактозу и глюкозу, сопровождается подщелачиванием, индикатор среды синее, либо сохраняется исходный зеленый цвет. *S. flexneri* – пожелтение столбика и посинение скошенной части. *S. paratyphi* – пожелтение столбика с образованием газа и посинение скошенной части. *E. coli* – пожелтение всей среды с газообразованием, *Alcaligenes faecalis* – посинение всей среды или только скошенной части (рисунок 115).



Shigella flexneri *Alcaligenes faecalis* *Escherichia coli* Контроль

Рисунок 115 - Рост энтеробактерий на среде Ресселя

Для идентификации выделенных культур шигелл на 3 этапе ставят реакцию агглютинации (РА) на стекле с поливалентной сывороткой (если реакция положительная, то далее с видовыми сыворотками). Диагностические лиофилизированные иммунные сыворотки получают из крови кроликов или баранов, гипериммунизированных антигенами шигелл, инактивированные формалином или мертиолятом. Адсорбированные сыворотки содержат антитела, которые должны агглютинировать взвеси культур шигелл, содержащие гомологичные антигены, и не должны агглютинировать взвеси культур шигелл, содержащие гетерологичные антигены.

Ход выполнения работы

Бактериологическое исследование включает следующие основные этапы: посев исходного материала на дифференциально-диагностические и элективные среды, отбор подозрительных колоний, накопление чистых культур и их идентификацию.

1 этап. Фекалии больного засевают на среду Плоскирева, Эндо, Левина.

2 этап. Просматривают посеvy через 18-20 ч после первичного высева. На средах Плоскирева, Левина и Эндо шигеллы формируют бесцветные, прозрачные или полупрозрачные, круглые, выпуклые, с ровным краем (Sформы) колонии диаметром 1-4 мм.

Описать по схеме бесцветные колонии. Сделать мазок, окрасить по Граму, микроскопировать. При бактериоскопии материала из таких колоний выявляют

наличие грамтрицательных коротких палочек, в свежих клинических материалах иногда напоминающих коккобациллы. Колонии, подозрительные на принадлежность к шигеллам, пересевают в пробирку со средой Ресселя.

3 этап. Анализируют результаты посевов предыдущего дня.

Микроорганизмы, относящиеся к ряду *Shigella*, как правило, не ферментируют лактозу и ферментируют глюкозу до кислоты (за исключением *S. flexneri* серовара 6 Ньюкастл, который кроме кислоты образует еще и газ). Ферментация лактозы наблюдается на 2-3-и сутки только у штаммов *S. sonnei*. Ставят реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой ФЗН (Флекснер, Зонне, Ньюкастл), при положительном результате ставят РА отдельно с каждой сывороткой из этой смеси для определения вида.

Окончательное заключение выдается на 3 день, по результатам изучения ферментативных свойств и реакции агглютинации. На бланке выписывают результат исследования.

ПРОТОКОЛ №3

Бактериологическое исследование при дизентерии

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Испражнения	1. Написать направление в бак. лабораторию 2. Посев петлей на среду Плоскирева, Эндо, Левина в чашках Петри. 3. Инкубация в термостате при 37°C 24 часа.	
2.	Рост колоний на среде Плоскирева	1. Изучение и описание бесцветных колоний. 2. Мазок из части колоний, окраска по Граму. 3. Пересев бесцветной колонии на среду Ресселя.	
3.	Рост на среде Ресселя	1.Регистрация изменений цвета среды 2.Мазок, окраска по Граму, микроскопия. 3.Реакция агглютинации на стекле с поливалентной дизентерийной	

		сывороткой (смесь №1) и видовыми сыворотками (Флекснер, Ньюкастл, Зонне). Зарисовать 4.Оформить заключение. 5.Выписать на бланке результат исследования.	
--	--	--	--

Материалы и оборудование: испражнения в вакутейнере, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, чашки Петри со средой Плоскирева (Эндо, Левина), пробирки со средой Ресселя, термостат, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, наборы красителей по Граму, поливалентная агглютинирующая дизентерийная сыворотка, видовые агглютинирующие сыворотки (Флекснер, Ньюкастл, Зонне).

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 177-180.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 207-211.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С179-181.

2.4. Лабораторная работа №4

Тема: Серологическая диагностика брюшного тифа. Реакция Видаля.

Цель: освоение серологического метода диагностики брюшного тифа

Студент должен знать:

- 1.Методы микробиологической диагностики брюшного тифа.

Студент должен уметь:

1. Поставить и интерпретировать реакцию Видаля для диагностики брюшного тифа.
2. Выписать направление и оформить результат серологической диагностики (реакции Видаля)

Основные теоретические положения

Брюшной тиф и паратифы А и В - острые кишечные инфекции, сходные по патогенезу и клиническим проявлениям, характеризующиеся циклическим течением, поражением лимфатического аппарата тонкой кишки,

мезентериальных лимфатических узлов, паренхиматозных органов, бактериемией. Клинически протекают с выраженной интоксикацией, развитием энтерита и сыпью.

Возбудителей брюшного тифа и паратифов относят к роду *Salmonella*, семейству *Enterobacteriaceae*, виду *S. enterica*, сероварам *S. Typhi* (Рисунок 116), *S. Paratyphi A* и *S. Paratyphi B*.

Сальмонеллы - короткие грамотрицательные палочки с закругленными концами, длиной 1,5-4 мкм. В большинстве случаев подвижные (перитрихи), спор и капсул не имеют (рисунок 117). Дифференциация внутри видов проводится по антигенной структуре. Сальмонеллы обладают соматическим Оантигеном, жгутиковым Н-антигеном, некоторые - поверхностным Кантигеном. По серологической классификации Уайта и Кауфмана сальмонеллы подразделяются на серологические группы (серогруппы) по общности строения О-антигена; внутри серогруппы - на серовары в соответствии с различиями в строении Н-антигена.

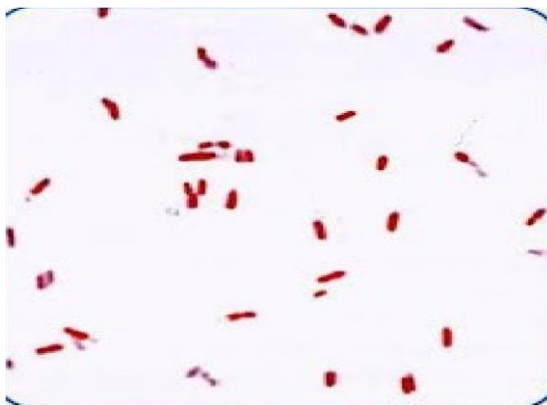


Рисунок 116 - *S. Typhi*, чистая культура, окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 117 - Пили и жгутики сальмонелл при электронной микроскопии. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Микрокапсула

Рисунок 118 - Микрокапсула сальмонелл, компьютерное изображение
Займствовано из Интернет-ресурсов

Бактериологическое исследование при брюшном тифе и паратифах.

С учетом развития инфекционного процесса при брюшном тифе и паратифах возбудитель выделяют:

- на 1-й неделе и в течение всего лихорадочного периода - из крови (гемокультура);
- с конца 2-3-й недели - из испражнений (копрокультура);
- с конца 2-й недели - из мочи (уринокультура);
- из желчи (биликультура) - начиная с 2-й недели заболевания, в течение всего периода заболевания и у бактерионосителей.

На среде Эндо (рисунок 119) и Плоскирева (рисунок 120) колонии сальмонелл, в отличие от колоний кишечных палочек, бесцветны (не сбраживают лактозу), на висмут-сульфит-агаре – черные, т.к. сальмонеллы, в отличие от эшерихий, образуют сероводород из входящего в состав среды сульфата железа. Сероводород вызывает почернение индикатора – бесцветного сульфита висмута вследствие перехода его в сульфид висмута черного цвета. Поэтому бактерии, образующие сероводород, формируют черные, иногда с темно-зеленым оттенком колонии, и среда под ними тоже окрашивается в черный цвет (рисунок 121). Бактерии, не образующие сероводород, растут в виде бесцветных зеленоватых колоний.

Избирательная среда для посева крови и выделения гемокультуры желчный бульон. Соотношение крови и питательной среды – 1:10. Кровь для посева следует брать в начале озноба при подъеме температуры тела в объеме 5-10 мл из локтевой вены, и сразу же у постели больного засеять кровь в 50-100 мл желчного бульона.

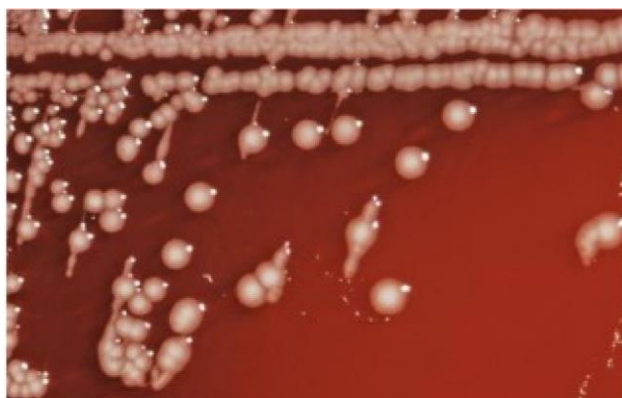


Рисунок 119 - Колонии сальмонелл на среде Эндо
Займствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 121 - Рост сальмонелл на среде Плоскирева
Займствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 122 - Колонии сальмонелл на висмут-сульфит агаре
Займствовано из Интернет-ресурсов

Возбудители брюшного тифа и паратифов имеют О- и Н-антигены. *S. Typhi*, помимо них, имеет поверхностный антиген вирулентности (Vi-антиген); он обнаруживается у свежесделанных культур, но легко утрачивается под

влиянием различных факторов, при длительном хранении культур и разрушается при 100°С в течение 10 мин.

Серологический метод.

Классическим методом серодиагностики сальмонеллезов и тифопаратифозных инфекций является развернутая реакция агглютинации (реакция Видаля).

Предложена в 1896 французским врачом Ф. Видалем (F. Widal, 1862—1929). Основана на способности антител (агглютининов), образующихся в организме в течение болезни и длительно сохраняющихся после выздоровления, вызывать склеивание брюшнотифозных микроорганизмов. Вначале появляются антитела к О-антигену, но их титр быстро уменьшается после выздоровления. Н- и Vi-антитела появляются позже, но в течение нескольких лет сохраняются в высоких титрах после болезни, после вакцинации и у бактерионосителей.

Реакция Видаля ставится с 7-9 дня заболевания одновременно с тремя культурами: брюшного тифа, паратифа А и паратифа В. Обычно применяются убитые культуры—диагностикумы (таблица 10). Реакцию повторяют на 3-4-й неделе болезни для определения нарастания титра АТ (от 1 : 200 до 1 : 400 -1 : 1600).

Таблица 10 – Нарастание титра антител к антигенам сальмонелл брюшного тифа в реакции Видаля при исследовании парных сывороток

Диагностикумы из сальмонелл	Первичное исследование		Повторное исследование					
	Разведения сыворотки							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
Брюшной тиф О	+	+			+	+	+	+
Брюшной тиф Н	+				+	+		
Паратиф А О	+				+			
Паратиф А Н	+				+			
Паратиф В О	+				+			
Паратиф В Н	+				+			

В отношении оценки результатов реакции Видаля необходимо отметить следующее: иногда получается положительная реакция до одинакового титра с несколькими видами бактерий — групповая агглютинация. В таких случаях следует ставить реакцию с дальнейшими разведениями сывороток.

Реакция Видаля может быть положительной у лиц, получивших прививки против брюшного тифа («прививочная» реакция) или переболевших брюшным тифом и паратифами («anamnestическая» реакция). В таком случае следует поставить реакцию Видаля повторно через 7-10 дней. У переболевших и вакцинированных нарастания титра АТ не произойдет. Нарастание титра АТ наблюдается только во время текущего заболевания («инфекционная» реакция).

Ход выполнения работы

Материал для исследования: сыворотка крови.

Метод исследования: серологический (реакция агглютинации Видаля).

Подготовка: кровь из вены допускается сдавать после 4-х часового периода голодания (можно пить воду) в стерильную пробирку без консерванта в количестве 5 мл. Накануне и в день сдачи крови следует исключить интенсивную физическую нагрузку, прием алкоголя, курение. Полученную сыворотку крови можно хранить до исследования не более 7 суток при температуре +2- +8°C или 3 месяца при температуре -20°C.

Описание: Количественное определение уровня антител к возбудителю брюшного тифа и паратифов.

Для постановки реакции агглютинации Видаля необходимо три компонента:

- 1) антитела (сыворотка больного);
- 2) антиген (сальмонеллезные монодиагностикумы O₉, O₂, O₄ и Hd); 3) 0,85% раствор хлорида натрия.

Из сыворотки крови готовят 4 ряда разведений от 1:100 до 1:1600 следующим образом: во все пробирки разливают по 1 мл физиологического раствора; затем этой же пипеткой наливают 1 мл сыворотки разведенной 1:50 в первую пробирку, перемешивают с физиологическим раствором, таким образом получают разведение 1:100, из этой пробирки переносят 1 мл сыворотки в следующую пробирку, перемешивают с физиологическим раствором, получают разведение 1:200. Аналогичным образом получают разведения 1:400, 1:800 и 1:1600 в каждом из четырех рядов.

Реакция агглютинации Видаля ведётся в объеме 1 мл жидкости, поэтому из последней пробирки после смешения жидкости удаляют 1 мл. В отдельную контрольную пробирку наливают 1 мл физиологического раствора без сыворотки. Этот контроль ставится для проверки возможности спонтанной агглютинации антигена (диагностикума). Во все пробирки каждого ряда закапывают по 2 капли диагностикума. В реакции используются сальмонеллезные O- и H-монодиагностикумы. Для разрушения H-антигена сальмонеллы убивают кипячением и получают O-монодиагностикум, а для разрушения O-антигена сальмонеллы обрабатывают формалином и получают H-монодиагностикум.

Штатив с пробирками энергично встряхивают и помещают на 2 часа в термостат, после чего проводят предварительный учет результатов реакции. Окончательный учет производят через 18-20 часов выдерживания пробирок при комнатной температуре. При положительной реакции образуется белый осадок на дне пробирки, жидкость над осадком становится прозрачной. Оагглютинация выглядит мелкозернистой, а H-агглютинация - крупнозернистой.

При отрицательной реакции жидкость остается мутной, осадок на дне пробирки отсутствует. Агглютинация считается специфической, когда в контрольных пробирках осадка не образуется. Титр реакции Видаля – это наибольшее разведение исследуемой сыворотки, в котором еще отмечается агглютинация.

Диагностическим титром при типичной клинической картине брюшного тифа считается разведение 1:100 и выше, при атипичных или стертых формах заболевания - не ниже 1:200. В сыворотках больных могут быть как специфические, так и групповые антитела, которые различаются по высоте

титра. Специфическая реакция агглютинации идёт обычно до более высокого титра.

Схема постановки реакции Видаля.

Ингредиенты	Разведения сыворотки					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	КД
Стерильный физиологический раствор (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Сыворотка крови больного 1:50, (мл)	→	→	→	→	→	
Диагностикум (капли)	2	2	2	2	2	2

1,0 ↓

ПРОТОКОЛ №4

Реакция Видаля для серологической диагностики брюшного тифа.

Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1. Сыворотка крови больного	<ol style="list-style-type: none"> Оформить направление для серологического исследования. По демонстрации учесть результат развернутой реакции агглютинации с диагностикумами O₉, O₂, O₄, и Hd. Зарисовать Оформить заключение с обоснованием серологического диагноза. Выписать результат исследования на бланке. 	

Материалы и оборудование: сыворотка больного, стерильный физиологический раствор, монодиагностикумы O₉, O₂, O₄, Hd, пробирки, штатив, пипетки на 1 мл.

Литература:

- Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 181-191.
- Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 203-207.
- Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.195-198.

2.5. Лабораторная работа №5

Тема: Бактериологическое исследование при подозрении на холеру Цель:

освоение бактериологического исследования при подозрении на холеру.

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики холеры.

Студент должен уметь:

1. Провести посев рвотных масс больного на 1% пептонную воду;

2. Описать рост бактерий на 1% пептонной воде;

3. Провести оценку результатов микроскопии окрашенных мазков бактерий *Vibrio cholerae*;

3. Провести пересев с жидкой питательной среды на щелочной агар;

4. Описать выросшие колонии на щелочном агаре;

5. Определить подвижность бактерий методом «раздавленная капля»;

6. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с холерными О-1, О-139, ОН-сыворотками;

8. Выписать направление и результат бактериологического исследования.

Основные теоретические положения

Холера – особо-опасное антропонозное инфекционное заболевание, протекающее по типу гастроэнтерита с интоксикацией и нарушением водноэлектролитного обмена, приводящим к резкому обезвоживанию организма. Холера относится к карантинным инфекциям. Для холеры характерны фекально-оральный механизм заражения, поражение тонкого кишечника, выраженная склонность к широкому эпидемическому распространению, тяжелое течение с водянистой диареей и рвотой, развитие различной степени обезвоживания организма, высокая летальность.

Возбудитель холеры *Vibrio cholerae* относится к роду *Vibrio* семейству *Vibrionaceae*. Род *Vibrio* насчитывает 55 видов, из которых наибольшее значение для человека имеют *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* и *V. fluvialis*. Эти виды вибрионов вызывают у человека различные по клиническим признакам заболевания (холеру, гастроэнтериты, отиты, раневую инфекцию, менингит).

Возбудитель холеры - *Vibrio cholerae* - грамотрицательная мелкая изогнутая палочка. Спор и капсул не образует, имеет один жгутик (монотрих), придающий микроорганизму подвижность (рисунок 121).

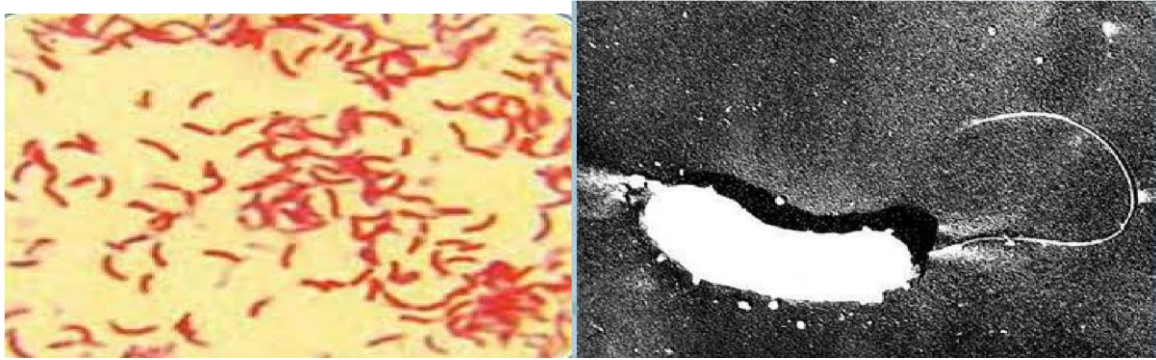


Рисунок 121 - Холерные вибрионы. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Факультативный анаэроб, с преимущественным аэробным способом культивирования, растет на средах с низким содержанием питательных веществ (например, 1% пептонной воде) и щелочной реакции (рН 8-9). В щелочной пептонной воде (рН 8,6-9,0), содержащей 0,5-1,0% натрия хлорида, холерный вибрион уже через 6-8 часов вызывает легкое помутнение и образование нежной голубоватой плёнки на поверхности среды, края пленки приподняты вдоль стенок пробирки, при встряхивании пленка легко разрушается и оседает на дно пробирки.



а – контроль, б – опыт

Рисунок 122 - Рост холерного вибриона в щелочной пептонной воде
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Колонии на плотной среде TCBS (среда содержит тиосульфат натрия, цитрат, желчь и сахарозу) образуются через 18-24 ч, и они желтого цвета, т.к. холерный вибрион ферментирует сахарозу. Ферментативная активность высокая (рисунок 123).

