



МИКРОБНЫЙ РОМАН

**Часть 1: Систематика и морфология
микробов. Методы исследований.
Учение об инфекции**

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

*ОТ СТУДЕНТОВ СТУДЕНТАМ
С ЛЮБОВЬЮ
(И НАВЕРНЯКА С КУЧЕЙ ОШИБОК)*

БГМУ, 2018
Редакция первая



Предисловие

– Я так и знала, что вы бывший двоечник!
– Оставим в покое мое тёмное прошлое...

Толчком к созданию этого студенческого методического пособия послужила нехватка литературных и электронных источников, которые бы в довольно сжатом виде содержали весь или почти весь требуемый от студентов материал. Все предлагаемые для изучения пособия либо перегружены откровенно лишней для студента лечебного (или педиатрического) факультета информацией, либо имеют существенные пробелы в тех или иных областях, изучаемых в соответствии с учебной программой БГМУ.

В результате значительная часть времени затрачивается на поиск подходящих источников, а сама подготовка (если она основательна) предполагает постоянное смещение фокуса с одного источника на другой.

Первая часть серии «Микробный роман», в отличие от последующих, в основе своей является лишь кратким изложением отдельных глав двух кафедральных пособий, открывающих список основных материалов. Полнота освещения вопросов в этих пособиях, сама по себе будучи характеристикой положительной, на деле оборачивается против студента, которому предлагается за половину семестра изучить такой же объем текстового материала, как, скажем, в курсе гистологии – за целый год. Разумеется, для подготовки к итоговым занятиям и экзамену они совершенно не годятся, если не считать студентов уникального прилежания.

Следует также отметить, что содержание этой части не полностью покрывает программу первого семестра и соответствующие ей экзаменационные вопросы.

К сожалению, обратной стороной любой компиляции (и особенно той, что выполняется студентами) являются неизбежные ошибки, неточности и потеря значимой информации. Это пособие никем не рецензировалось, поэтому мы призываем относиться ко всему изложенному с толикой подозрения и при любых сомнениях обращаться к авторитетным источникам.

Обращаем ваше внимание на то, что содержание интерактивно: по нажатию на название вопроса осуществляется переход на соответствующую страницу.

Свои замечания можно присылать на электронную почту: violinm@yandex.ru.

Составители

Белорусский государственный медицинский университет, выпуск (надеемся) 2021 г.:
Лера Кисейка (лечебный факультет).

Основные материалы

1. Шабан Ж. Г. Общая медицинская микробиология : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан [и др.]. – Минск: БГМУ, 2011. – 320 с.
2. Методы исследования в микробиологии : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан [и др.]. – Минск: БГМУ, 2010. – 124 с.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учеб : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 1 – 448 с.
4. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учеб. для мед. вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб: СпецЛит, 2008. – 4-е изд., испр. и доп. – 767 с.
5. Микробиология, вирусология, иммунология : практикум для лечебного и педиатрического факультетов / Т. А. Канашкова [и др.]. – Минск: БГМУ, 2017. – 120 с.
6. ЭУМК кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
1. Микробиология: понятие, задачи, методы.....	5
2. Этапы развития микробиологии. Развитие микробиологии в РБ.....	6
3. Мир микроорганизмов. Основные формы бактерий.....	8
4. Принципы систематики микроорганизмов.....	10
5. Цитоплазматические структуры бактериальной клетки.....	12
6. Поверхностные структуры бактериальной клетки. Окраска по Граму.....	14
7. Питание микроорганизмов.....	17
8. Особенности метаболизма у прокариотов.....	19
9. Дыхание микроорганизмов.....	20
10. Рост и способы размножения бактерий. Покоящиеся формы микроорганизмов.....	21
11. Работа микробиологической лаборатории. Правила техники безопасности.....	23
12. Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования.....	25
13. Методы окраски микроорганизмов. Виды микроскопов.....	26
14. Материал для микробиологического исследования.....	29
15. Культуральный (бактериологический) метод исследования.....	31
16. Питательные среды. Рост бактерий в жидких и на плотных питательных средах...	33
17. Методы выделения чистых культур бактерий.....	35
18. Методы идентификации выделенной чистой культуры бактерий.....	36
19. Сравнительная характеристика микробиологических методов исследования.....	38
<i>20-29. Вопросы генетики, экологии микробов не рассматриваются в данном пособии</i>	
30. Учение об инфекции. Механизмы и пути передачи возбудителей.....	39
31. Роль микроорганизма в инфекционном процессе. Патогенность и вирулентность...	41
32. Факторы патогенности (вирулентности) микроорганизмов.....	43
33. Типы экзотоксинов и их биологические свойства.....	45
34. Роль макроорганизма и внешних факторов в инфекционном процессе.....	46
35. Классификации и примеры инфекционных заболеваний: часть 1.....	48
36. Классификации и примеры инфекционных заболеваний: часть 2.....	50
37. Понятие об источнике и механизмах передачи инфекции.....	51
38. Биологический (экспериментальный) метод исследования.....	52
<i>39-42. Вопросы химиотерапии инфекций не рассматриваются в данном пособии</i>	
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Методы окраски микропрепаратов.....	54