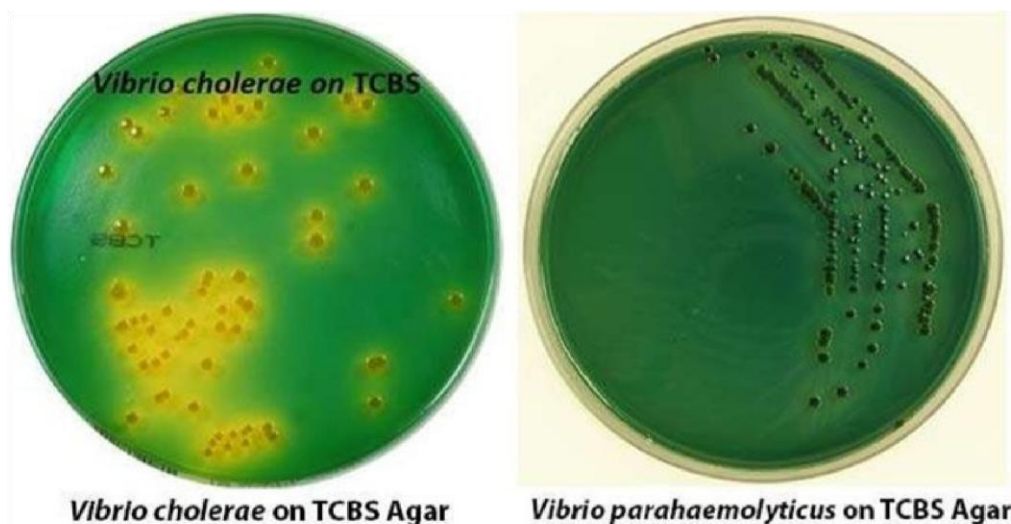


Рисунок 123 - Колонии на TCBS-агаре. Слева - желтые колонии холерного вибриона, справа – колонии парагемолитического вибриона, не ферментирующего сахарозу. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На щелочном агаре через 10-12 час образует круглые, прозрачные, голубоватые колонии, обладающие слабой опалесценцией (рисунок 124).



Рисунок 124 - Колонии холерного вибриона на щелочном агаре
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Антигенная структура *Vibrio cholerae* сложная. Н-антиген - общий для всего рода *Vibrio*, по О-антигену микроорганизмы разделяют на серогруппы. Возбудители холеры - представители групп О1 и О139.

По биологическим свойствам *Vibrio cholerae* разделяют на два биовара – *El-Tor* и *classic*. В серогруппу О1 входят два варианта – *El-Tor* и *classic*, в серогруппу О139 входит вариант *Bengal*, являющийся генетическим дериватом варианта *El-Tor*, с измененной антигенной структурой, по фенотипу близкий к *El-Tor*. В серогруппе О1 выделяют три серовара в зависимости от сочетания А-, В- и С-субъединиц: Огава (АВ), Инаба (АС) и Гикошима (АВС).

Факторы патогенности холерных вибрионов - холерный энтеротоксин, нейраминидаза и гемагглютининпротеаза. Холерный энтеротоксин нарушает водно-солевой обмен, при этом происходит гиперсекреция воды и хлоридов в

просвет кишечника, что вызывает обезвоживание организма за счет диареи и рвоты.

Ход выполнения работы

1 этап. Материалы для исследования - испражнения, рвотные массы, пищевые продукты, вода.

Материал для исследования собирают и доставляют в лабораторию с соблюдением особых предосторожностей. Посуда не должна содержать следов дезинфицирующих веществ, так как холерные вибрионы очень чувствительны к ним. Банки, пробирки должны быть закрыты стеклянными или резиновыми пробками. Также для взятия материала использую стерильные вакутейнеры. После взятия материала пробку заливают парафином или сургучом, обвязывают двойной вощеной бумагой, наклеивают этикетку с указанием фамилии больного, характера материала и времени его взятия, предположительного диагноза и фамилии лица, направляющего пробы. Материал отправляют специальным транспортом в лабораторию особоопасных инфекций.

Время от взятия материала до проведения посевов не должно превышать 3 ч. Лучше материал сразу брать в 1 % пептонную воду, являющуюся средой накопления.

В первый день исследования материал вносят в колбу с 50 мл 1% пептонной щелочной воды.

2 этап. Изучение роста на жидкой среде. В щелочной пептонной воде холерный вибрион уже через 6-8 часов вызывает легкое помутнение и образование нежной голубоватой плёнки на поверхности среды. Из пленки готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают наличие вибрионов. Затем делают пересев на щелочной агар.

3 этап исследования. Отмечают появление на щелочном агаре прозрачных голубоватых колоний. Проводят описание колоний по схеме. Делают мазок, окраску по Граму, определяют подвижность методом «раздавленная капля». С подозрительными на холерные вибрионы колониями ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с холерными O1- O139- и ОН-сыворотками.

Наличие грамтрицательных вибрионов, агглютинирующихся Осывороткой, позволяет предположить возбудитель заболевания.

Оформление заключения в протоколе и ответа из баклаборатории особоопасных инфекций (по форме 30).

ПРОТОКОЛ №5

Бактериологическое исследование при холере

Этап	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
------	---------------------------	------------------	-----------

1	Рвотные массы	1. Оформить направление на исследование. 2. Посев в 1% пептонную воду и на щелочной агар.	
2	Рост на 1% пептонной воде.	1. Изучение, описание роста на жидкой среде. Пересев на плотную среду (щелочной агар) 2. Мазок, окраска по Граму, бактериоскопия.	
3	Рост на щелочном агаре	1. Описание колоний. 2. Мазок, окраска по Граму, бактериоскопия. 3. Определение подвижности методом «раздавленная капля». 4. Ориентировочная реакция агглютинации на стекле с холерными O1, O139, ОН-сыворотками. 5. Зарисовать. 6. Оформление заключения в протоколе и ответа из баклаборатории.	

Материалы и оборудование: рвотные массы в вакутейнере, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, чашки Петри с щелочным агаром, пробирка с 1% пептонной водой, термостат, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, наборы красителей по Граму, покровное стекло, предметное стекло с лункой.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 194-199.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 212-215.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С188-192.

2.6. Лабораторная работа №6

Тема: **Реакция агглютинации для серологической диагностики коклюша**

Цель: освоение реакции агглютинации для серологической диагностики коклюша

Студент должен знать

1. Методы микробиологической диагностики коклюша

Студент должен уметь

1. Выписать направление и оформить результат серологического исследования.
2. Интерпретировать результат реакции агглютинации для диагностики коклюша.

Основные теоретические положения

Коклюш (лат. *Pertussis* – конвульсивный кашель, франц. *coqueluche* – петушиный крик) – острое инфекционное заболевание дыхательных путей, сопровождающееся воспалением гортани, трахеи и бронхов и развитием приступов спазматического кашля.

Возбудитель коклюша был обнаружен в 1900 году в мазках, приготовленных из мокроты больных, а выделен в чистой культуре в 1906 году бельгийскими бактериологами Ж. Борде и О. Жангу.



Рисунок 125 - Жюль Борде (Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet, 1870-1961 гг.). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Возбудитель паракоклюша был выделен и изучен в 1937 г. Г.

Эльдерингом и П. Кендриком.

Коклюш может быть вызван тремя возбудителями – *B. pertussis*, *B. parapertussis* и в единичных случаях *B. bronchiseptica*. Микроорганизмы относят к роду *Bordetella*, семейству *Halobacterium*. Все они грамотрицательные мелкие овоидные палочки (коккобактерии), располагаются поодиночке или группами, имеют нежную капсулу, пили.



Рисунок 126 - Октав Жангу (Octave Gengou, 1875-1957гг.)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Бордетеллы - неподвижные (*B. Pertussis* (рисунок 127) и *B. parapertussis*) или подвижные (*B. bronchiseptica*) бактерии.



Рисунок 127 - *Bordetella pertussis*, чистая культура (по Граму)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Бордетеллы на простых питательных средах не культивируются. Для роста им необходимы три аминокислоты - пролин, цистеин, глутаминовая кислота. Бордетеллы растут на картофельно-глицериновом агаре с добавлением крови среде Борде-Жангу (рисунок 128), кровяном агаре (рисунок 129) и на полусинтетическом казеиново-угольном агаре (рисунок 130).



Рисунок 128 - Рост бордетелл на среде Борде-Жангу
Заимствовано из Интернет-ресурсов

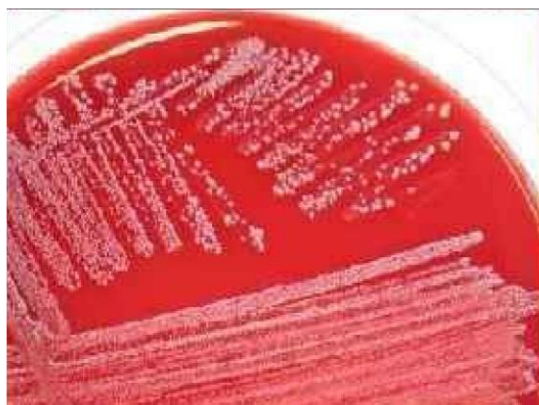


Рисунок 129 - Рост *B. pertussis* на кровяном агаре
Заимствовано из Интернет-ресурсов

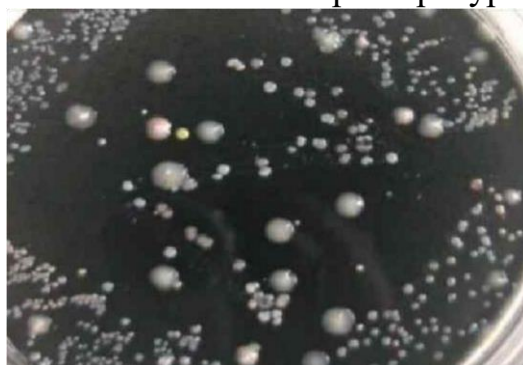


Рисунок 130 - Рост бордетелл на казеиново-угольном агаре (КУА)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Колонии коклюшных бактерий мелкие, круглые, с ровными краями, блестящие, напоминающие капельки ртути или жемчуг, вырастают на 3-4-й день. Свежевыделенные культуры образуют S-форму колоний (1-я фаза), при дальнейшем культивировании могут образовывать R-формы (2-я фаза).

Колонии паракоклюшных бактерий крупнее и выявляются на 1-2-й день. Оптимальная температура роста - 35-36 °С. На кровяных средах образуют зону гемолиза.

Лабораторную диагностику коклюша и паракоклюша осуществляют двумя методами:

- *бактериологическим*, при котором выделяют возбудителя из слизи с задней стенки глотки;
- *серологическим*, при котором определяют специфические антитела в сыворотке больного или переболевшего.

Бактериологическая диагностика

Взятие материала. Материал для исследования - слизь из верхних дыхательных путей. Взятие материала проводят двумя способами:

- заднеглоточным тампоном; • «кашлевыми пластинками».

Материал, взятый сухим тампоном, засевают немедленно на питательную среду, а при взятии увлажненным тампоном материал доставляют для посева в лабораторию, но не позднее 2-4 ч после его взятия. Сбор материала методом

«кашлевых пластинок» проводят на две чашки с питательной средой (КУА). Во время приступа кашля левой рукой снимают крышку чашки, а правой подносят ее ко рту на расстояние 10-12 см так, чтобы капельки слизи из дыхательных путей попали на поверхность среды. Чашку в таком положении держат в течение 6-8 кашлевых толчков, затем закрывают крышкой и доставляют в лабораторию при температуре 37 °С. При посеве материала с диагностической целью рекомендуют использовать 2 чашки со средой КУА, а по эпидемическим показаниям - 1 чашку.

Серологическая диагностика

Серологическая диагностика коклюша и паракоклюша заключается в обнаружении в исследуемой сыворотке специфических антител. Исследования проводят на 2-3-й неделе заболевания, когда в крови больных появляются специфические антитела. В связи с широкой иммунизацией против коклюша результаты серологических реакций могут иметь диагностическое значение только при изучении их в динамике, исследуя парные сыворотки больного не менее 2-3 раз с интервалом 1-2 нед. Серологические реакции следует ставить параллельно с коклюшным и паракоклюшным диагностикумами.

При этом у неиммунизированных лиц наблюдается сероконверсия (повышение титра антител в 2-4 раза), а у вакцинированных лиц сероконверсия не выявляется, так как к моменту исследования возникает вторичный иммунный ответ. Серологические исследования необходимо проводить в динамике со 2-3 недели болезни с интервалом 1-2 недели.

Наиболее распространенным методом серологической диагностики коклюша является **реакция агглютинации**. Для установления серологического диагноза коклюша и паракоклюша в реакции агглютинации используют диагностикумы, представляющие собой гомогенную взвесь обезвреженных формалином коклюшных (20 млрд в 1мл) или паракоклюшных (35млрд в 1мл) микробов. Диагностикумы позволяют выявлять антитела в сыворотке крови больных людей, переболевших или вакцинированных лиц.

Ход выполнения работы

Из исследуемой сыворотки готовят 9-10 последующих разведений: 1:5, 1:10 и так далее до 1:1280 или 1:2560. В 10-ю (или 11-ю) пробирку вместо сыворотки наливают 0,25 мл физиологического раствора (контроль). Реакцию агглютинации ставят в объеме 0,5 мл: к 0,25 мл соответствующего разведения сыворотки добавляют 0,25 мл диагностикума. Пробирки помещают в термостат при температуре 37°С на 2 ч и оставляют затем при комнатной температуре. Результаты учитывают на следующий день с помощью агглютиноскопа. Конечным титром считают разведение, при котором отмечают четкую агглютинацию на два креста (2+), однако реакцию учитывают как положительную лишь при наличии в предыдущих пробирках четкой агглютинации на четыре или три креста (4+ или 3+).

Диагностическим титром реакции агглютинации у непривитых и не болевших детей считают разведение 1:80. У иммунизированных детей и

взрослых положительные результаты реакции учитывают только при исследовании парных сывороток крови, взятых с интервалом 1-2 нед при нарастании титра не менее чем в 4 раза.

Схема постановки развернутой реакции агглютинации

Ингредиенты	Разведения сыворотки										КД
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280		
Стерильный - 0,25 0,25 0,25 0,25 0,25 0,25 0,25 0,25 0,25 физиологический раствор (мл)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Исследуемая сыворотка (мл) 1:5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Диагностикум (мл) коклюшный	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
										0,25	

ВАЖНО! Реакция ставится параллельно с коклюшным и паракоклюшным диагностикумом.

ПРОТОКОЛ №6

Реакция агглютинации для серологической диагностики при коклюше

День	Материал для исслед.	Ход исследования	Результат
1.	Сыворотка больного	1. Выписать направление для исследования. 2. Поставить РА по схеме, представленной в описании хода работы. 3. Поместить пробирки в термостат при 37°C на 2 ч.	
		4. Учесть полученный результат. 5. Зарисовать. 6. Сделать заключение и обосновать серологический диагноз заболевания. 7. Выписать результат исследования на бланке.	

Материалы и оборудование: сыворотка больного, изотонический раствор натрия хлорида, коклюшный и паракоклюшный диагностикум, пробирки, штатив, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 182-186.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С. 160-163.

2.7. Лабораторная работа №7

Тема: **Микроскопическая диагностика туберкулеза легких**

Цель: освоение микроскопических методов диагностики туберкулеза

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики туберкулеза. **Студент должен уметь:**

1. Применять микроскопический метод диагностики туберкулеза.
2. Выписать направление и оформить результат микроскопического исследования при туберкулезе легких.

Основные теоретические положения

Туберкулез – это первично хроническое инфекционное заболевание человека, сопровождающееся образованием в различных органах специфических гранулем (лат. *granulum* – зернышко), представляющих собой воспалительную реакцию в виде узелков или бугорков (лат. *tuberculum* – бугорок) с последующим их творожистым распадом и обызвествлением.

В 1882 г. немецкий бактериолог Р. Кох после 17 лет исследований впервые обнаружил возбудителя туберкулеза при микроскопическом исследовании мокроты больного человека. При этом Р. Кох применил окраску препарата везувином и метиленовым синим. Возбудителя назвали бациллой (палочкой) Коха. 24 марта 1882 г. Р. Кох сообщил о том, что ему удалось выделить бактерию, вызывающую туберкулез. В связи с этим ВОЗ объявила 24 марта **Всемирным днем борьбы с туберкулезом**. Позднее Р. Кох получил чистую культуру возбудителя на сывороточной среде.

В 1890 г. Р. Кох получил туберкулин – “водно-глицериновую вытяжку туберкулезных культур”. Он предполагал использовать туберкулин для диагностики, профилактики и даже лечения туберкулеза. Однако в дальнейшем была установлена высокая эффективность туберкулина только в диагностике заболевания. В 1905 г. Р. Кох за исследования возбудителя туберкулеза был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

В 1882-1884 гг. немецкие ученые Франц Циля и Ф. Нельсен предложили метод окраски кислотоустойчивых бактерий карболовым фуксином при нагревании в пламени горелки (метод термокислотного протравливания). Метод Циля-Нельсена до сих пор используется в диагностике туберкулеза. Клеточная стенка микобактерий содержит липиды, миколовые кислоты, поэтому

микобактерии плохо воспринимают анилиновые красители и выявляются по методу Циля-Нельсена.

В 1907 г. австрийский педиатр К. Пирке предложил накожную пробу с туберкулином для выявления людей, инфицированных микобактериями туберкулеза (рисунок 131).



Рисунок 131 - Клеменс фон Пирке (Clemens Peter Freiherr von Pirquet, 1874-1929 гг.). Заимствовано из Интернет-ресурсов

В 1910 г. французский исследователь Шарль Манту и немецкий исследователь Феликс Мендель предложили внутрикожный метод введения туберкулина, который оказался чувствительнее накожного.

В 1919 г. французские исследователи микробиолог А. Кальметт и ветеринарный врач К. Герен получили вакцинный штамм микобактерий туберкулеза (бациллы Кальметта-Герена, BCG – *Bacilles Calmette-Guerin* или БЦЖ). Этот штамм они селекционировали в результате 230 пересевов в течение 13 лет возбудителя туберкулеза бычьего типа на картофельно-глицериновой среде с добавлением желчи.

Возбудителей туберкулеза относят к семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*. Вызывающие у человека туберкулез микобактерии объединены в комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (рисунок 132), включающий:

- *M. tuberculosis* - человеческий вид;
- *M. bovis* - бычий вид;
- *M. africanum* - промежуточный вид.

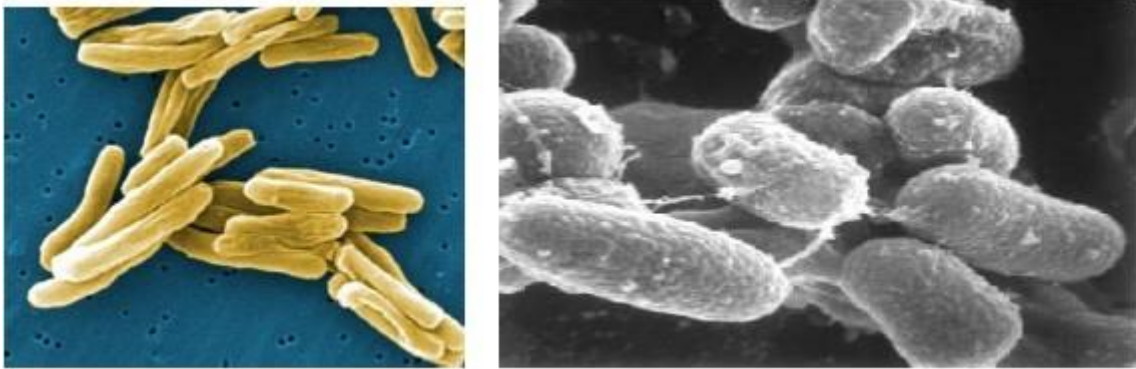


Рисунок 132 - Микобактерии туберкулеза. а – компьютерное изображение, б – снимок, сделанный с помощью сканирующего микроскопа
Займствовано из Интернет-ресурсов

Возбудители туберкулеза полиморфны, могут иметь вид тонких, длинных, немного изогнутых (*Mycobacterium tuberculosis*) или толстых коротких (*M. bovis*) палочек. Грамположительны, спор не образуют, неподвижны, кислото-, спирто- и щелочеустойчивы.

Иногда они образуют нитевидные структуры, напоминающие мицелий грибов, что и послужило основанием для их названия: *mykes* - гриб и *bacterium* – бактерия.

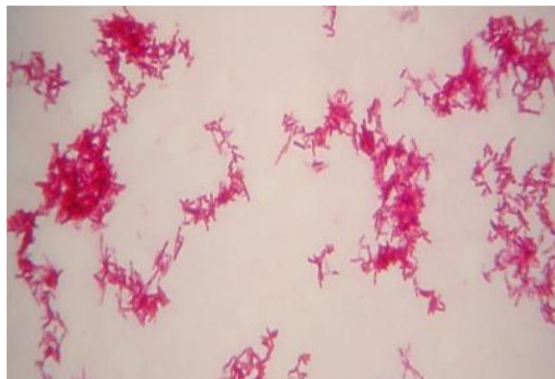


Рисунок 133 - Образование микобактериями нитевидных структур, напоминающих мицелий грибов. Займствовано из Интернет-ресурсов
Микобактерии неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу.

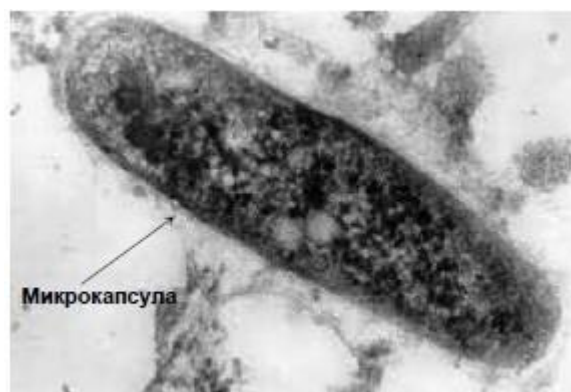


Рисунок 135 - Микрокапсула микобактерий. Займствовано из Интернетресурсов

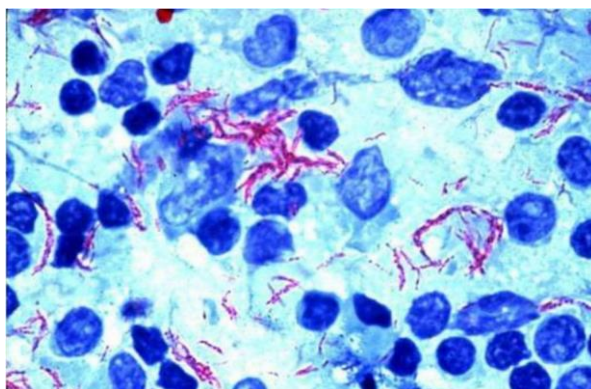


Рисунок 136 - *M. tuberculosis* в мокроте (окраска по Цилю-Нельсену)
Займствовано из Интернет-ресурсов

Микобактерии могут образовывать L-формы, имеющие сниженный уровень метаболизма, ослабленную вирулентность и длительное время персистирования в организме.

Микобактерии - облигатные аэробы. Для их роста необходимы питательные среды, содержащие глицерин, лецитин, витамины, аминокислоты. Применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена (рисунок 137), Финна II и синтетическую среду Сотона. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры к средам добавляют краситель малахитовый зеленый и антибиотики, не действующие на микобактерии. Оптимальная температура культивирования - 37-38°C; pH - 6,8-7,2.



Рисунок 137 - Рост *M. bovis* на твердой питательной среде Левенштейна-Йенсена. Займствовано из Интернет-ресурсов

На плотных средах рост отмечается на 15-20-е сутки в виде светлокремового, белого или бледно-желтого чешуйчатого налета с неровными краями (R-форма колоний), который по мере роста принимает бородавчатый вид, напоминая цветную капусту.

Наиболее часто для выращивания микобактерий используют плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена и Финна-2. Эти среды рекомендованы ВОЗ в качестве стандартных при диагностике туберкулеза. На таких средах на 15-40 день культивирования микобактерии туберкулеза образуют неправильной

формы шероховатые плотные крошковатые колонии кремового цвета (цвет “слоновой кости”) бородавчатого вида, напоминающие кочаны цветной капусты (рисунок 138).

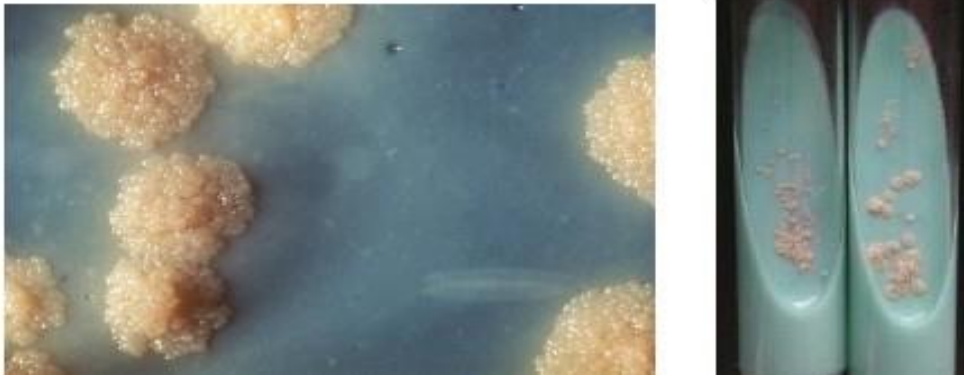


Рисунок 138 - Рост *M. tuberculosis* на твердой питательной среде Левенштейна-Йенсена, бородавчатый вид. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На жидких средах через 5-7 дней образуется толстая, сухая, бугристоморщинистая пленка кремового цвета (рисунок 139). Микобактерии способны к культивированию на стекле в жидкой питательной среде (метод микрокультур Прайса).

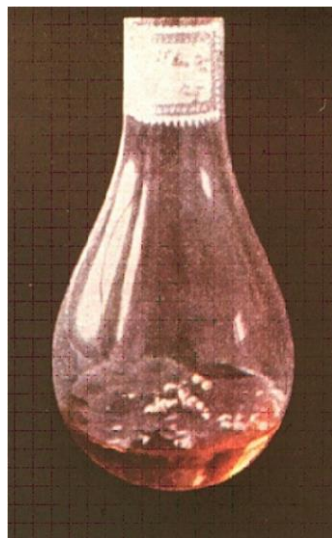


Рисунок 139 - Рост *M. tuberculosis* на жидкой питательной среде
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Микобактерии способны к культивированию на стекле в жидкой питательной среде (метод микрокультур Прайса). Через 48-72 ч у вирулентных штаммов выявляется корд-фактор (от англ. *cord* - «жгут, веревка»), благодаря которому микобактерии склеиваются и растут в виде кос или жгутов. Кордфактор - гликолипид, который относят к факторам патогенности микобактерий (рисунок 140).



Рисунок 140 - Корд-фактор, выявляемый при культивировании по методу Прайса. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Чаще всего поражаются органы дыхания, но возможно поражение и других органов. Поэтому различают туберкулез легких и внелёгочный туберкулез.

Для лабораторной диагностики туберкулеза применяют основные и дополнительные методы исследования.

Основными методами являются:

- бактериоскопический метод (световая и люминесцентная микроскопия);
- бактериологический метод.

Дополнительными методами являются:

- биологический метод;
- серологический метод;
- кожные аллергические пробы;
- полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Исследуемым материалом в зависимости от локализации патологического процесса служат мокрота, аспират бронхов, отделяемое свищей, ликвор, моча, испражнения.

Ход выполнения работы

1. Оформить направление в бактериологическую лабораторию.

Материал для исследования: мокрота.

2. Сделать мазок и окрасить по методу Циля-Нельсена. При небольшом содержании микобактерий в материале применяют методы «обогащения» гомогенизации и осаждения.

Окраска по Цилю-Нильсену:

1. На высушенный и фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают карболовый раствор фуксина Циля и, удерживая стекло пинцетом, подогревают над пламенем спиртовки (но не в пламени) до появления паров. При подсыхании красителя вследствие его

испарения осторожно доливают карболовый фуксин на полоску фильтровальной бумаги.

Манипуляцию повторяют 2-3 раза, каждый раз отставляя стекло в сторону для охлаждения (наблюдать за появлением паров удобнее, глядя на мазок сбоку);

2. Бумагу снять, мазок охладить и промыть водой;

3. Обесцветить 5 % серной кислотой, наливая кислоту на препарат на 1-2 мин до полного обесцвечивания; 4. Тщательно промыть водой;

5. Окрасить леффлеровской синькой (3-5 мин);

6. Промыть водой и высушить.

Кислотоустойчивые бактерии в результате такой окраски становятся рубиновокрасными, а остальные - синими.

ПРОТОКОЛ №7

Микроскопический метод диагностики туберкулеза легких

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Мокрота больного туберкулезом	1. Оформить направление в бак.лабораторию. 2. Приготовить мазок, окрасить по Цилю-Нельсену. 3. Микроскопировать. 4. Зарисовать. 5. Оформление заключения в протоколе. 6. Выписать результат исследования на бланке.	

Материалы и оборудование: спиртовка; бактериологическая петля; штатив для пробирок; готовый фиксированный микропрепарат, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу (стеклограф); дезинфицирующий раствор; биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло; реактивы для окраски по Цилю – Нельсену.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 164-168.

2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 186-190.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С. 164-169

2.8. Лабораторная работа №8

Тема: **Микроскопическая диагностика дифтерии**

Цель: освоение микроскопического метода диагностики дифтерии.

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики дифтерии.
 2. Методику взятия мазка из зева для исследования на дифтерию;
- Студент должен уметь:**

1. Применять микроскопический метод диагностики дифтерии.
2. Выписать направление и оформить результат микроскопической диагностики дифтерии.

Основные теоретические положения

Дифтерия - это острое инфекционное заболевание, характеризующееся общей интоксикацией организма и образованием в месте входных ворот инфекции пленчатых налетов беловато-серого цвета. Название заболевания происходит от греч. *diphthera* - пленка, перепонка, кожа. Образование плотной пленки, спаянной с подлежащими тканями, характерно для этого заболевания. Дифтерия относится к **антропонозным** инфекциям.

Возбудителей дифтерии относят к семейству *Corynebacteriaceae*, к роду *Corynebacterium*, виду *C. diphtheriae*. Это прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные палочки с булавовидными концами за счет наличия зерен волютина. Спор и капсул не образуют, неподвижны, но имеет микрокапсулу с входящим в ее состав корд-фактором. Возбудители дифтерии - факультативные анаэробы, культивируются при температуре 37 °С.

Возбудитель дифтерии был обнаружен в 1883 г. немецким бактериологом Э. Клебсом в срезах пленок, взятых из зева больного.

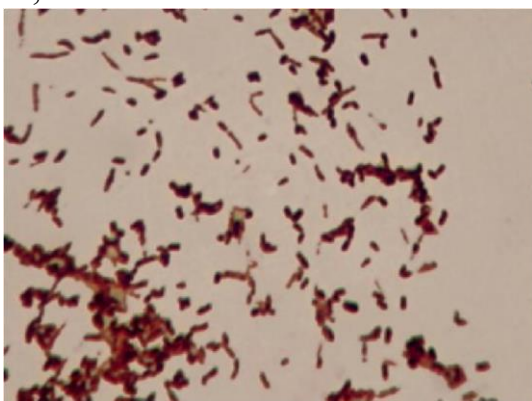


Рисунок 140 - *Corynebacterium diphtheriae*, чистая культура (по Нейссеру)
Займствовано из Интернет-ресурсов

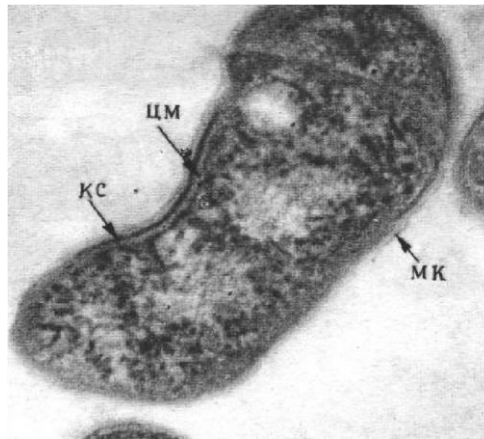


Рисунок 141 - Клетки *C. diphtheriae*, электронная микроскопия ЦМ – цитоплазматическая мембрана, КС – клеточная стенка, МК – микрокапсула
Займствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 142 - Эдвин Клебс (Edwin Klebs, 1834-1913 гг.)
Займствовано из Интернет-ресурсов

В 1884 г. немецкий бактериолог Ф. Лёффлер получил чистую культуру возбудителя дифтерии. С тех пор возбудитель стали называть палочкой Клебса-Лёффлера.

Типичными патогенными для человека коринебактериями являются *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*. Они вызывают у человека дифтерию и дифтериеподобные заболевания.

Лабораторную диагностику проводят микроскопическим, бактериологическим, серологическим методами и ПЦР.

На кровяном агаре формируются колонии средней величины, выпуклые, серовато-белого цвета. Наиболее характерные колонии вырастают на среде Клауберга II с добавлением 0,04 % теллурита калия или натрия (элективная среда для выращивания *C. diphtheriae*). Они восстанавливают теллурит калия в металлический теллур, чем и объясняется серо-черный цвет колоний, выросших на таких средах (рисунок 143).

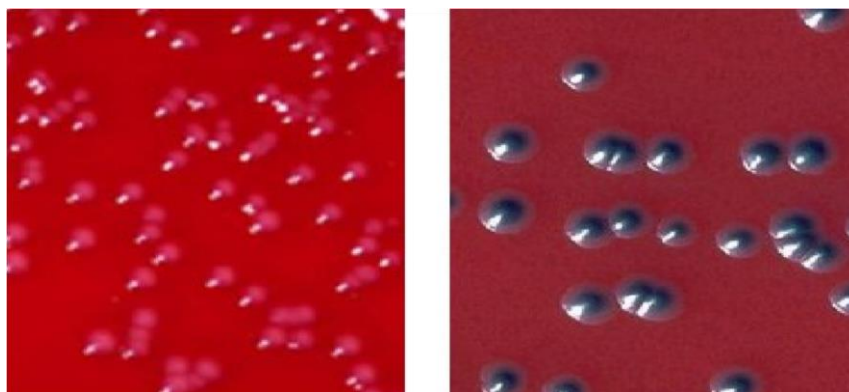


Рисунок 143 - Характер роста *Corynebacterium diphtheriae* на кровяном агаре (слева) и на кровяном теллуритовом агаре (среда Клауберга II) (справа) Заимствовано из Интернет-ресурсов

По морфологии колоний, выросших на кровяно-теллуритовых средах, морфологии палочек в мазках, отношению к ферментации крахмала и редукции нитратов *C. diphtheriae* делят на четыре культурально-биохимических варианта: *gravis*, *mitis*, *intermedius*, *belfanti*.

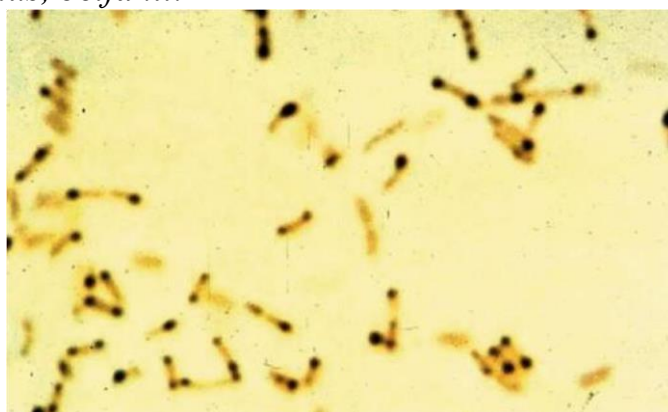


Рисунок 144 - Выявление зерен волютина у коринебактерий дифтерии (окраска по Нейссеру). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимическая активность. Возбудитель дифтерии обладает высокой ферментативной активностью. Все штаммы *C. diphtheriae* ферментируют глюкозу, мальтозу, галактозу с образованием кислоты и не разлагают сахарозу, лактозу и маннит (рисунок 145).



Рисунок 145 - Ферментация углеводов *C. Diphtheriae*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Лечение дифтерии проводится в стационаре. Для нейтрализации токсина используют специфическую **противодифтерийную лошадиную очищенную**

концентрированную жидкую сыворотку (антитоксин). Препарат получают путем многократной иммунизации лошадей дифтерийным анатоксином. Сыворотку вводят внутримышечно или подкожно (рисунок 146).

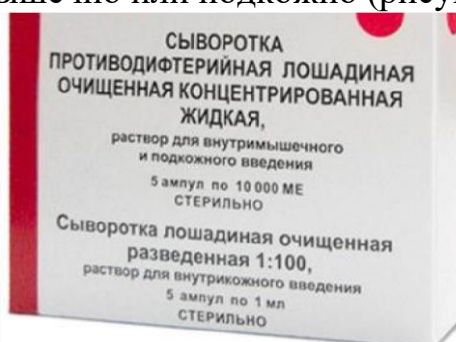


Рисунок 146 - Противодифтерийная лошадиная сыворотка
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Специфическая профилактика. Для специфической профилактики дифтерии используют препараты, содержащие дифтерийный анатоксин (токсоид).



Рисунок 147 - АКДС-вакцина. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ход выполнения работы

1. Взятие и доставка материала

- Взятие материала должны проводить специально обученные медицинскиеработники лечебно-профилактических учреждений.
- При исследовании на дифтерию обследуют ротоглотку и нос. При дифтерииредких локализаций (глаз, ухо, рана, кожа, влагалище), помимо пораженных участков, следует брать материал также с миндалин и из носа.
- Взятие материала осуществляют с помощью стерильных ватных сухихтампонов.
- Материал из ротоглотки и носа берут отдельными тампонами натошак или не ранее чем через 2 ч после еды, при хорошем освещении, с использованием шпателя, не касаясь тампоном языка и внутренних поверхностей щек и зубов. Одним тампоном собирают материал с пораженных участков ротоглотки (миндалин), при необходимости - с дужек мягкого нёба, нёбного язычка или задней стенки глотки. При наличии налетов материал следует брать с границы пораженных и здоровых тканей, слегка нажимая на них тампоном. Для взятия

материала из носа используют другой тампон, который вводят сначала в один, а затем в другой носовой ход, не касаясь крыльев носа снаружи.

- Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее 3 ч с момента взятия материала.
- В случае использования транспортной среды материал собирают сухим тампоном, опускают в пробирку со средой и следят за тем, чтобы пробка тампона не намочилась. Следует учитывать, что применение транспортной среды увеличивает срок выдачи окончательного ответа на одни сутки.

Выявление зерен волютина по Нейссеру

1. Фиксированный препарат в течение 1-2 мин окрашивают ацетатом синьки Нейссера;
2. Краситель смывают и на препарат наносят несколько капель раствора Люголя на 1 мин;
3. Мазок промывают водой и подсушивают;
4. Докрашивают препарат раствором везувина в течение 2-3 мин.
5. По окончании окрашивания мазок промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом.

Зерна волютина, имеющие щелочную реакцию, окрашиваются ацетатом синьки в темно-синий цвет. Цитоплазма клеток, имеющая кислое значение pH, воспринимает щелочной краситель везувин (хризоидин) и окрашивается в желтый или светло-коричневый цвет. У возбудителя дифтерии зерна волютина расположены строго на обоих полюсах клетки, а сами коринибактерии дифтерии.

ПРОТОКОЛ №8 Микроскопическая диагностика дифтерии

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1	Готовый микропрепарат возбудителя дифтерии, окрашенный по Нейссеру и метиленовым синим	<ol style="list-style-type: none"> 1. Оформить направление в бак. лабораторию. 2. Микроскопировать с иммерсионной системой готовый препарат и зарисовать. 4. Оформление заключения в протоколе. 5. Написать ответ на бланке. 	

Материалы и оборудование: готовый мазок возбудителя дифтерии, спиртовка, бактериологическая петля, штатив для пробирок, чистые предметные стекла, лоток со стеклянным «мостиком» для окраски препаратов, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу (стеклограф), дезинфицирующий раствор, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, уксуснокислая синька Нейссера, везувин, раствор Люголя.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 210-216.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 228-233.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.171-174.

2.9. Лабораторная работа №9

Тема: Реакция термореципитации Асколи при сибирской язве Цель:

освоение методики постановки реакции термореципитации Асколи

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики сибирской язвы.

Студент должен уметь:

1. Поставить и интерпретировать реакцию термореципитации Асколи при сибирской язве.

Основные теоретические положения

Сибирская язва - острое антропозоонозное инфекционное заболевание, которое характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением кожи, лимфатических узлов и других органов и высокой летальностью.

В 1876 г. немецкий микробиолог Р. Кох впервые получил чистую культуру возбудителя сибирской язвы. Выделенными чистыми культурами Р. Кох и Л. Пастер воспроизвели болезнь у животных.

Возбудители сибирской язвы - *Bacillus anthracis* в зависимости от стадии развития культуры, а также условий окружающей среды могут существовать в трех формах: в виде бескапсульных вегетативных палочек (рисунок 148), инкапсулированных палочек и спор (рисунок 149).

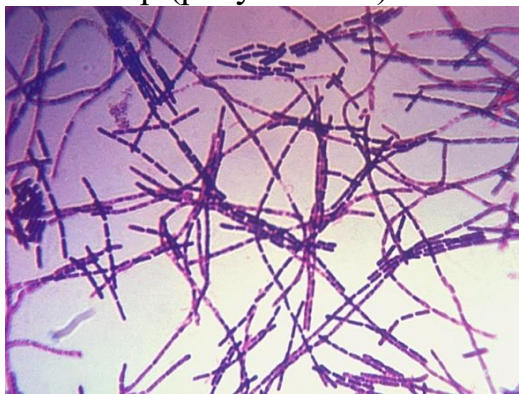


Рисунок 148 - Vegetативные бескапсульные клетки сибирязвенного микроба, окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 149 - Vegetативные капсульные клетки сибирязвенного микроба, мазок-отпечаток из органов павшего животного, окраска по Ребигеру. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Споры образуются только при неблагоприятных условиях: во внешней среде при доступе кислорода воздуха или на питательных средах при длительном инкубировании в аэробных условиях (рисунок 150). При этом в вегетативной клетке образуются одна центрально расположенная овальная спора.