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление
АЦ – аденилатциклаза
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ГНТ – гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ГЦ – гуанилатциклаза
ЖСА – желточно-солевой агар
ИФА – иммуноферментный анализ
КА – катехоламины
КС – клеточная стенка
ЛПС – липополисахарид
м/о – микроорганизмы
МПА – мясопептонный агар
МПБ – мясо-пептонный бульон
НМ – наружная мембрана
РИФ – реакция иммунофлюоресценции
РСК – реакция связывания комплемента
ЦНС – центральная нервная система
ЦП – цитоплазма
ЦПМ – цитоплазматическая мембрана
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

1. Микробиология: определение, разделы, связи с другими науками, методы исследования. Задачи медицинской микробиологии. Значение микробиологии в деятельности врача. Достижения и проблемы микробиологии второй половины XX и начала XXI веков

1.1. Определение, разделы микробиологии и связь с другими науками

Микробиология – это наука о морфологии, физиологии, генетике, экологии и эволюции *микроорганизмов* (живых организмов с размерами до 0,1 мм).

Разделы микробиологии:

а) по объекту исследования:

- общая М. – общие закономерности строения, жизнедеятельности, генетика микроорганизмов, их взаимоотношения с окружающей средой;
- частная М. – то же, но для отдельных представителей микромира.

б) по целям исследования:

- *медицинская*;
- биотехнологическая (биосинтез веществ с использованием м/о);
- ветеринарная;
- сельскохозяйственная (синтез удобрений, борьба с вредителями);
- морская, космическая и др.

Микробиология как наука тесно **связана** с биохимией, биофизикой, генетикой, молекулярной биологией. Микроорганизмы – это наиболее популярные объекты исследования в фундаментальных изысканиях по генетике и биохимии. Микробиология и химия постоянно конкурируют при выборе наиболее экономичных путей синтеза различных органических веществ.

1.2. Медицинская микробиология: задачи и методы исследования

Медицинская микробиология – это наука о патогенных и сингенных для человека микроорганизмах, их взаимодействии между собой и с окружающей средой. Она включает *клиническую М.* (заболевания, диагностика, проблемы резистентности), *эпидемиологическую М.* (м/о в популяции человека, пути передачи инфекций), *санитарную М.* (влияние микрофлоры окружающей среды) и *фармацевтическую М.*

В **задачи** медицинской М. входит:

- 1) изучение структуры и свойств патогенных м/о;
- 2) изучение взаимоотношений м/о с организмом человека и основ их патогенности;
- 3) разработка методов контроля численности м/о (асептика, химиотерапия);
- 4) создание вакцин и средств специфической иммунотерапии (в т.ч. неинфекционных заболеваний);
- 5) разработка методов ранней и точной диагностики инфекционных заболеваний.

Собственно **микробиологические методы исследования** включают *микроскопический, культуральный, серологический, молекулярно-генетический, биологический, аллергологический*. Используются и методы других наук (физики, химии, цитологии).

1.3. Достижения и проблемы современной микробиологии

Благодаря применению новейших методов исследования (особенно молекулярных) **современная М.** предлагает новые подходы к созданию вакцин, использование м/о в биотехнологиях (в т.ч. для синтеза органических веществ), обеспечивает высокую вероятность успешной трансплантации органов и тканей, а также значительное снижение инфекционной заболеваемости и смертности.