Рисунок 150 - Споры *B. Anthracis*, просвечивающая электронная микроскопия. Видны сформировавшиеся споровые оболочки (со), экзоспориум (экс) и частично лизированный спорангий (спр). Заимствовано из Интернетресурсов

Возбудитель сибирской язвы - факультативный анаэроб, неподвижный, хорошо растет на простых питательных средах, оптимальная температура роста составляет 34-37 °С.

Для окраски спор используют методы Ауески (Ожешки), Пешкова, ЦиляНельсена. При окраске по Цилю-Нельсену вегетативные клетки окрашиваются в синий (фиолетовый) цвет, а споры - в красный (рисунок 151).

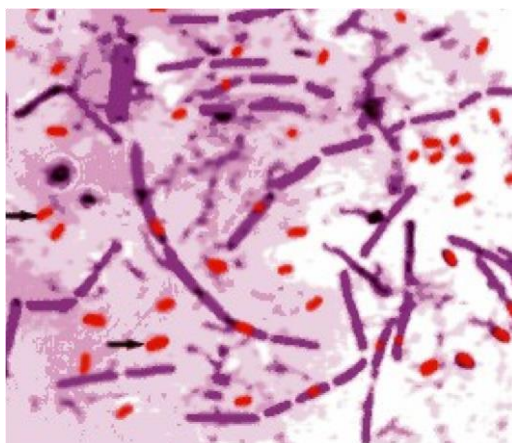


Рисунок 151 - Vegetативные клетки (фиолетовые) и споры (красные) сибиреязвенного микроба, окраска по Цилю-Нельсену. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают на чашки с МПА, агаром Хоттингера, пробирки с мясопептонным бульоном (МПБ) и селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01% раствором натрия фенолфталеина. Посевы проводят с помощью шпателя, методом истощения, распределяя материал с переносом шпателя на 2-3 чашки (Рисунок 152).



Рисунок 152 - Рост *Bacillus anthracis* на твердой питательной среде
Заимствовано из Интернет-ресурсов

При посевах на чашки Петри с питательным агаром после суточной инкубации формирует крупные, шероховатые сухие матовые колонии в R-форме, с неровными краями и хорошо отходящими от них волнистыми отростками, при малом увеличении микроскопа напоминающими львиную гриву (рисунок 153).



Рисунок 153 - Колонии *Bacillus anthracis* с краями в виде «львиной гривы»
Займствовано из Интернет-ресурсов

Одновременно с посевом исследуемого материала на питательные среды осуществляют заражение лабораторных животных (биопроба). Павших животных вскрывают, из крови и органов делают препараты для микроскопии и засевают на питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя.

На агаре, содержащем пенициллин, через 3 ч роста отмечаются отдельные шарики в виде цепочки (рисунок 154), образующей феномен «жемчужного ожерелья».

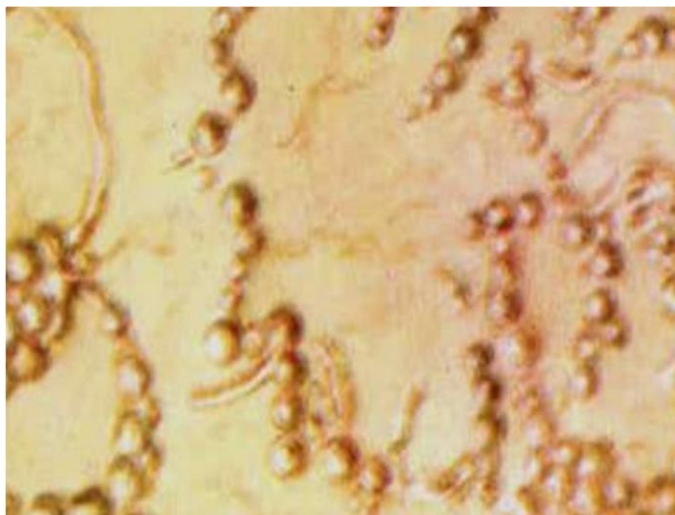


Рисунок 154 - «Феномен жемчужного ожерелья», на агаре с добавлением пенициллина. Займствовано из Интернет-ресурсов

В бульоне преобладает R-форма с осадком в виде комочка ваты. Бульон прозрачный, но S-форма дает помутнение бульона (рисунок 155).

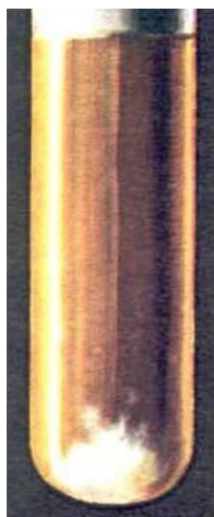


Рисунок 155 - Рост *Bacillus anthracis* на МПБ, суточная культура
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Сибирязвенная палочка ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, образует сероводород, свертывает молоко, каталазопозитивна. При посеве уколом в столбик мясопептонного желатина (рисунок 156) вызывает послойное разжижение (рост в виде елочки вниз вершиной).



Рисунок 156 - Рост *Bacillus anthracis* в столбике мясопептонного желатина
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Лабораторная диагностика сибирской язвы включает бактериоскопию мазков из исследуемого материала, выделение чистой культуры и ее идентификацию, обнаружение антигенов в исследуемом материале с помощью РИФ, постановку ПЦР, биопробы и реакции по Асколи. У человека также ставят кожно-аллергическую пробу с сибирязвенным антигеном.

Кожно-аллергическую пробу ставят с антраксином. У большинства больных эта реакция бывает положительной уже на первой неделе заболевания. Антраксин вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутривожно в количестве 0,1 мл в нижней трети левого предплечья на внутренней стороне. В

месте введения антраксина через 8-24 ч учитывается наличие гиперемии и инфильтрата. Диагноз сибирской язвы подтверждается при наличии положительной антраксиновой пробы с оценкой диаметра гиперемии и инфильтрата от 2 см до 4 см.

Реакция термопреципитации по Асколи чаще всего используется для выявления сибирезвенного возбудителя или соматического полисахаридного антигена в различных субстратах (кожевенном сырье, изделиях из кожи и шерсти, мясе, почве, испражнениях). Эта реакция позволяет определять наличие сибирезвенного антигена как в свежем, так и в разложившемся сырье или мумифицированных трупах животного. Эту реакцию разработал в 1902 г. итальянский врач и иммунолог Альберто Асколи для выявления возбудителя в кожевенном сырье. Она позволяет обнаружить антигены возбудителя при отрицательных результатах бактериологического исследования. Компонентами этой реакции являются экстракт исследуемого материала и преципитирующая сибирезвенная сыворотка. На границе соприкосновения компонентов в течение 1-5 минут образуется мутное кольцо преципитации белого цвета, что расценивается как положительный результат (рисунок 157).

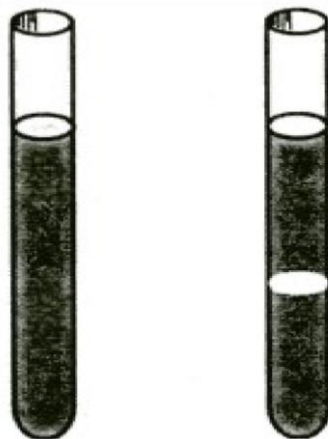


Рисунок 157 - Реакция термопреципитации по Асколи. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ход выполнения работы

1. Материалы для исследования - содержимое карбункулов, мокрота, испражнения, кровь и моча, патоморфологический материал. По эпидемиологическим показаниям исследуют объекты окружающей среды, шерсть и щетину животных. Все исследования проводят в соответствии с требованиями, регламентирующими безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности.

2. Реакция преципитации по Асколи позволяет в короткие сроки обнаружить сибирезвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы животных и людей, шкур и органов павших животных. Для постановки реакции необходимы преципитирующая сибирезвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибирезвенный антиген для контроля.

3. Для получения экстракта материал измельчают, заливают физиологическим раствором и кипятят в течение 30-40 мин; полученный экстракт фильтруют. В узкие пробирки наливают по 0,2-0,3 мл преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой осторожно по стенке пробирки наслаивают такое же количество полученного экстракта. При положительной реакции на границе соприкосновения жидкостей не позднее чем через 15 мин появляется мутно-белое кольцо.

4. Одновременно ставят контроль: преципитирующая сыворотка + стандартный сибирезвенный антиген (положительный контроль), образуется кольцо преципитации. Еще один контроль, отрицательный: преципитирующая сыворотка + термоэкстракт из шерсти здорового животного, кольцо не должно образоваться. Реакция очень чувствительная.

ПРОТОКОЛ №9

Реакция термопреципитации Асколи для выявления сибирезвенного антигена

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	1. Термоэкстракт из кожи павшего животного. 2. Преципитирующая сыворотка. 3. Стандартный сибирезвенный антиген.	1. В опытную пробирку внести 0,5 мл преципитирующей сыворотки и осторожно пипеткой сверху наслаивать исследуемый термоэкстракт. 2. В две контрольные пробирки внести 0,5 мл преципитирующей сыворотки и осторожно пипеткой наслаивать: в одну - термоэкстракт из шерсти здорового животного; в другую - стандартный сибирезвенный антиген. 3. Учесть результат, зарисовать.	

Материалы и оборудование: термоэкстракт из кожи павшего животного, преципитирующая сыворотка, стандартный сибирезвенный антиген, пипетка, пробирки, штатив.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - С. 230-233.

2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 213-217.

3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С. 208-211.

2.10. Лабораторная работа №10

Тема: **Микроскопическая диагностика чумы** Цель:

освоение микроскопической диагностики чумы

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики чумы. **Студент**

должен уметь:

1. Провести микроскопическую диагностику чумы.

2. Выписать направление и результат микроскопического исследования при чуме.

Основные теоретические положения

Чума - острая, особо опасная, сопровождаемая высокой летальностью инфекционная болезнь, общая для людей и животных. Постоянный резервуар инфекции в природе представлен определенными видами грызунов и зайцеобразными.

Чума относится к числу инфекций, вызывающих не только эпидемии, но и пандемии. В истории человечества документально подтверждены **три пандемии чумы**.

Первая пандемия чумы описывается как “Юстинианова чума” (531-589 гг.). Свое название эта пандемия получила по имени правившего тогда византийского императора Юстиниана I, который во время пандемии переболел бубонной формой чумы.

Вторая пандемия, известная под названием “Черная или великая смерть”, была занесена из Монголии.

Третья пандемия возникла в 1855 г. в китайской провинции Юньнань и в течение нескольких десятилетий распространилась на все континенты.

В 1894 г. на борьбу с начавшейся третьей пандемией чумы в Китай были направлены известные ученые: французское правительство направило А. Йерсена, а японское правительство – С. Китасато (рисунок 158).

С. Китасато выделил возбудителя из тканей умершего от чумы человека, а А. Йерсен - как из органов погибших от чумы людей, так и из органов павших крыс. А. Йерсен также впервые установил, что при пересевах на питательных средах возбудитель утрачивает патогенные свойства, а ослабленная культура в малых дозах способна защищать животных от чумы. В честь А. Йерсена возбудитель получил название *Yersinia pestis*.

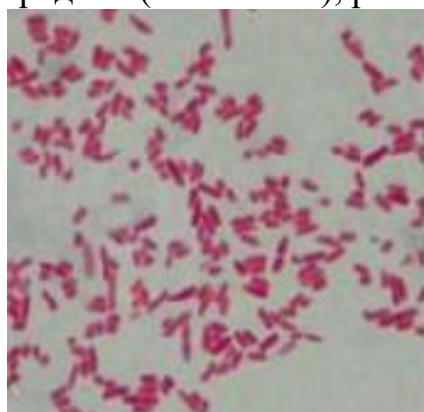


Рисунок 158 - Александр Эмиль Жан Йерсен (Alexandre Emile Jean Yersin, 1863-1943 гг.) и Сибасабуру Китасато (1853-1931 гг.). Заимствовано

из

Интернет-ресурсов

Возбудитель чумы относится к семейству Enterobacteriaceae, роду *Yersinia*, виду *Yersinia pestis* (рисунок 159). Возбудитель чумы - это короткая грамотрицательная палочка овоидной формы, неподвижная, не образующая спор, образует нежную капсулу (рисунок 160). Палочка овоидной формы, вздутая посередине («бочонок»), размеры 0,3-0,7x1-2 мкм.



а



б

Рисунок 159 - *Yersinia pestis*, чистая культура, окраска по Граму (а) и электронная фотография возбудителя (б). Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 160 - Капсула чумного микроба. Заимствовано из Интернетресурсов

Материал для исследования - пунктаты из бубонов, мокрота, кровь, фекалии, спинномозговая жидкость, смывы из зева, язв и других кожных поражений, а также трупный материал.

Окрашиваются биполярно. В мазках располагаются цепочками или попарно (рисунок 161).

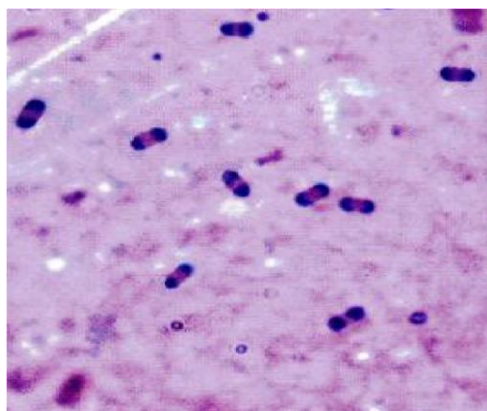


Рисунок 161 - Окраска чумного микроба метиленовым синим по Лёффлеру, видна биполярная окраска. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На твердых питательных средах возбудитель через 10-12 часов первоначально образует молодые колонии в виде «битого стекла», т.е. микроколонии с неровными краями (рисунок 162).

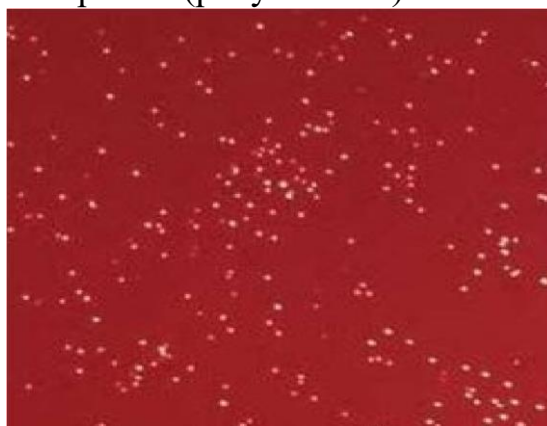


Рисунок 162 - Молодые колонии *Yersinia pestis* на твердой питательной среде, «битое стекло». Заимствовано из Интернет-ресурсов

Через 18-24 часа растет в виде «кружевных платочков», в центре которых в последующем образуется уплотнение, формирующее выпуклый зернистый центр колонии, окруженный светлой зоной (рисунок 163, 164).



Рисунок 163 - *Yersinia pestis*, рост на твердой питательной среде, «кружевной платочек». Заимствовано из Интернет-ресурсов

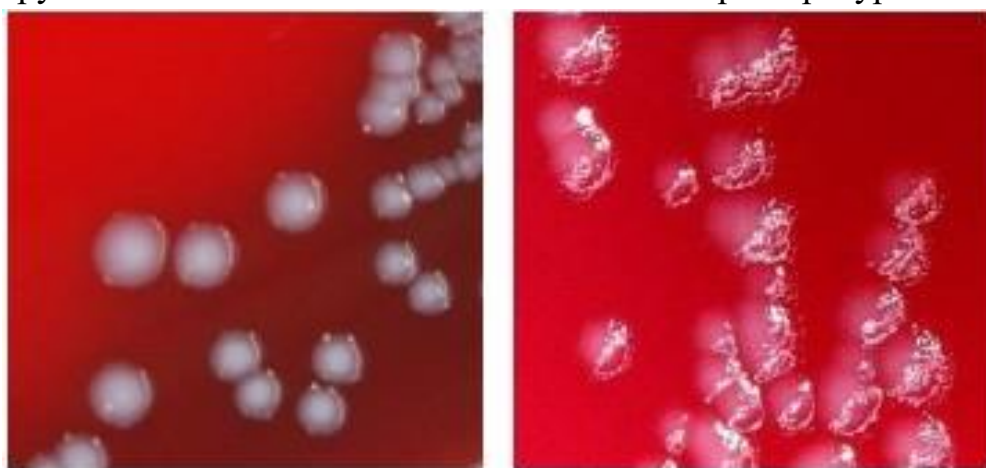


Рисунок 164 - Характер роста чумного микроба на кровяном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Характерным признаком чумного микроба является вязкая консистенция колоний на плотной питательной среде (рисунок 165).



Рисунок 165 - Вязкий характер роста культуры чумного микроба. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Зрелые колонии – через 40-48 часов, наступает стадия «взрослой колонии»: наблюдается темный центр с выраженной светлой периферической зоной в виде «ромашки». Рост возможен при температуре 2-40°C, оптимальная температура 28°C (рисунок 166).

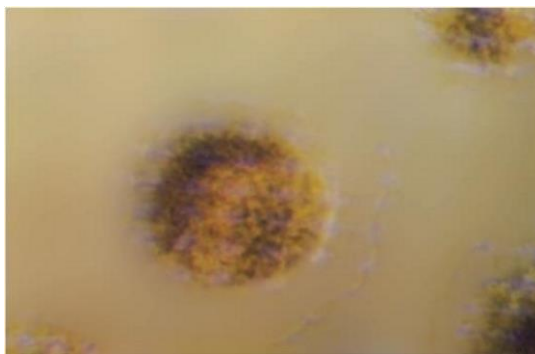


Рисунок 166 - *Yersinia pestis*, зрелые колонии на твердой питательной среде, «ромашки». Заимствовано из Интернет-ресурсов

При выращивании на жидких питательных средах возбудитель чумы образует поверхностную пленку, от которой вниз спускаются нити «сталактиты» и придонный осадок, оставляя среду прозрачной (рисунок 167).



Рисунок 167 - *Yersinia pestis* рост на жидкой питательной среде.

Заимствовано из Интернет-ресурсов

Лабораторная диагностика. Для лабораторной диагностики чумы используют бактериоскопический, бактериологический, биологический, серологический и молекулярно-генетические методы. В качестве экспрессметодов используют РИФ и ПЦР, которые проводятся в специализированных лабораториях, имеющих разрешение на работу с возбудителями особо опасных инфекций.

Материалом для исследования служат пунктаты бубонов, мокрота, отделяемое язв, кровь, моча, кал, рвотные массы, трупный материал.

Специфическая профилактика чумы осуществляется с помощью живой аттенуированной вакцины на основе штамма EV для кожного (скарификационного), подкожного и ингаляционного применения (рисунок 168).



Рисунок 168 - Вакцина чумная живая для кожного, подкожного и ингаляционного применения. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для оценки иммунитета и ретроспективной диагностики чумы предложена внутрикожная аллергическая проба с пестином. Реакция считается положительной, если на месте введения пестина через 24-48 ч образуется уплотнение не менее 10 мм в диаметре и появляется краснота.

Ход выполнения работы

1. Провести микроскопию готового микропрепарата.

Бактерии чумы имеют вид палочек овоидной формы, грамтрицательны. В мазках окрашенных метиленовым синим, хорошо заметно bipolarное распределение краски. Встречаются полиморфные формы.

ПРОТОКОЛ №10 Микроскопическая диагностика чумы

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Готовые микропрепараты из гноя бубона.	1. Написать направление для исследования. 2. Микроскопировать готовый препарат с иммерсионной системой. 3. Зарисовать. 4. Оформить заключение. 5. Выписать результат исследования на бланке.	

Материалы и оборудование: готовый микропрепарат из гнойного отделяемого бубона, биологический микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 170-173.

1. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 210-211.

2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С199-202.

2.11. Лабораторная работа №11

Тема: Микроскопический метод диагностики раневой анаэробной инфекции

Цель: освоение микроскопического исследования раневого отделяемого.

Студент должен знать

1. Основные методы микробиологической диагностики раневой анаэробной инфекции

Студент должен уметь

1. Выписать направление и оформить результат микроскопического исследования при раневой анаэробной инфекции.

2. Уметь микроскопировать с иммерсионной системой и дифференцировать микроорганизмы по морфологическим и тинкториальным свойствам.

Основные теоретические положения

Раневая анаэробная инфекция (газовая гангрена) - это полимикробное заболевание, т.е. вызывается группой микроорганизмов. Анаэробная клостридиальная инфекция характеризуется тяжелым течением, прогрессирующим развитием некроза и отека тканей, газообразованием в месте патологического процесса и развитием крепитации окружающих тканей, тяжелой интоксикацией в результате действия бактериальных токсинов и продуктов распада тканей.

Возбудители газовой гангрены относятся к семейству Bacillaceae, роду Clostridium. Основные представители: *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*. Обычно заболевание возникает в результате попадания в рану одного или нескольких представителей рода Clostridium и часто в сочетании с аэробами - стафилококками и стрептококками.

Clostridium perfringens открыт в 1892 г. Уэлчем и Неттолом.

Морфология: крупные полиморфные палочки в среднем $3-9 \times 0,9-1,2$ мкм. Неподвижны. Свежевыделенные из организма культуры имеют капсулу. При попадании в неблагоприятные условия образуют споры овальной формы,

располагающиеся центрально или субтерминально. Грамположительны. Старые культуры окрашиваются по Граму отрицательно (рисунок 169).

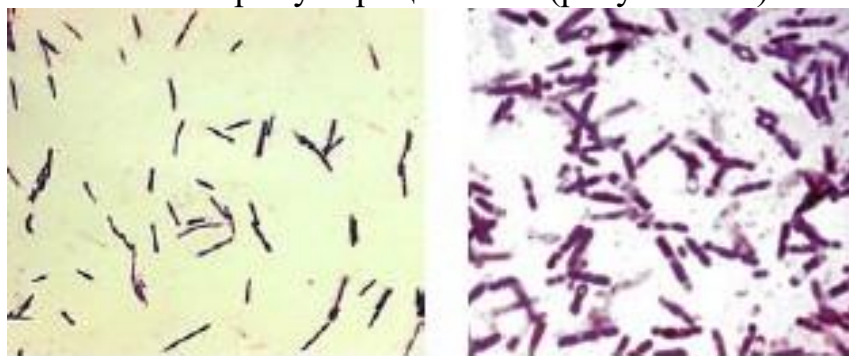


Рисунок 169 - *C. perfringens*, окраска по Граму. Заимствовано из Интернетресурсов

Некоторые клостридии образуют капсулу, особенно в организме человека или животных (рисунок 170).

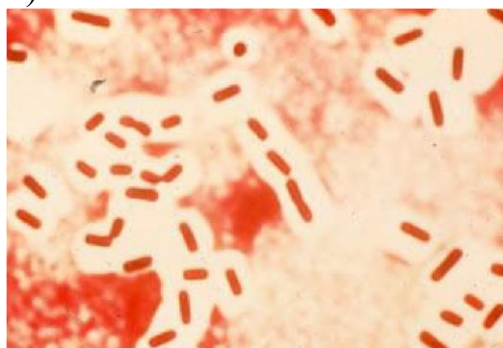


Рисунок 170 - *Cl. perfringens* по Бурри-Гинсу (вокруг палочек видна бесцветная капсула). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. Материал, который исследуют, высевают на следующие питательные среды: кровяной агар Цейслера, желточный агар, в глубину столбика висмут - сульфит агара, на бензидиновый агар, среду Вильсона-Блера, в 5 пробирок со средой Китта-Тароцци, 4 из которых перед посевом кипятят в течение 20 минут, а затем быстро охлаждают. Одна пробирка остается без прогревания. Целесообразно высевать материал для исследования в мясопептонный агар и сахарный агар, которыми заполняют пастеровские пипетки для создания анаэробных условий. Посевы помещают в анаэростаты и ежедневно наблюдают рост на плотных питательных средах. Посевы в жидких питательных средах выращивают в обычных условиях в термостате в течение 15 суток.

На кровяных средах *C. perfringens* образуют зону гемолиза (рисунок 171).

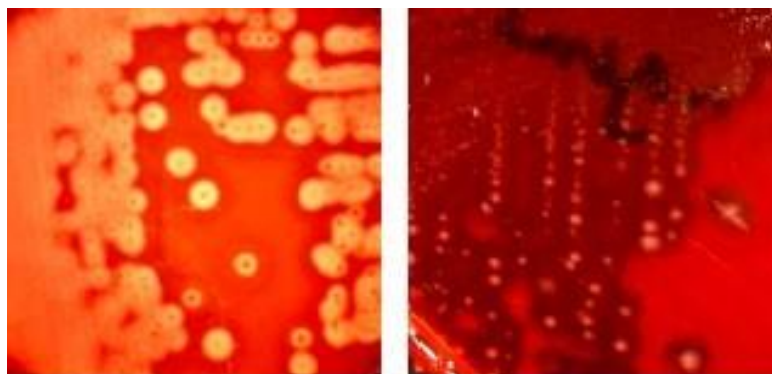


Рисунок 171 - Колонии клостридий на кровяном агаре, окруженные зоной гемолиза. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На среде Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар для патогенных анаэробов) в процессе роста клостридий сернокислый натрий восстанавливается с образованием сернистого железа, поэтому на этой среде *C. perfringens* образуют черные колонии (рисунок 172).



Рисунок 172 - Рост клостридий на среде Вильсона-Блера. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 173 - Рост клостридий на среде Китта-Тароцци. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В среде Китта-Тароцци рост клостридий сопровождается помутнением среды и активным газообразованием (рисунок 173).

В молоке рост клостридий сопровождается створаживанием молока и образованием губкообразного сгустка – так называемая “штормовая реакция” (рисунок 174).



Рисунок 174 - Рост кластридий в молоке: сворачивание молока с образованием крупноячеистого сгустка с пузырьками газа («штормовая реакция»). Заимствовано из Интернет-ресурсов

На желточном агаре в результате разложения лецитина ферментом лецитиназой вокруг колоний наблюдается зона опалесценции (рисунок 175).

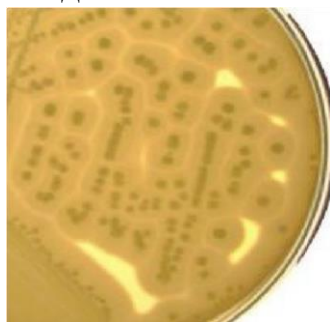


Рисунок 175 - Рост *C. perfringens* на желточном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ферментативные свойства. *C. perfringens* сбраживают лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу с образованием кислоты и газа. Протеолитические свойства - свертывают молоко, медленно (2-7 дней) разжижают желатин. Свертывают лакмусовое молоко с образованием сгустка кирпичного цвета и полного просветления молочной сыворотки. Восстанавливают нитраты в нитриты, индол не образуют.

Антигенная структура. *C. perfringens* разделяют на пять сероваров, которые обозначаются большими латинскими буквами А, В, С, D и Е. Эти серовары отличаются друг от друга по антигенным и биохимическим свойствам своих токсинов.

Серовар А является обитателем кишечника в естественных условиях, но может вызвать пищевые токсикоинфекции у людей. Серовар В вызывает кишечные явления у ягнят.

Серовар С вызывает некротический энтерит у людей и заболевания у крупного рогатого скота. Серовар D вызывает энтеротоксемию у животных.

Восприимчивость животных. В естественных условиях *S. perfringens* вызывают заболевания у домашних животных. Из экспериментальных животных к ним чувствительны морские свинки, кролики, голуби, мыши. У зараженных животных на месте введения токсина возникает некроз ткани. В крови могут находиться клостридии.

Ход выполнения лабораторной работы

Выписать направление для исследования. Изучить под микроскопом с иммерсионной системой готовые микропрепараты из патологического материала и оформить заключение. Выписать результат исследования.

ПРОТОКОЛ № 11 Микроскопический метод диагностики раневой анаэробной инфекции

День исс.	Исследуемый материал	Ход исследования	Резуль тат
1	Микропрепараты из раневого отделяемого, окраска по Граму, Гиссу.	1. Выписать направление в баклабораторию. 2. Изучить микропрепараты с иммерсионной системой микроскопа. Обратить внимание на наличие капсулы. 3. Зарисовать. 4. Оформить заключение и выписать результат исследования.	

Материалы и оборудование:

Биологический микроскоп с иммерсионным объективом; иммерсионное масло, микропрепараты из раневого отделяемого (по Граму, Гиссу).

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.203 -206.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 266-269.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - С.143-148.

2.12. Лабораторная работа №12

Тема: Реакция Вассермана при сифилисе

Цель: освоение серологической диагностики сифилиса

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики сифилиса

Студент должен уметь:

1. Определить наличие комплементсвязывающих антител в сыворотке больного сифилисом

2. Выписать направление на исследование и оформить результат реакции Вассермана

Основные теоретические положения

Сифилис - хроническое инфекционное заболевание человека, характеризующееся первичным аффектом с поражением слизистых оболочек и кожи в месте входных ворот инфекции, с последующими полиорганными поражениями (вовлечением в процесс внутренних органов, костей, нервной системы) и прогредиентным течением (периоды активных проявлений чередуются с периодами латентности).

Возбудитель сифилиса был открыт 3 марта 1905 г. немецкими учеными Ф. Шаудином и Э. Хоффманном (рисунок 200).



А



Б

Рисунок 176 – А - Фритц Шаудинн (Fritz Schaudinn, 1871–1906 гг.); Б – Эрих Хоффманн (Erich Hoffmann, 1868-1959 гг.). Заимствовано из

Интернетресурсов

В 1906 г. немецкий ученый А. Вассерманн (рисунок 177) совместно с А. Нейссером и К. Бруком предложил серологическую реакцию для диагностики сифилиса (реакцию Вассерманна).

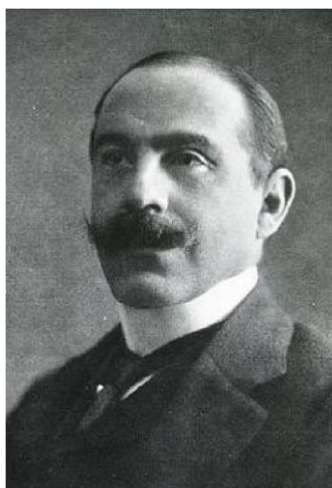


Рисунок 177 - Август Пауль фон Вассерманн (August Paul von Wassermann, 1866-1925 г.). Заимствовано из Интернет-ресурсов

В 1909 г. немецкий врач, основатель химиотерапии П. Эрлих предложил для лечения сифилиса первый противосифилитический препарат сальварсан (препарат “606”, “спасительный мышьяк”), а в 1912 г. – неосальварсан (препарат “914”).

Таксономическое положение. Возбудитель сифилиса (*Treponema pallidum*) относится к роду *Treponema*, семейству *Spirochaetaceae*. Род *Treponema* включает патогенный для человека вид *T. pallidum* с 4 подвидами: *T. pallidum pallidum* – возбудитель сифилиса, *T. pallidum endemicum* – возбудитель беджеля (эндемического сифилиса, невенерического сифилиса детского возраста), *T. pallidum pertenue* – возбудитель фрамбезии (тропической гранулемы, невенерического сифилиса) и *T. carateum* – возбудитель пинты (карате).

Возбудитель сифилиса - *Treponema pallidum* - микроорганизм спиралевидной формы, длинная (8—20 мкм) тонкая (0,25—0,35) спирохета, глубина спирали 0,8—1 мкм, амплитуда витка — 1 мкм, количество завитков — 8—12—14. Бледная трепонема способна к винтообразным, сгибательным и контрактильным движениям, обеспечиваемым фибриллами и собственными сокращениями клетки трепонемы (рисунок 179,180). Имеется так называемое аксилярное тело, представляющее собой внутриклеточные жгутики.

Ввиду наличия большого числа гидрофобных компонентов в цитоплазме трепонема плохо прокрашивается анилиновыми красителями, но окрашивается в бледно-розовый цвет по методу Романовского — Гимзе (за что и получила название «бледная трепонема») (рисунок 181). Применимы также методы протравления и импрегнации серебром. При окраске по методу серебрения по Морозову трепонемы окрашиваются в черный или коричневый цвет.

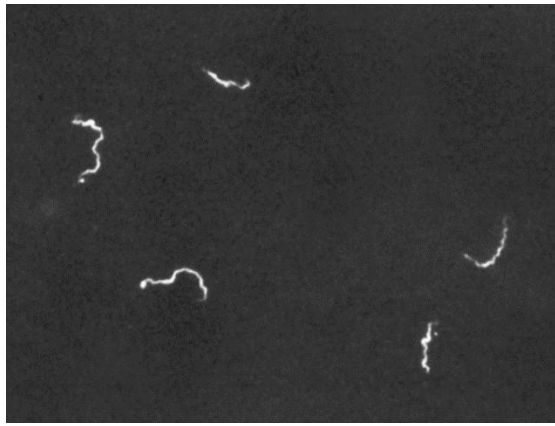
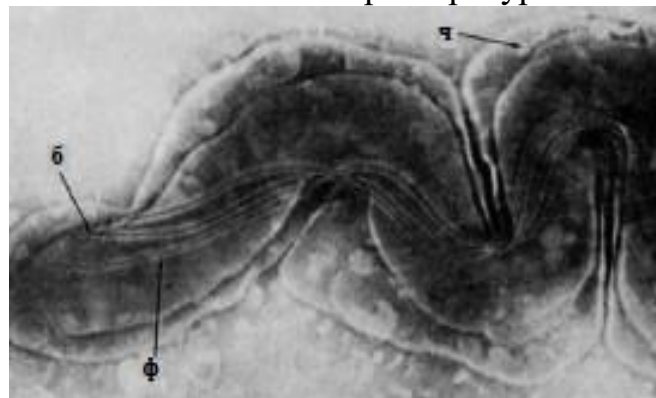


Рисунок 178 - *Treponema pallidum*, темнопольная микроскопия.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Неокрашенные нефиксированные живые трепонемы не видны в световой микроскоп, для их визуализации применяют метод темнопольной микроскопии (рисунок 178), просмотр в фазово-контрастном микроскопе и более современный метод флюоресцентных антител (рисунок 179).



Рисунок 179 - Трепонема, сканирующая электронная микроскопия.
Займствовано из Интернет-ресурсов



б – блефаропласт; ф – фибриллы; ч – чехол
Рисунок 180 - Электронная фотография *T. Pallidum*. Займствовано из
Интернет-ресурсов

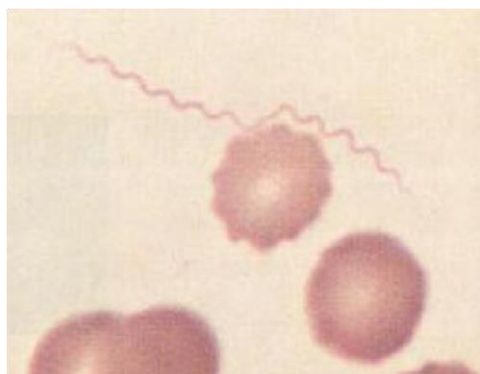


Рисунок 181 - Возбудитель сифилиса, окраска по методу Романовского-Гимзы. Заимствовано из Интернет-ресурсов

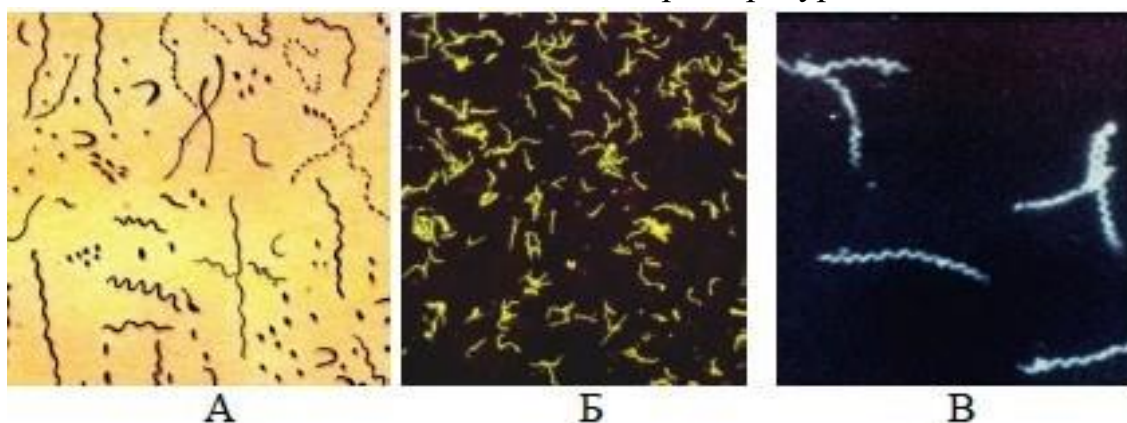
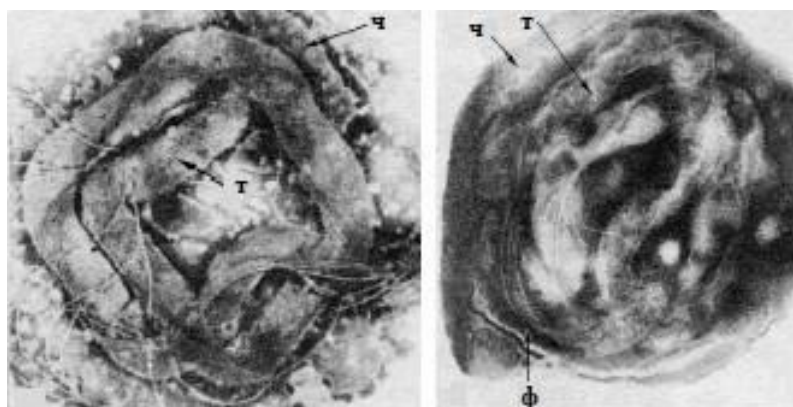


Рисунок 182 - Микроскопическая картина *T. Pallidum*. А – серебрение по Морозову (Мотавкина Н.С., Артемкин В.Д., 1976); Б – РИФ; В – темнопольная микроскопия. Заимствовано из Интернет-ресурсов

При неблагоприятных условиях существования в организме (наличии антител, антибиотиков и др.) бледная трепонема способна образовывать цисты, не пропускающие лекарственные препараты. В форме цист трепонемы могут существовать в организме, не оказывая выраженного патогенного действия (рисунок 183).



ч – чехол, т – трепонемы, ф – фибриллы

Рисунок 183 - Цисты трепонем, электронная микроскопия. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Под влиянием лекарств образуются L-формы. Существование цист и L-форм - одна из причин скрытого длительного течения заболевания, а также затрудненной лабораторной диагностики.

Для получения культуры трепонем возбудитель сифилиса культивируется путем заражения кроликов. Размножение бледной трепонемы происходит в узком интервале температур – около 37° С.

Источником инфекции является больной человек, который обычно заразен в течение 3-5 лет. Путь передачи - половой, реже - контактный и трансплацентарный.

Лабораторную диагностику сифилиса проводят микроскопическим, серологическим методами и ПЦР в зависимости от стадии заболевания.

Источником инфекции является больной человек, который обычно заразен в течение 3-5 лет. Путь передачи - половой, реже - контактный и трансплацентарный.

Микроскопический метод позволяет обнаружить *T. pallidum* в содержимом:

- твердого шанкра в первичном периоде;
- высыпаний во время вторичного периода.

Наилучшие результаты получают при микроскопии нативных препаратов в темном поле зрения или при фазово-контрастной микроскопии.

T. pallidum – не культивируются на питательных средах, так как являются облигатными паразитами.

Наилучшим способом выращивания патогенных трепонем является заражение кроликов-самцов интратестикулярно.

При микробиологической диагностике сифилиса используют разные методы с учетом патогенеза заболевания. При первичном сифилисе применяют микроскопическое исследование, для диагностики вторичного сифилиса используют серологические реакции.

Простой и достаточно надежный способ выявления возбудителя на ранних стадиях - бактериоскопия тканевой жидкости с поверхности твердого шанкра или элементов сыпи. Готовят препарат «раздавленная капля», который исследуют в темном поле. В положительном случае видны тонкие спирохеты длиной 6-14 мкм, имеющие 8-12 равномерных мелких завитков правильной формы.

Наиболее широкое применение имеет серологический метод исследования, представленный комплексом серологических реакций (КСР). Серодиагностика доступна и применяется как основной метод диагностики сифилиса во всех периодах заболевания.

КСР включает реакции, которые подразделяют на отборочные (скрининговые) и диагностические.

Отборочные реакции направлены на определение антител к неспецифическому кардиолипину антигену. Антитела на этот антиген появляются первыми, и их титр снижается в процессе уменьшения в организме количества трепонем. Исторически эти антитела называют реакинами, они не обладают специфичностью, их используют для массового обследования

населения на сифилис и для оценки эффективности лечения. К отборочным реакциям относят:

- реакцию микропреципитации (МП) и ее аналоги (VDRL - *Veneral Disease Research Laboratory*; RPR - *Rapid Plasma Reagin*);

- РСК (реакцию Вассермана);

- флокуляционные тесты.