Вызовами для современной М. можно считать появление новых инфекций, формирование лекарственной устойчивости, увеличение числа иммунных патологий.

2. Этапы развития микробиологии. Работы Л. Пастера, Р. Коха, И. И. Мечникова, их роль в становлении и развитии мировой науки. Развитие микробиологии в Республике Беларусь

2.1. Зарождение и развитие микробиологии до начала XX в.: этапы 1-3

Этап 1 – эмпирический (до XVI в.):

- о существовании м/о не было известно, природу болезней считали магической;
- отдельные исследователи предполагали, что болезни вызываются невидимыми живыми агентами («миазмы» Гиппократ, «контагии» Фракасторо);
- применение **карантина** и **изоляции**, прижигание ран, неосознанное использование м/о в виноделии, хлебопечении, сыроделии.

Этап 2 – морфологический (до сер. XIX в.):

- прорывом стало создание **Левенгуком** первых **микроскопов** с 150-300 кратным увеличением;
- открытие мира микроорганизмов, описание их внешнего вида;
- опыты по **самозаражению**, доказывающие роль м/о в возникновении инфекций (чума, холера, сыпной тиф, гепатит).

Этап 3 – физиологический (до нач. XX в.):

- **Дженнер** в 1796 г. провел первую **вакцинацию**, привив человеку вирус коровьей оспы с целью предотвратить заражение натуральной оспой;
- **Ивановский** на опытах с возбудителем мозаичной болезни табака доказал существование **вирусов**;
- **Луи Пастер** – основоположник современной микробиологии:
 - опроверг **теорию самозарождения** микроорганизмов;
 - доказал роль м/о в процессах **брожения**;
 - изобрел методы **пастеризации** и стерилизации сухим жаром;
 - открыл многие патогенные м/о (стафилококк, пневмококк, клостридии);
 - создал первые **аттенуированные (ослабленные) вакцины** (холера, сибирская язва, бешенство);
 - доказал формирование искусственного иммунитета;
- **Роберт Кох** – основоположник современной бактериологии и эпидемиологии:
 - сформулировал **триаду Генле-Кох**: чтобы доказать связь заболевания с м/о, нужно выделить его от больного, получить чистую культуру и заразить ею лабораторное животное;
 - открыл возбудителя сибирской язвы, холерный вибрион, туберкулезную палочку;
 - ввел в практику метод выделения чистых культур на твердых питательных средах.

2.2. Развитие микробиологии после начала XX в.: этапы 4-5

Этап 4 – иммунологический (до сер. XX в.):

- **Мечников** – автор **клеточной** теории иммунитета:
 - открыл **фагоцитоз** и изложил фагоцитарную теорию иммунитета;
 - изучал микробиологию и эпидемиологию холеры, чумы, брюшного тифа, туберкулеза;
 - изучал проблемы **старения**, ввел понятие «геронтология»;
- **Эрлих** – автор **гуморальной** теории иммунитета:
 - открыл антитоксические антитела, изучал свойства антитоксических сывороток;
 - открыл тучные клетки;
 - основоположник химиотерапии (терапия сифилиса препаратами мышьяка);
- **Флеминг** в 1929 г. получил первый антибиотик – пенициллин (в массовое производство выпущен в 1941 г.).

Этап 5 – современный (с сер XX в.):

- широкое использование **молекулярных методов исследования**, расшифровка геномов, функций генов и белков;
- развитие **генной инженерии**, получение рекомбинантов, новых видов вакцин и диагностических препаратов;
- определена **молекулярно-генетическая организация вирусов** и механизмы их взаимодействия с клетками, открыты провирусы и прионы;
- стремительное развитие **иммунологии**: открытие новых антигенов, расшифровано строение антител, получены моноклональные антитела, изучены иммунодефициты и получены иммуномодуляторы;
- разработаны новые **способы диагностики** заболеваний (ИФА, РИА, ПЦР и др.).