Диагностические реакции ставят со специфическим белковым антигеном *T. pallidum*. Антитела на него появляются позже и длительно сохраняются независимо от присутствия трепонем в организме. Это высокочувствительные и высокоспецифичные реакции, к которым относят:

- ИФА;

- РПГА;

- РИФ (непрямой метод);

- РИТ (реакцию иммобилизации трепонем).

В связи с длительностью сохранения в организме антител на белковый специфический антиген диагностические реакции не могут быть использованы для оценки эффективности лечения.

Также для диагностики сифилиса в настоящее время используют ПЦР.

Ход выполнения работы

Реакция Вассермана – экспресс-метод диагностики сифилиса. Свое название методика получила в честь ее автора - немецкого иммунолога Августа Вассермана.

Особенностью анализа является простота его постановки. Методика заключается в добавлении к крови пациента кардиолипина из бычьего сердца. Если пациент болен сифилисом, то происходит специфическая реакция с кардиолипином, так как в крови обследуемого вырабатываются антитела (иммунитет борется с инфекцией) к возбудителю – бледной трепонеме.

Антигены бывают специфическими, то есть свойственными только конкретному микроорганизму, и неспецифическими, встречающимися во многих организмах. К таким неспецифическим антигенам относится кардиолипин, который присутствует в бледной трепонеме и в бычьем сердце.

В неспецифичности антигена заключается главный минус реакции Вассермана – относительно высокая частота ложноположительного результата по причине частой встречаемости кардиолипина в природе.

Принцип:

1. Реакцию Вассермана ставят одновременно с двумя антигенами: со специфическим антигеном возбудителя (разрушенные ультразвуком трепонемы) и с неспецифическим антигеном – кардиолипиновым (экстракт бычьего сердца с лецитином и холестерином) (таблица 11).

2. Исследуемую сыворотку разводят 1:5 и разливают в 3 пробирки по 0,25 мл.

3. В первую пробирку (контроль сыворотки) добавляют 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида.

4. Во все три пробирки добавляют комплемент (в рабочей дозе).

5. В 4 пробирке сенсибилизируют гемолитическую систему: к гемолитической сыворотке в тройном титре в объеме 1,0 мл добавляют 3% взвесь эритроцитов 1,0 мл

6. Ставят в термостат 37°C на 45 минут.

7. Если в исследуемой сыворотке присутствуют искомые АТ, то они взаимодействуют с АГ и к образовавшемуся комплексу АГ-АТ присоединяется комплемент. Если АТ нет, то комплемент остается свободным. Это первая фаза реакции.

8. Вторая фаза: во все три пробирки добавляем сенсиблированную гемолитическую смесь по 0,5 мл.

9. Ставим в термостат на 40-60 минут, в зависимости от наступления гемолиза в контроле, т.к. регистрация результатов реакции производится после наступления гемолиза в контроле.

10. В случае наступления гемолиза в опытной пробирке РСК учитывается как отрицательная, т.е. нет АТ к возбудителю, происходит гемолиз эритроцитов барана в результате их взаимодействия с гемолитической сывороткой в присутствии свободного комплемента.

11. При положительном результате наблюдается задержка гемолиза различной степени, которая условно обозначается по четырехкрестовой системе (рисунок 184).

Количественный метод Боаса позволяет установить титр АТ в сыворотках с 4-кратной позитивностью путем ступенчатых разведений от 1:5 до 1:320 и более.

Титром считается наибольшее разведение сыворотки, в котором регистрируется положительный результат:

4+ полная задержка гемолиза (резко положительный результат);

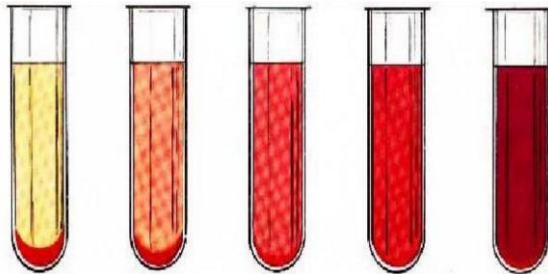
3+ положительный;

2+

слабоположительный; +

- сомнительный; - -

отрицательный.



а – полная задержка гемолиза (++++); б – выраженная задержка гемолиза (+++); в – частичная задержка гемолиза (++); г – слабая задержка гемолиза (+); д – полный гемолиз (“лаковая кровь”).

Рисунок 184 - Реакция Вассермана. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Таблица 11 - Схема постановки реакции Вассермана

Ингредиенты, мл	1-я пробирка (контроль сыворотки)	2-я пробирка (специфический антиген)	3-я пробирка (неспецифический антиген)	4-я пробирка (гемолитическая система)
Сыворотка больного (1:5)	0,25	0,25	0,25	-
Изотонический раствор натрия хлорида	0,25	-	-	-
Трепонемный антиген	-	0,25	-	-
Кардиолипидный антиген	-	-	0,25	-
Комплемент (в рабочей дозе)	0,25	0,25	0,25	-
Гемолитическая сыворотка в тройном титре	-	-	-	1,0
3% взвесь эритроцитов	-	-	-	1,0
В термостат 37°C на 45 минут				
Гемолитическая смесь (сенсibiliлизованная)	0,5	0,5	0,5	x
В термостат на 40-60 минут, в зависимости от наступления гемолиза в контроле регистрация результатов реакции после наступления гемолиза в контроле				
Результат	- Полный гемолиз	+++ Выраженная задержка гемолиза	+++ Выраженная задержка гемолиза	x

ПРОТОКОЛ №12 Реакция Вассермана при сифилисе

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Сыворотка больного	1.Выписать направление в баклабораторию. 2.Поставить 1 фазу РСК по схеме, представленной в описании хода работы. 2.Поместить пробирки в термостат при 37° на 45 мин. 3.Поставить 2 фазу РСК и поместить пробирки в термостат при 37° на 45 мин 4.Учесть полученный результат и оформить заключение. 5.Выписать результат исследования.	

Материалы и оборудование: сыворотка больного, изотонический раствор натрия хлорида, трепонемный антиген, кардиолипиновый антиген, комплемент (в рабочей дозе), гемолитическая сыворотка в тройном титре, 3% взвесь эритроцитов, пробирки, пипетки, штатив, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.181-183.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 236-238.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.199-202.

2.13. Лабораторная работа №13

Тема: РТГА для идентификации вируса гриппа.

Цель: освоение механизма и принципа интерпретации результатов РТГА для идентификации вируса гриппа.

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики гриппа

Студент должен уметь:

1. Интерпретировать результат РТГА для типирования выделенного вируса
2. Выписать направление на исследование и оформить результат типирования вируса гриппа в РТГА.

Основные теоретические положения

Грипп - острая вирусная респираторная инфекция, часто принимающая эпидемическое распространение. Грипп характеризуется явлениями общей интоксикации, лихорадкой, поражением дыхательного тракта, сердечнососудистой и нервной системы (рисунок 185).

Вирус гриппа относят к семейству *Orthomyxoviridae*, из которого три рода составляют вирусы гриппа А, В, С: *Influenza A virus*, *Influenza B virus* и *Influenza C virus*.

Возбудители гриппа - РНК-содержащие сложные (оболочечные) вирусы. Вирион имеет сферическую форму диаметром около 100 нм, встречаются и нитевидные формы. Нуклеокапсид со спиральным типом симметрии заключен в липопротеиновую оболочку с шипами на поверхности. Липопротеиновая оболочка (суперкапсид) имеет клеточное происхождение (рисунок 186).

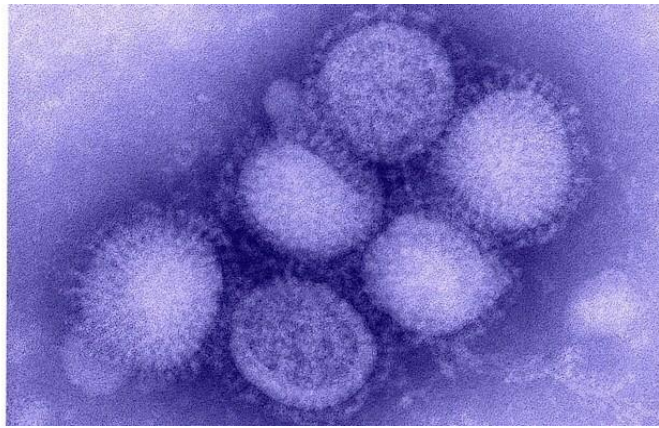


Рисунок 185 - Вирус гриппа (электронная микроскопия)
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Три вирусных белка пронизывают липидный слой и образуют внешнюю поверхность вириона, два из них - вирусные гликопротеины: гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), формирующие поверхность вириона (рисунок 187). Внутренняя поверхность оболочки вирусов гриппа образована слоем белка М1. Вирион содержит также трансмембранные белки М2 (грипп А), NB, VM2, (грипп В), SM2 (грипп С).

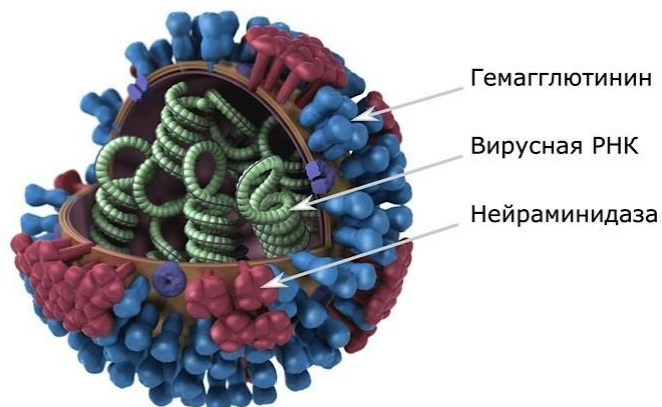


Рисунок 186 - Строение вируса гриппа (модель). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Геном вируса гриппа представлен однонитевой РНК отрицательной полярности (минус-РНК), которая у вирусов гриппа А и В состоит из 8 фрагментов, а у гриппа С - из 7 фрагментов. Каждый фрагмент находится в комплексе с белком-нуклеопротеином (NP) и тремя белками полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA). На основе каждого фрагмента создается комплементарная мРНК для синтеза вирусных белков.

Шипики на поверхности суперкапсида - выросты длиной около 10 нм, образованные гемагглютинином и нейраминидазой. Количество гемагглютинина в 5 раз больше, чем нейраминидазы. У вируса типа С нейраминидазы нет. На поверхности обоих гликопротеинов есть специальные области для связывания с рецепторами на чувствительных клетках. Для вирусов гриппа специфическими рецепторами являются соединения, содержащие сиаловую кислоту.

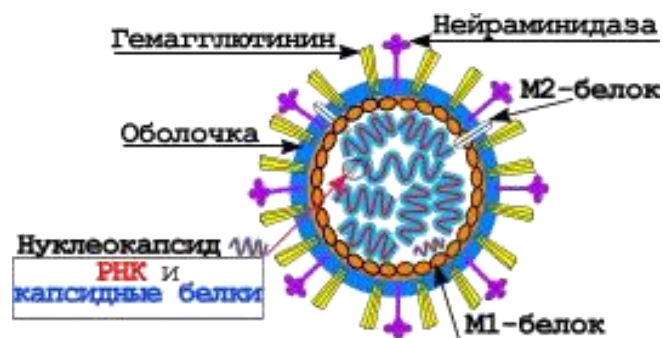


Рисунок 187 - Строение вируса гриппа (схема). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Вирусные частицы связываются с чувствительной клеткой при участии гемагглютинина. Гемагглютинин вначале синтезируется в виде полипептидной цепи, а после химических модификаций расщепляется на две субъединицы HA1 и HA2. В результате такого расщепления вирион приобретает способность сливаться с клеточной мембраной. Гемагглютинин обладает способностью склеивать (агглютинировать) эритроциты и является основным антигеном вируса гриппа. Нейраминидаза - фактор распространения вируса, так как расщепляет сиаловые кислоты и помогает вирусам преодолевать слизистый слой.

Лабораторную диагностику гриппа проводят вирусологическим и серологическим методами.

Материалы для исследования - носоглоточное отделяемое, мазки-отпечатки со слизистой оболочки носа, аутопсийный материал, кровь (для серологического метода).

- Материалом заражают куриные эмбрионы и культуры клеток (первичные или перевиваемые).

- Индикацию вирусов проводят по гибели, клиническим и патоморфологическим изменениям, цитопатическому действию, образованию бляшек, цветной пробе, РГА и реакции гемадсорбции (РГАд).

- Идентификацию вирусов проводят по антигенной структуре с помощью РСК, РТГА, ИФА, РИФ.

- Иммунофлюоресцентный метод детекции вирусных антигенов - высокочувствительный тест быстрой дифференциальной диагностики гриппа. Суть метода заключается в специфической индикации вирусных антигенов в клиническом материале от больных с помощью специфических антител, меченных флюорохромом (например, флуоресцеин изотиоцианат - ФИТЦ). Образующийся при этом комплекс «антиген-антитело» обнаруживают по характерной ярко-зеленой флюоресценции в сине-фиолетовых лучах люминесцентного микроскопа.

- Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) применяют для установления подтипа вируса, т.е. специфичности, а также для определения нарастания титров специфических антител. При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр

сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации.

- Метод определения инфекционной активности вируса гриппа на куриных эмбрионах 10-12-дневного возраста. Вирус вводят в аллантоисную полость (0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от 10^{-5} до 10^{-7}), используя на каждое разведение по четыре эмбриона. Эмбрионы культивируют при температуре 35°C в течение 48 час для вируса гриппа типа Аи 72 час – для вируса гриппа типа В. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирают по 0,4-0,5 мл аллантоисной жидкости, которую помещают в четыре отдельных лунки пластинки из плексигласа. В каждую лунку добавляют по 0,4-0,5 мл 1% суспензии куриных эритроцитов. Через 30-40 мин контакта после оседания эритроцитов в контроле проводят учет гемагглютинации.
- Метод количественного определения гемагглютинина вируса гриппа в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД). Гемагглютинин (НА), диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении, реагирует со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, и образует в геле зону преципитации. Размеры окружающей лунку зоны преципитации находятся в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку.
- Серологическое исследование проводят в целях подтверждения диагноза и выявления уровня специфических антител. Положительным считают результат нарастания титра антител не менее чем в 4 раза при заборе парных сывороток с интервалом 5-8 дней.
- Молекулярно-генетические методы исследования включают обнаружение вирусной РНК с помощью ПЦР.
- Иммунохроматографический экспресс-тест. Для определения наличия вирусов гриппа типов А и В в образцах назальных мазков используется иммунохроматографический экспресс-тест. Метод основан на обнаружении в исследуемом материале специфических нуклеопротеинов вирусов типа А и В при помощи моноклональных мышинных иммуноглобулинов. Для этой цели в наборе для проведения теста имеется 2 индикаторные палочки: одна для обнаружения наличия вируса типа А, другая – для определения вируса типа В.

Противовирусный иммунитет

Человек, перенесший грипп, приобретает стойкий постинфекционный **клеточный и гуморальный иммунитет**, который отличается своей узкой специфичностью и направлен против сероварианта (штамма) вируса гриппа, вызвавшего данное заболевание. Следовательно, противогриппозный иммунитет является подтипо- и штаммоспецифичным. Поэтому появление новых штаммов того же подтипа вируса А даже с очень незначительным дрейфом поверхностных антигенов существенно снижает эффективность имеющегося иммунитета. Дальнейшая антигенная изменчивость того же подтипа вируса, а тем более появление, вследствие шифта антигенов, нового подтипа вируса А, делает человека беззащитным против гриппозной инфекции.

Специфическая профилактика:

Основными противогриппозными мероприятиями являются:

- массовая вакцинация населения перед ожидаемым сезонным повышением заболеваемости гриппом (октябрь - ноябрь)
- экстренная профилактика людей в начале и во время эпидемического распространения гриппа с помощью специфических и неспецифических препаратов.
- раннее специфическое лечение гриппа.
- проведение общих противоэпидемических и организационных мероприятий

Вакцинопрофилактика. Является важным средством борьбы с гриппом. Существует несколько типов гриппозных вакцин, которые постоянно совершенствуются — повышается их иммуногенность, улучшаются технология получения и очистки. Эффективность гриппозных вакцин зависит, главным образом, от степени антигенного соответствия штаммов гриппа, входящих в вакцину, и штаммов, вызывающих данную эпидемию. Поэтому современные вакцины содержат штаммы разных подтипов вируса, которые заменяют каждые 2-3 года в соответствии с эпидемиологическим прогнозом. В настоящее время вакцины готовят из актуальных штаммов вирусов А (H3N2), А (H1N1) и вируса типа В. Существуют:

1. **Цельновирионные вакцины** (1-го поколения)- инактивированные и живые. Живые вакцины содержат аттенуированные штаммы вирусов гриппа (имеются отдельные вакцины для взрослых и детей).

2. **Расщепленные — сплит-вакцины** (2-го поколения), содержат внутренние и наружные антигены вирусов гриппа и не содержат липидов, удаленных после обработки вирионов растворителями или детергентами.

3. **Субъединичные вакцины** (3-го поколения). Являются наиболее очищенными, содержат наружные Н- и N-антигены вирусов гриппа.

Все типы вакцин обладают достаточной иммуногенностью, цельновирионные вакцины наиболее реактогенны, они могут давать аллергические реакции на куриный белок; интраназальное введение обычно предотвращает их развитие. Живые вакцины вызывают более полноценный иммунитет, в том числе клеточный и местный.

Заболеваемость гриппом среди привитых людей, в среднем, снижается в 2-2,5 раза, гриппозная инфекция имеет более легкое течение, снижается количество осложнений.

Экстренная профилактика. Ее проводят во время эпидемического подъема заболеваемости. Различают *плановую* профилактику, организуемую в детских учреждениях, рабочих коллективах и *очаговую* в семьях гриппозных больных.

Для экстренной профилактики применяют противовирусные химиопрепараты: ремантадин (активен только против вирусов типа А), арбидол, амиксин, оксалиновую мазь и др. Используют также интерферон, дибазол, различные индукторы интерферона (например, элеутерококк, продигозан). В дошкольных детских коллективах иногда проводят иммуноглобулинопрофилактику.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) позволяет решать следующие задачи: определять титр АТ к гемагглютинирующему вирусу в исследуемой сыворотке; идентифицировать неизвестный гемагглютинирующий вирус по известным диагностическим сывороткам; устанавливать степень антигенного родства двух вирусов.

Принцип РТГА основан на способности АТ связывать вирусы с гемагглютинином и нейтрализовывать их, лишая возможности агглютинировать эритроциты. Визуально данный эффект и проявляется в «торможении» гемагглютинации. РТГА применяют при диагностике вирусных инфекций для выявления специфических антител-антигемагглютининов в сыворотке больных и идентификации различных вирусов по их гемагглютиниnam, проявляющим свойства Аг (рисунок 215).

Достоинства РТГА: простота техники, быстрота, не требуется стерильной работы, специфичность, дешевизна.

Недостаток РТГА: возможна только с гемагглютинирующими вирусами

Реакция торможения гемагглютинации



Рисунок 188 - Механизм реакции торможения гемагглютинации.

Заимствовано из Интернет-ресурсов

Типирование вирусов проводят в РТГА с набором диагностических типоспецифических сывороток. Для этого в пробирке смешивают равные объемы типоспецифической сыворотки и суспензии вируса и после экспозиции определяют, сохранился ли в смеси вирус, путем добавления суспензии эритроцитов. Агглютинация эритроцитов (осадок на дне пробирки в виде «зонтика») указывает на наличие вируса и отрицательный результат реакции, а отсутствие гемагглютинации (осадок на дне пробирки в виде «пуговички») — на отсутствие вируса в смеси. Исчезновение вируса из смеси вирус + сыворотка расценивается как признак взаимодействия АТ сыворотки и гемагглютинина вируса, т.е. положительный результат реакции.

Ход выполнения работы

Для типирования вируса гриппа готовят ряд последовательных (обычно 2-х кратных) разведений типоспецифических сывороток (H0N1, H1N1, H3N2) в одинаковых объемах (по 0,2 мл); к каждому разведению добавляют такие же объемы (0,2 мл) вируса в титре 4 ГАЕ; смеси выдерживают 30-40 мин, затем ко всем смесям добавляют равные объемы 1% суспензии отмытых эритроцитов и после инкубации при 37°C в течение 120 мин оценивают результат реакции по наличию гемагглютинации в каждой смеси в крестах. Контроли РТГА:

- сыворотки (гемагглютинация должна отсутствовать);
 - эритроцитов (гемагглютинация должна отсутствовать);
 - вируса (должна быть гемагглютинация)
- (рисунок 190).

Титром РТГА считают наибольшее разведение сыворотки, в котором наблюдается полное торможение гемагглютинации («пуговка») (рисунок 189).

Таблица 11- Схема постановки РТГА для типирования вируса гриппа

Ингредиенты	Разведения сыворотки					Контроль сыворотки	Контроль вируса	Контроль эритроцитов
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160			
Изотонический раствор NaCl, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
Типоспецифическая противогриппозная сыворотка 1:5, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
Выделенный вирус в титре 4 ГАЕ, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	-
Экспозиция 30-40 мин при комнатной температуре								
1% суспензия эритроцитов, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

0,2

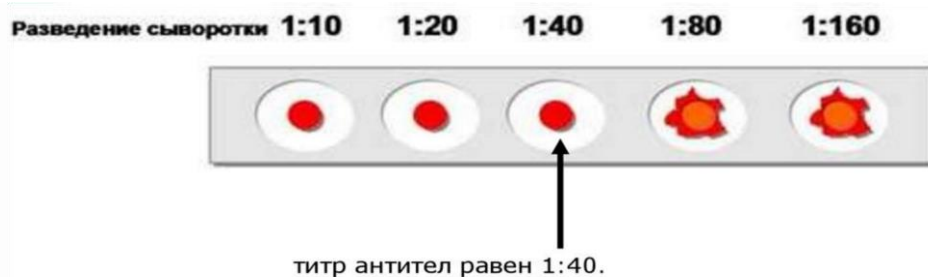


Рисунок 189 - Оценка результата РТГА. Заимствовано из Интернет-ресурсов

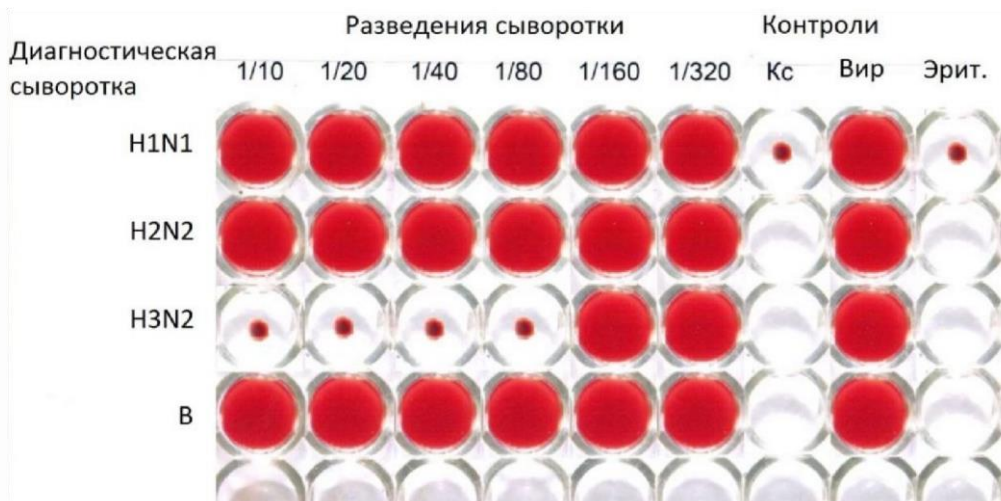


Рисунок 190 - Идентификация выделенного вируса гриппа в РТГА.
Займствовано из Интернет-ресурсов

ПРОТОКОЛ №13 РТГА для типирования вируса гриппа

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Выделенный вирус в титре 4 ГАЕ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выписать направление для исследования. 2. Учесть результат реакции торможения гемагглютинации с диагностическими типоспецифическими сыворотками (по демонстрации). 3. Зарисовать. 4. Оформить заключение. 5. Выписать результат исследования на бланке. 	

Материалы и оборудование:

Планшет из полистерола 48-луночный, изотонический раствор NaCl, набор типоспецифических гриппозных сывороток, 1% суспензия эритроцитов, исследуемый вирус.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.297-299.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 309-314.

3.Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С.231-239.

2.14. Лабораторная работа №14

Тема: Определение комплементсвязывающих антител в сыворотке больного аденовирусной инфекцией

Цель: освоение реакции связывания комплемента для диагностики аденовирусной инфекции

Студент должен знать:

1. Микробиологическую диагностику аденовирусной инфекции **Студент должен уметь:**

1. Определять комплементсвязывающие антитела в сыворотке больного аденовирусной инфекцией
2. Выписать направление и оформить результат серологического исследования (РСК) при аденовирусной инфекции.

Основные теоретические положения

Аденовирусная инфекция - группа острых антропонозных вирусных заболеваний человека, протекающих с поражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, глаз, кишечника, а также лимфоидной ткани, сопровождается умеренной интоксикацией.

Семейство *Adenoviridae* включает в себя 4 рода: *Mastadenovirus* (вирусы млекопитающих), *Aviadenovirus* (вирусы птиц), *Atadenovirus* (геном представителей этого рода обогащен А-Т-парами) и *Siadenovirus* (содержит ген сиалидазы). Медицинское значение имеет только род *Mastadenovirus*. Впервые аденовирусы выделил в 1953 г. У. Роу и соавт. из тканей миндалин и аденоидов детей. В настоящее время известно более 100 серотипов аденовирусов млекопитающих, 49 из которых патогенны для человека. Аденовирусы вызывают около 8% всех клинически выраженных вирусных инфекций человека (рисунок 191).

Структура и репродукция. Вирион аденовирусов массой 150—180МДа не имеет липидной оболочки. Капсид состоит из 252 капсомеров и построен по икосаэдрическому типу симметрии. Геном состоит из линейной двунитевой ДНК (26—45 т.п.н.), которая, связываясь с белками, образует плотную сердцевину вируса и кодирует структурные и неструктурные вирусные белки (рисунок 192). Репродуктивный цикл аденовирусов приводит либо к лизису пораженных клеток либо к латентной инфекции (в лимфоидных клетках).

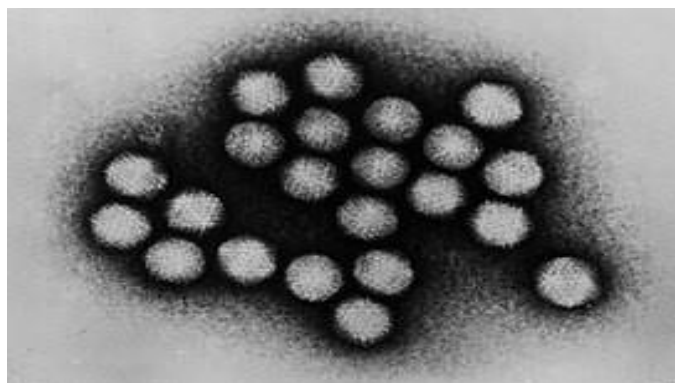


Рисунок 191 – Аденовирусы. Заимствовано из Интернет-ресурсов

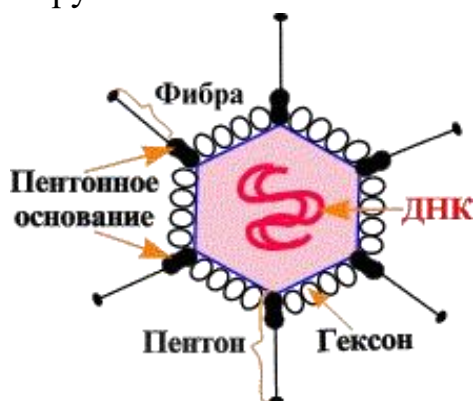


Рисунок 192 - Схема строения аденовирусов. Заимствовано из Интернетресурсов

Ход выполнения работы

1. РСК протекает в 2 фазы:

1) взаимодействие антител, антигена и комплемента, в результате которого свободный комплемент связывается образовавшимся комплексом антиген — антитело (специфическая фаза);

2) индикация реакции сенсibilизированными эритроцитами (неспецифическая фаза).

В РСК используют 2 системы: специфическую, состоящую из антитела (испытуемой сыворотки), антигена и комплемента, а также неспецифическую “индикаторную”, содержащую гемолизин (гемолитическая сыворотка) и взвесь эритроцитов барана.

Антиген соединяется с антителом, затем присоединяется комплемент. Если испытуемая сыворотка содержит антитела, гомологичные взятому антигену, то присутствующий в реагирующей смеси комплемент адсорбируется образуемым комплексом антиген — антитело и теряет способность лизировать сенсibilизированные эритроциты, т. е. без комплемента гемолизин (гемолитическая сыворотка) не разрушает эритроциты (реакция положительная) (таблица 12).

Таблица 12 - Схема постановки реакции связывания комплемента при аденовирусной инфекции

Ингредиенты, мл	1-я пробирка (контроль сыворотки)	2-я пробирка (опытная)	3-я пробирка гемол. система
Сыворотка больного (1:5)	0,25	0,25	-
Изотонический раствор натрия хлорида	0,25	-	-
Антиген	-	0,25	-
Комплемент (в рабочей дозе)	0,25	0,25	-
Гемолитическая сыворотка в тройном титре	-	-	1,0
3% взвесь эритроцитов	-	-	1,0
В термостат 37°C на 45 минут			
Гемолитическая смесь (сенсibiliлизованная)	0,5	0,5	x
В термостат на 40-60 минут, в зависимости от наступления гемолиза в контроле регистрация результатов реакции после наступления гемолиза в контроле			

В тех случаях, когда между антигеном и антителами испытуемой сыворотки нет специфического родства, комплекс не образуется и комплемент остаётся в свободном состоянии. При добавлении гемолитической системы в этом случае несвязанный комплемент вызывает гемолиз сенсibiliлизованных эритроцитов (реакция отрицательная).

2. Исследуемую сыворотку разводят 1:5 и разливают в 2 пробирки по 0,25 мл.

3. В первую пробирку (контроль сыворотки) добавляют 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида.

4. Во вторую пробирку наливают 0,25 мл известного антигена; 5. В обе пробирки добавляют комплемент (в рабочей дозе).

6. В 3 пробирке сенсibiliлизируют гемолитическую систему: к гемолитической сыворотке в тройном титре 1,0 мл добавляют 3% взвесь эритроцитов 1,0 мл

7. Ставят в термостат 37°C на 45 минут.

8. Образовавшийся в опытной пробирке комплекс АГ-АТ сорбирует введенный в реакцию экзогенный комплемент.

9. В первые две пробирки добавляем сенсibiliлизованную гемолитическую смесь по 0,5 мл.

10. Ставим в термостат на 40-60 минут, в зависимости от наступления гемолиза в контроле, регистрация результатов реакции проводится после наступления гемолиза в контроле.

11. Гемолиз эритроцитов в контроле сыворотке, т.е. в первой пробирке должен быть обязательно.

12. Если же в крови больного нет АТ к возбудителю и комплекс АГ-АТ не образуется, то происходит гемолиз эритроцитов барана в результате их

взаимодействия с гемолитической сывороткой в присутствии свободного комплемента.

13. Оценка результатов: при положительном результате наблюдается задержка гемолиза различной степени, которая условно обозначается по четырех крестовой системе:

4+ полная задержка гемолиза (резко положительный результат);

3+ положительный;

2+ слабоположительный;

+ - сомнительный;

- - отрицательный

ПРОТОКОЛ №14

Определение комплементсвязывающих АТ в сыворотке больного.

Исследуемый материал	Ход исследования	Результат
1. Сыворотка больного	<p>1. Выписать направление на исследование</p> <p><i>1 фаза:</i> С помощью пипетки по схеме внести ингредиенты в 3 пробирки: опытную, контроль сыворотки и для гемолитической системы. Поставить пробирки в термостат при 37°С на 45 мин.</p> <p><i>2 фаза:</i> Из пробирки с гемолитической системой в остальные 2 пробирки внести по 0,5 мл, встряхнуть содержимое пробирок и поставить в термостат при 37° С на 4060 минут.</p> <p>2. Учесть результат, сделать заключение и выписать ответ на бланке.</p>	

Материалы и оборудование: сыворотка больного, изотонический раствор натрия хлорида, антиген аденовируса, комплемент (в рабочей дозе), гемолитическая сыворотка в тройном титре, 3% взвесь эритроцитов, пробирки, штатив, термостат.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.181-183.

2.Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 236-238.

3.Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Под редакцией проф. Л.Б. Борисова, - Москва «Медицина», - 1984, С199-202.

2.15. Лабораторная работа №15

Тема: Реакция нейтрализации для серологической диагностики полиомиелита

Цель: освоение механизма реакции нейтрализации по цветной пробе для серологической диагностики полиомиелита

Студент должен знать:

1.Микробиологическую диагностику полиомиелита

Студент должен уметь:

1. Интерпретировать результат реакции нейтрализации по цветной пробе в парных сыворотках.
2. Выписать направление и оформить результат исследования на бланке.

Основные теоретические положения

Полиомиелит - острая энтеровирусная инфекция, преимущественно поражающая детей, чаще протекает бессимптомно. Клинические проявления разнообразны - от легкой формы инфекции с умеренной интоксикацией и симптомами ОРВИ до тяжелого заболевания с поражением ЦНС и развитием вялых параличей конечностей и туловища или с преобладанием менингеального синдрома. Полиомиелит способен к эпидемическому распространению (рисунок 194).

Полиовирусы - типичные представители рода **Enterovirus** и обладают строением и биологическими свойствами, характерными для всех энтеровирусов.

Это мелкие, просто организованные вирусы сферической формы, диаметром 17-30 нм. Геном представлен одноцепочечной плюс-нитевой РНК, которая обладает инфекционной активностью. РНК заключена в капсид, построенный по кубическому типу симметрии. Капсид включает 60 субъединиц, каждая из которых состоит из четырех белков (рисунок 193). Вирусы не культивируются в куриных эмбрионах, не обладают гемагглютинирующими свойствами, хорошо репродуцируются в первичных и перевиваемых культурах клеток из тканей человека и приматов. Размножение вирусов сопровождается цитопатическим эффектом. В культурах клеток под агаровым покрытием энтеровирусы образуют бляшки. Различают три серотипа внутри вида (1, 2, 3), которые не формируют перекрестного иммунитета.

Наибольшей патогенностью обладает серотип 1, именно он вызывает большинство (85 %) паралитических форм болезни.

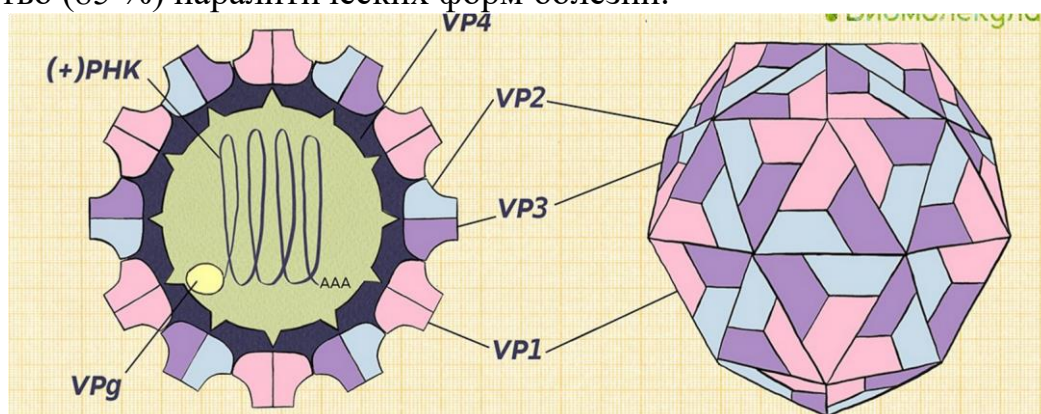


Рисунок 193 - Строение вируса полиомиелита (схема). Заимствовано из Интернет-ресурсов

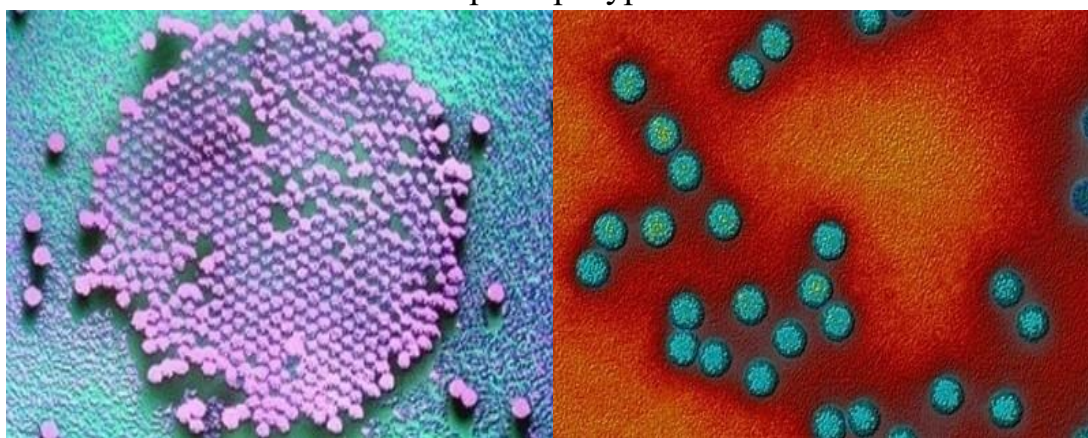


Рисунок 194 - Вирусы полиомиелита (электронная микроскопия). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Лабораторная диагностика

Применяют вирусологический и серологический методы, а также ПЦР. Исследуемый материал: носоглоточное отделяемое, фекалии, спинномозговая жидкость, секционный материал (кусочки спинного и головного мозга, лимфоузлы и др.), кровь. При подозрении на полиомиелит в первые три дня заболевания исследованию подлежит носоглоточное отделяемое. Диагноз ставят на основании клинических признаков, факта выделения вируса и возрастания титра антител к нему как минимум в 4 раза.

Серологический метод. Исследуют парные сыворотки, взятые в начале заболевания и с интервалом в 3-4 недели, в РСК, ИФА или ставят РН на культуре клеток с полиовирусными диагностикумами 1, 2 и 3 типов. О наличии заболевания свидетельствует 4-кратное и более повышение титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой.

Для определения класса специфических сывороточных иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) и их количественного содержания используют метод радиальной иммунодиффузии по Манчини.

Полимеразная цепная реакция. Этот экспресс-метод позволяет идентифицировать полиовирус (выявляя специфическую РНК) и дифференцировать дикие, патогенные штаммы вируса от вакцинных штаммов.

Ход выполнения работы

Для подтверждения диагноза полиомиелита ставят реакцию нейтрализации с парными сыворотками больного.

Одну сыворотку берут в начале заболевания и хранят ее при t 4-8°C или в замороженном состоянии при - 20°C, вторую берут через 20 дней после начала заболевания. Обе сыворотки исследуют одновременно в реакции нейтрализации. Для этого готовят разведения сывороток от 1:4 до 1:1024. Каждое разведение смешивают со стандартной дозой полиовируса I, II и III типа. После часового контакта (при комнатной температуре) каждой смесью заражают по 2 пробирки с взвесью культуры клеток и помещают в термостат на 4-9 дней. Результат реакции оценивают, используя «цветную пробу» Солка (рисунок 195).





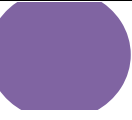
	В питательную среду добавлен индикатор феноловый красный, при нейтральных значениях рН среда имеет красный цвет, при кислых значениях рН – желтый, а при щелочных – малиново-фиолетовый		
 1	 2	 3	Пример: начало исследования - №1 – контроль культуры клеток, №2 – в культуру клеток внесен исследуемый материал от больного А., №3 – в культуру клеток внесен исследуемый материал от больного И.
 1	 2	 3	Результат через 48 часов инкубации

Рисунок 195 - «Цветная проба», механизм.

«Цветная проба» основана на изменении цвета питательной среды, предназначенной для культивирования культуры ткани (среда 199, Игла и др.), содержащей индикатор – феноловый красный (рН 7,4-7,8). Изначально питательная среда имеет красный цвет. Если культура клеток живая, она выделяет продукты жизнедеятельности, закисляет питательную среду, и цвет меняется с красного на желтый. Если поместить вирус в культуру клеток, она погибает, и цвет остается красным. Т.е. если в исследуемой сыворотке присутствуют АТ к полиовирусу, то вирус инактивируется, культура клеток выживает, цвет меняется на желтый - реакция положительная. В случае если антитела отсутствуют или слишком большое разведение сыворотки, вирус остается свободным и убивает культуру клеток, цвет среды остается красным реакция отрицательная. Титром реакции считают наибольшее разведение исследуемой сыворотки, в котором цвет среды изменился на желтый.