2.3. Микробиология в Республике Беларусь

- в 1911 г. в г. Минске организована первая **Пастеровская станция**;
- в 1923 г. в составе медицинского факультета БГУ создана **кафедра микробиологии**;
- основателем Пастеровской станции, кафедры и микробиологии в РБ как таковой считается **Борис Яковлевич Эльберт**, внесший также большой вклад в разработку **вакцины против туляремии** и кожного метода ее введения;
- на протяжении более 20-ти лет кафедру возглавлял **Алексей Петрович Красильников**, изучавший проблемы лептоспироза и внутрибольничных инфекций;
- в настоящее время микробиологические исследования проводятся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, институте микробиологии НАН РБ, в БГУ и медицинских университетах, РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии и др.

3. Мир микроорганизмов. Общие с другими организмами и специфические особенности микроорганизмов. Отличия прокариот от эукариот. Основные формы бактерий

3.1. Общие с другими организмами и специфические особенности микроорганизмов

К м/о относят **три типа** организации живого:

- **доклеточные формы**: вирусы и прионы;
- **прокариоты**: бактерии и археи;
- **некоторые эукариоты**: микроскопические животные, растения и грибы до 0,1 мм.

Общие черты м/о с другими организмами:

1) состоят из тех же химических элементов и имеют в структуре те же химические соединения (белки, липиды, углеводы, НК);

2) имеют те же механизмы обеспечения энергией и биохимические процессы (с некоторыми отличиями).

Отличительные черты м/о:

1) малые размеры: до 450 нм у вирусов, до 10 мкм у большинства бактерий, до 100 мкм у простейших и микроскопических грибов;

2) относительная простота строения;

3) повсеместное распространение;

4) превосходство биомассы м/о над биомассой животных и растений;

5) высокие темпы размножения и адаптации к окружающей среде, генетическое разнообразие;

6) высокая активность метаболизма и его пластичность (разнообразие);

7) являются ключевым звеном круговорота веществ и энергии.

3.2. Отличия прокариот и эукариот

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Ядро	Нуклеоид без гистонов, гаплоидный набор	Линейная ДНК, диплоидный набор;
Внехромосомные генетические элементы	Плазмиды, транспозоны	ДНК митохондрий
Деление	Бинарное (амитоз)	Митоз и мейоз
Мембранная система	Высокоорганизованных органелл <u>нет</u>	Высокоорганизованные мембранные и немембранные органеллы
Рибосомы	70S	80S
Состав клеточной стенки	Пептидогликан	Целлюлоза, хитин, отсутствует
Эндоцитоз	Нет	Есть
Устойчивость к гамма-облучению	Очень высокая	Низкая
Анаэробизм	Факультативный и облигатный	Факультативный

3.3. Основные формы бактерий

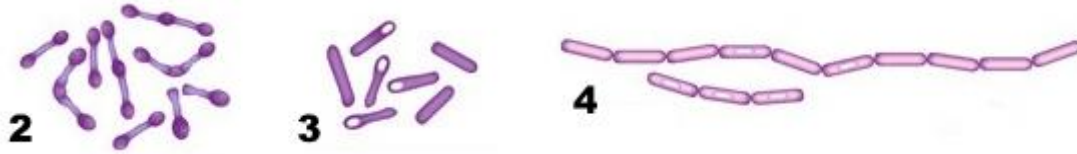
I. Кокки (шаровидные бактерии ~ 1 мкм):



1) **микрোকки** – поодиночке, *непатогенны*;

- 2) *диплококки* – парами;
- 3) *стрептококки* – в виде цепочек;
- 4) *тетракокки* – по четыре, *непатогенны*;
- 5) *стафилококки* – в виде гроздьев винограда;
- 6) *сарцины* – в виде пакетов кубической формы (чаще по 8), *непатогенны*.

II. Палочки (до 10 мкм):



- 1) *энтеробактерии* – прямые, располагаются беспорядочно;
- 2) *коринебактерии* – попарно, буквой «V», на концах расширения с *волютином*;
- 3) *кловстридии* – форма теннисной ракетки (на конце эндоспора);
- 4) *бациллы* – располагаются цепочками, образуют эндоспоры.

III. Извитые бактерии:



- 1) *вибрионы* – короткие, с одним изгибом (форма запятой);
- 2) *спирохеты* – длинные и тонкие, много изгибов;
- 3) *спириллы* и *кампилобактерии* – длинные, с двумя-тремя изгибами;
- 4) *актиномицеты* – ветвятся по типу мицелия грибов.