О болезни свидетельствует сероконверсия, т.е. нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой (диагностическое значение имеет сероконверсия в 4 раза и выше).

Таблица 13 - Схема постановки реакции нейтрализации по «цветной пробе»

Ингредиенты мл	Разведения исследуемой сыворотки					Контроль	
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	сыв-ки	к-ры клеток
Изотонический раствор NaCl	-	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
Исследуемая сыворотка 1/4	0,25	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25	-
Вирусный диагностикум ТЦД50 (полиовирусы 1, 2, 3 типов)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
Экспозиция при комнатной температуре 60 мин							
Культура клеток, (доза клеток)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Среда 199 с индикатором	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Инкубирование в термостате при 37°C, 7-9 суток							

Примечание: из последней пробирки 0,25 мл выливают в дезинфицирующий раствор.

ТЦД – тканевая цитопатическая доза.

Доза клеток – минимальное количество клеток, которое изменяет цвет среды с красного на желтый на 5-6 день.

При оценке реакции учитывают только два тона: красный и желтый. Изменение цвета среды с красного на желтый свидетельствует о наличии АТ к вирусу полиомиелита.

ПРОТОКОЛ №15

Серологическая диагностика полиомиелита

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Парные сыворотки	1.Выписать направление.	

	больного	2. Учесть результат реакции нейтрализации по «цветной пробе» в парных сыворотках (по демонстрации) 3. Интерпретировать результат реакции. 4. Зарисовать 5. Обосновать серологический диагноз заболевания 6. Оформить результат анализа на бланке.	
--	----------	---	--

Материалы и оборудование: парные сыворотки, изотонический раствор NaCl, вирусный диагностикум, культура клеток, среда 199 с индикатором, термостат, стерильные пробирки, дозаторы

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.305-307.
2. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 322-325.

2.16. Лабораторная работа №16

Тема: РТГА для серологической диагностики клещевого энцефалита

Цель: освоение механизма и принципов интерпретации РТГА для серологической диагностики клещевого энцефалита

Студент должен знать:

1. Методы микробиологической диагностики клещевого энцефалита

Студент должен уметь:

1. Интерпретировать результат РТГА в парных сыворотках для диагностики клещевого энцефалита
2. Выписать направление и результат исследования.

Основные теоретические положения

Клещевой энцефалит (клещевой весенне-летний энцефалит) - природноочаговая трансмиссивная острая вирусная инфекция с преимущественным поражением ЦНС; она отличается полиморфизмом

клинических проявлений и тяжести течения (от легких, стертых форм до тяжелых, прогрессирующих).

Таксономическое положение. Вирус клещевого энцефалита (КЭ) относят к роду *Flavivirus*, входящему в семейство *Flaviviridae*.

Вирусы клещевого энцефалита подразделяются на 3 подтипа (генотипа):

- дальневосточный подтип (основной переносчик – клещ *Ixodes persulcatus*);
- восточно-сибирский или урало-сибирский подтип (основной переносчик – клещ *Ixodes persulcatus*);
- европейский или западный подтип (основной переносчик – клещ *Ixodes ricinus*) (рисунок 231).

Вирус клещевого энцефалита является типичным представителем экологической группы арбовирусов, то есть передается через укусы членистоногих (англ. **arthropod – borne viruses**, что означает переносимые членистоногими, то есть передающиеся через укус членистоногих).

Морфологические признаки. Вирус клещевого энцефалита имеет сферическую форму. Диаметр вирионов составляет 40-60 нм (рисунок 196). **Геном** вируса клещевого энцефалита представлен молекулой однонитевой плюс-РНК. Геном заключён в белковый капсид, который имеет кубический тип симметрии. Форма нуклеокапсида - двадцатигранник. В состав нуклеокапсида входит белок С. Снаружи нуклеокапсид покрыт суперкапсидом, который состоит из липидной мембраны и встроенных в нее гликопротеиновых шипов длиной около 10 нм. Гликопротеиновые шипы содержат Е-белок и обладают гемагглютинирующими свойствами. В суперкапсид встроен также белок М. Белок Е участвует в связывании вирусной частицы с клеточной мембраной и слиянии вирусной и клеточной мембран. На поверхности вирусных частиц белок Е представлен димером (состоит из двух молекул). При этом каждая молекула димера состоит из трех доменов.

В геноме вируса клещевого энцефалита закодированы кроме структурных белков также неструктурные белки NS1 – NS5 и вирусная РНК-полимераза, которые участвуют в репродукции вируса в инфицированной клетке.

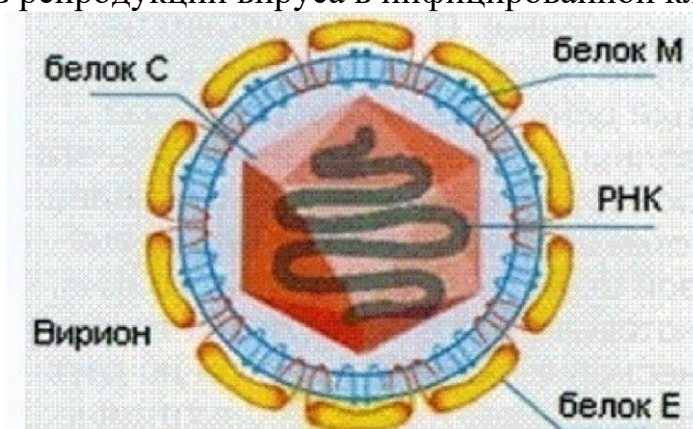


Рисунок 196 - Строение вируса клещевого энцефалита. Заимствовано из Интернет-ресурсов

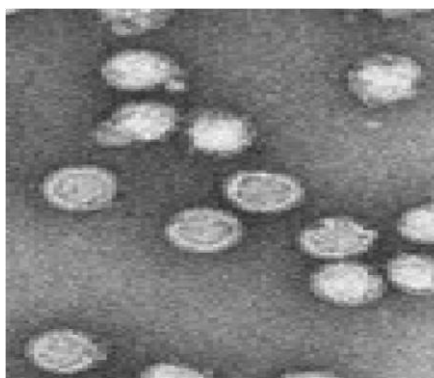


Рисунок 197 - Вирус клещевого энцефалита. Заимствовано из Интернетресурсов

Лабораторная диагностика. В качестве исследуемого материала используют кровь, спинномозговую жидкость больных людей, мозг погибших людей, иксодовых клещей. Исследование клещей на наличие в них вирусного антигена проводится методом иммуноферментного анализа, а на наличие вирусной РНК – методом ПЦР.

Лабораторная диагностика КЭ основана на обнаружении возбудителя в острой стадии заболевания, выявлении прироста титра специфических антител у реконвалесцентов, а также на выделении вируса от кровососущих членистоногих и их прокормителей, отловленных в природных очагах инфекции.

Серологическая диагностика. Основные серологические методы, используемые для диагностики КЭ - это РСК, РТГА, РН, а также методы ускоренной диагностики - РИФ, ИФА, РНГА, реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА) (рисунок 199).

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).

РТГА основана на блокаде, подавлении антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты, реакция используется для идентификации вируса или выявления противовирусных антител в сыворотке крови больного (рисунок 198).

Реакция торможения гемагглютинации проявляется блокадой антигенов вирусов (гликопротеиновых шипиков – гемагглютининов) антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты. Сыворотки считают положительными, если они подавляют гемагглютинацию в разведении 1:10 и выше. Двухкратные разведения сыворотки взаимодействуют с постоянной дозой антигена – разведением, содержащим 8 АЕ Аг. Титром сыворотки считают наивысшее разведение, которое вызывает задержку гемагглютинации с 8 АЕ Аг (Рисунок 200).

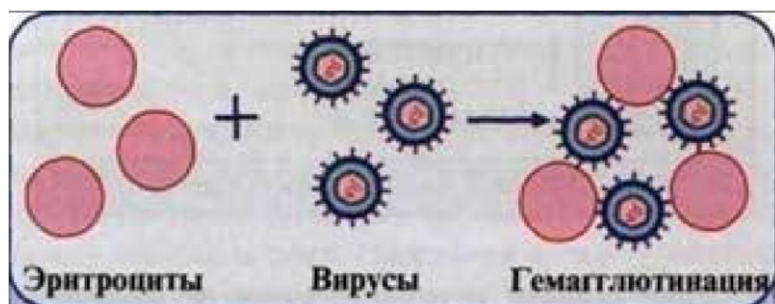


Рисунок 198 - Механизм реакции вирусной гемагглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов

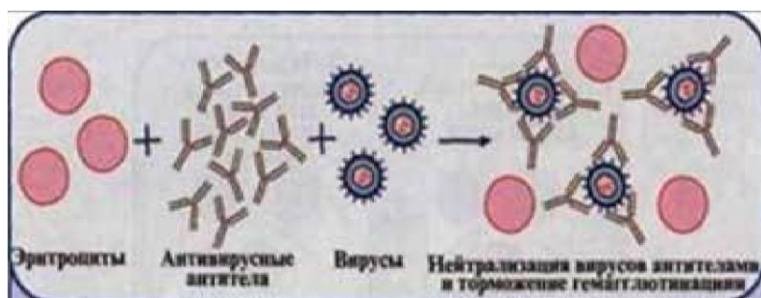
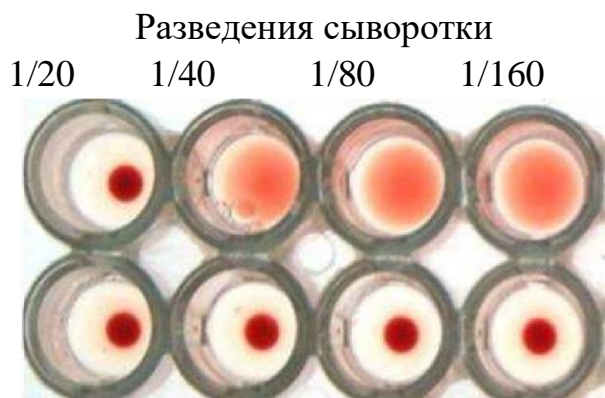


Рисунок 199 - Механизм реакции торможения гемагглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов



сверху сыворотка №1, внизу - №2
Рисунок 200 - РТГА с парными сыворотками.

Антигемагглютинины к вирусу КЭ, которые определяют в РТГА, при острой инфекции появляются в сыворотках больных на 1-й неделе заболевания, нарастая до максимальных титров к 5-6-й неделе реконвалесценции. Высокие титры антигемагглютининов наблюдают у реконвалесцентов в течение 6-8 мес. В последующие 2 года антитела, как правило, сохраняются, постепенно снижаясь в титрах.

Ход выполнения работы

1. В сопроводительном документе наряду с паспортными данными о каждом больном (фамилия, имя, отчество, возраст, профессия, место жительства)

следует указать, где именно имело место нападение клещей (район, деревня), а также дату начала заболевания и взятия материала.

2. Для серодиагностики необходимы парные пробы сывороток крови. Первую берут в первую неделю болезни, а вторую - через 10-15 дней после первой. При подостром или хроническом течении процесса берут еще одну пробу сыворотки через 1-2 мес.

3. В РТГА двукратные разведения сыворотки взаимодействуют с постоянной дозой антигена - разведением, содержащим 8 ГАЕ антигена. Реакцию ставят в объеме 4 капли: по 1 капле антигена и сыворотки и 2 капли 0,4% взвеси эритроцитов в фосфатном буфере. Реакция протекает в два этапа:

- первый - соединение сывороток и антигенов и контакт их при температуре 4 °С в течение 18-20 ч;
- второй - добавление эритроцитов, экспозиция 20-40 мин и учет результатов.

Титром сыворотки считают наивысшее разведение, которое вызывает задержку гемагглютинации с 8 ГАЕ антигена. Сыворотки считают положительными, если они подавляют гемагглютинацию в разведении 1:10 и выше.

ПРОТОКОЛ №16 РТГА для серологической диагностики клещевого энцефалита

День	Материал для исследования	Ход исследования	Результат
1.	Парные сыворотки больного	1. Выписать направление на исследование. 2. Учесть результат реакции торможения гемагглютинации в парных сыворотках (по демонстрации) 3. Зарисовать 4. Оформить заключение с обоснованием серологического диагноза заболевания. 5. Выписать результат исследования.	

Материалы и оборудование: планшет из полистерола 48-луночный, парные сыворотки, изотонический раствор NaCl, вирус клещевого энцефалита 8 ГАЕ, 0,4% взвесь эритроцитов в фосфатном буфере, термостат, дозаторы.

Литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторным занятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.181-183.

2.Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 256-260.

Заключение

Таким образом, для микробиологической диагностики заболеваний микробной этиологии используются следующие методы:

1. Микроскопический метод является самым быстрым, простым и доступным, но и не лишенным недостатков: низкими чувствительностью и информативностью. Тем не менее он широко применяется для диагностики микозов, протозойных и некоторых бактериальных инфекций самостоятельно, в остальных случаях - в комплексе с другими методами.

2. Культуральный (бактериологический, вирусологический, микологический, протозоологический) – основной метод диагностики инфекционных заболеваний, за исключением тех возбудителей, которые относятся к некультивируемым.

3. Биологический метод (биопробы) – заключается в заражении исследуемым материалом восприимчивых животных с последующим выделением и идентификацией чистой культуры возбудителя. Используется для определения наличия токсинов и их типа, выявления факторов патогенности и оценки вирулентности возбудителя.

4. Серологический метод заключается в использовании серологических реакций с целью выявления антител в крови или другом материале у больных, переболевших, вакцинированных. В настоящее время широко применяется иммуно-ферментный анализ (ИФА), иммуноблотинг для диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

5. Аллергологический метод заключается в выявлении повышенной чувствительности к микробным, а также немикробным антигенам (аллергенам) с помощью кожных проб. Достоинства метода – быстрота получения результатов, ранний метод при ГЧНТ, возможность проведения десенсибилизирующей терапии. Недостатки – поздний метод при ГЧЗТ, опасность осложнений (*in vivo*).

6. Молекулярно-генетический метод заключается в обнаружении и идентификации возбудителя в исследуемом материале путем определения нуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР, масс-спектрометрии, ДНК-гибридизации и других методов молекулярной биологии.

Наряду с уже существующими методами, продолжается разработка новых эффективных технологий идентификации возбудителей и определения их антибиотикочувствительности в короткие сроки (экспресс-методов).

Еще одной проблемой медицины является ускорившаяся в последнее время эволюция патогенных и сапрофитных микроорганизмов, что ведет к появлению новых и возврату старых инфекционных заболеваний. Увеличилось количество хронических, смешанных, внутрибольничных инфекций, произошло расширение ареала инфекционных заболеваний. Все это делает актуальным изучение основ медицинской микробиологии, вирусологии, иммунологии для сегодняшних студентов, чтобы завтра стать грамотными врачами.

Авторы желают читателям пособия успехов в учебе и в стремлении стать высококвалифицированными специалистами в любой области медицины!

Список использованных источников

1. Засорин Б.В. Руководство для освоения практических навыков и умений пообщей микробиологии: учебное пособие/ Б.В. Засорин, Б.С. Урекешов, С. Ж. Мусабаева.- Актобе, 2017.-65с.
2. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: атлас/ред.: Быков А.С., Воробьев А.А., Зверев В.В. - 2-е изд., доп. – М.: Мед. информ. агенство, 2008. 272 с.: ил.
3. Донецкая Э. Г-А. Клиническая микробиология: руководство дляспециалистов клинической лабораторной диагностики/ Э. Г-А. Донецкая. – М. .: ГЭОТАР -Медиа, 2011. -480с.
4. Камышева К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие/ К.С. Камышева. – 2-е изд. – Ростов н/Д: Феникс, 2009, 2012. – 281 с.
5. Микробиология, вирусология и иммунология: руководство к лабораторнымзанятиям: учебное пособие/ ред.: В.Б. Сбойчаков, М.М.Карапац. -М.: ГЭОТАР Медиа, 2012. -320с.
6. Омарова Л.А. Введение в клиническую микробиологию: учебное пособие/ Л.А. Омарова. -Астана: АҚНҰР, 2017. -314 с.
7. Рахимжанова Б.К. Жалпы микробиология: оқу - әдістемелік құрал/ Б. К.Рахимжанова, Ы. О. Кайрханова. -Алматы: ССК, 2018. -76 б.
8. Микробиология, вирусология и иммунология, руководство к лабораторнымзанятиям. Учебное пособие // под редакцией профессора В. Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С.181-183.
9. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям. Подредакцией акад. РАН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, 2015,- С. 256-260.
10. Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Общая микробиология и общая санитарнаямикробиология: Учебное пособие/2-е изд. стер. Санкт-Петербург: ООО «Издательство Лань», 2022. – 224с.
11. Госманов Р. Г. Лабораторная диагностика инфекционных болезней:Учебное пособие 3-е изд. стер. / Госманов Р. Г., Равилов Р. Х., Галиуллин А. К., Нургалиев Ф. М., Идрисов Г. Г.: - СПб. Лань, 2021. – 196с.
12. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникоймикробиологических исследований: Учебное пособие 5-е изд. стер. / А.С. Лабинская - СПб.: Лань, 2021. - 588 с.
13. Казимирченко О.В. Практикум по микробиологии: Учебное пособие/Казимирченко О.В., Котлярчук М.Ю., СПб. Лань, 2020. – 124с.
14. Нетрусов, А. И. Микробиология: теория и практика в 2 ч. Часть 1:учебник для бакалавриата и магистратуры / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — Москва: Издательство Юрайт, 2019. — 315 с.

15. Ғ. Т. Алимжанова Жеке микробиология: оқу құралы. 1-ші бөлім. Медициналық бактериология / Ғ. Т. Алимжанова [и др.]. - Алматы : CyberSmith, 2017. - 380 б.
16. Н. М. Колычев Руководство по микробиологии и иммунологии: учебное пособие / Н. М. Колычев, В. Н. Кисленко [и др.]. - 2-е изд. - М. : ИНФРА-М, 2017. - 230 с.
17. Кисленко В. Н. Микробиология: Учебник/ Кисленко В. Н., Азаев Мамедьяр Шакир оглы –Москва: Издательство: ИНФРА-М, 2017. - 270, [1] с.
18. Камышева К. С. Основы микробиологии и иммунологии: Учебное пособие /Однотомник. - Ростов-на-Дону: Издательство: Феникс, 2015. - 381, [1] с.
19. Микробиология: учебник / Под ред. Зверева В.В.. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 384 с.
20. Беляев, С.А. Микробиология: Учебное пособие / С.А. Беляев. - СПб.:Лань П, 2016. - 496 с.
21. Волина, Е.Г. Частная микробиология: Учебное пособие / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова. - М.: РУДН, 2016. - 222 с.
22. Госманов, Р.Г. Санитарная микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова. - СПб.: Лань, 2018. 260 с.
23. Госманов, Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин и др. - СПб.: Лань, 2019. - 496 с.
24. Дейша-Сионицкая, М.А. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / М.А. Дейша-Сионицкая. - СПб.: Лань, 2016. - 588 с.
25. Емцев, В.Т. Микробиология: Учебник для бакалавров / В.Т. Емцев. - Люберцы: Юрайт, 2016. - 445 с.
26. Кисленко, В.Н. Часть 1. Общая микробиология. В 2-х т. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. - М.: Инфра-М, 2017. - 624 с.
27. Королев, А.А. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена: В 2 ч. Ч. 1: Учебник / А.А. Королев. - М.: Академия, 2018. - 288 с.
28. Королев, А.А. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена. В 2 ч. Ч.1: Учебник / А.А. Королев, Ю.В. Несвижский, Е.И. Никитенко. - М.: Academia, 2017. - 640 с.
29. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина и др. - СПб.: Лань, 2017. - 624 с.
30. Левинсон, У. Медицинская микробиология и иммунология / У. Левинсон. - М.: Бином, 2015. - 1181 с.
31. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2016. - 480 с.

32. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария и гигиена: В 2 ч. Ч. 2: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Академия, 2016. - 192 с.
33. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2017. - 480 с.
34. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2018. - 399 с.
35. Нетрусов, А.И. Микробиология: Учебник / А.И. Нетрусов. - М.: Academia, 2016. - 416 с.
36. Рубина, Е.А. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник /
Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. - М.: Форум, 2019. - 320 с.
37. Рубина, Е.А. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник /Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. - М.: Форум, 2018. - 248 с.
38. Рыбальченко, О Микробиология, вирусология и / О Рыбальченко. - СПб.: Спецлит, 2018. - 81 с.
39. Сбойчаков, В.Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / В.Б. Сбойчаков. - СПб.: Спецлит, 2017. 608 с.
40. Сидоренко, О.Д. Микробиология: Учебник / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Вой. - М.: Инфра-М, 2017. - 29 с.