IV. Полиморфные бактерии (микоплазмы) – изменяют форму в зависимости от условий.

4. Принципы систематики микроорганизмов. Классификация и номенклатура бактерий. Таксономические единицы. Вид и критерии вида у микроорганизмов. Понятие о типовом виде

4.1. Принципы систематики микроорганизмов

В систематике используют один из следующих **принципов**:

1) **феносистематика** – анализ совпадения большого числа признаков (морфологических, физиологических, биохимических и др.) с определением **коэффициента сходства** – доли признаков одновременно отсутствующих или одновременно присутствующих у обоих организмов (но не имеющих только у одного из них). Значение =1 означает 100% сходство, а <0,02 означает абсолютное несходство.

2) **хемосистематика** – анализ структуры химических соединений поверхностных образований бактериальной клетки.

3) **геносистематика** – анализ степени сходства геномов:

- сравнение процентного соотношения Г/Ц;
- сравнение коэффициента подобия $(Г+Ц)/(Г+Ц+Т+А)$;
- определение плазмидного состава;
- *секвенирование* – определение последовательности нуклеотидов, чаще в рРНК.

4) **смешанный подход** (наиболее предпочтителен) – комбинация описанных выше.

4.2. Классификация и номенклатура бактерий. Таксономические единицы. Понятие о типовом виде

Классификация – это распределение организмов в соответствии с их общими свойствами по группам более высокого порядка – **таксономическим единицам** (**таксонам**). В настоящее время ведущий подход при классификации – генетический.

Согласно трехдоменной системе, одноклеточные прокариотные микроорганизмы относятся к доменам **Бактерии** (**Эубактерии**), и **Археи**. Третий домен – **Эукариоты** – включает все живые организмы, клетки которых содержат ядро. В нашем курсе микробиологии изучаются только микроорганизмы домена **Бактерии**.

Археи внешне сходны с бактериями, но их метаболические пути во многом уникальны, а некоторые схожи с теми, что используют эукариоты. Ни один из известных представителей архей не является ни паразитом, ни патогенным организмом. Они обитают в горячих источниках, почвах, океанах, соленых озерах.

Основными таксонами, следующими за **доменом**, являются: **тип, класс, порядок, семейство, род** и **вид**. **Вид** – это эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих экологическое единство, близкий генотип и сходные (в стандартных условиях) морфологические, физиологические, биохимические признаки и антигенную структуру.

Типовой вид – это некоторый вид, за которым неотрывно закреплено его родовое название. Зачастую он обладает наиболее характерными признаками своего рода, хотя это и не обязательное условие.

Смысл назначения типового вида заключается в том, что если какой-либо другой вид в дальнейшем будет признан заслуживающим выделения в отдельный род, он должен будет получить новое название, а старое родовое название сохранится за типовым и родственными ему видами. Иначе говоря, типовой вид ни при каких обстоятельствах не может быть отнесен к другому роду, так как по классификации стоит в основе своего.

Номенклатура бактерий определяет их название в соответствии с международными правилами. Все таксоны до вида определяются **одним** словом (например, у кишечной палочки: тип *Proteobacteria* или род *Escherichia*), а вид – **двумя** словами, включая **родовое название** (*Escherichia coli*).

4.3. Подвидовые таксоны. Критерии вида у микроорганизмов

Внутри вида популяции микроорганизмов могут в некоторой степени отличаться друг от друга, и тогда их выделяют в **подвидовые таксоны**:

1) **варианты (вары)** – отличаются по свойствам, но не так сильно, чтобы быть выделенными в отдельный вид. Различают *серовары* (по антигенам), *ферментовары*, *геновары*, *эковары* и др.;

2) **чистая культура** – совокупность м/о одного вида или варианта, полученная из одного образца материала и содержащаяся в определенном объеме среды (например, в пробирке);

3) **штамм** – чистая культура, полученная из определенного источника в определенное время, с известными свойствами, которые могут отличаться от свойств других штаммов (например, выделенных в другом месте или в том же месте в другое время); фактически штамм – это именованная чистая культура после определения ее свойств;

4) **клон** – чистая культура, полученная из одной материнской клетки, а значит генетически полностью однородная.

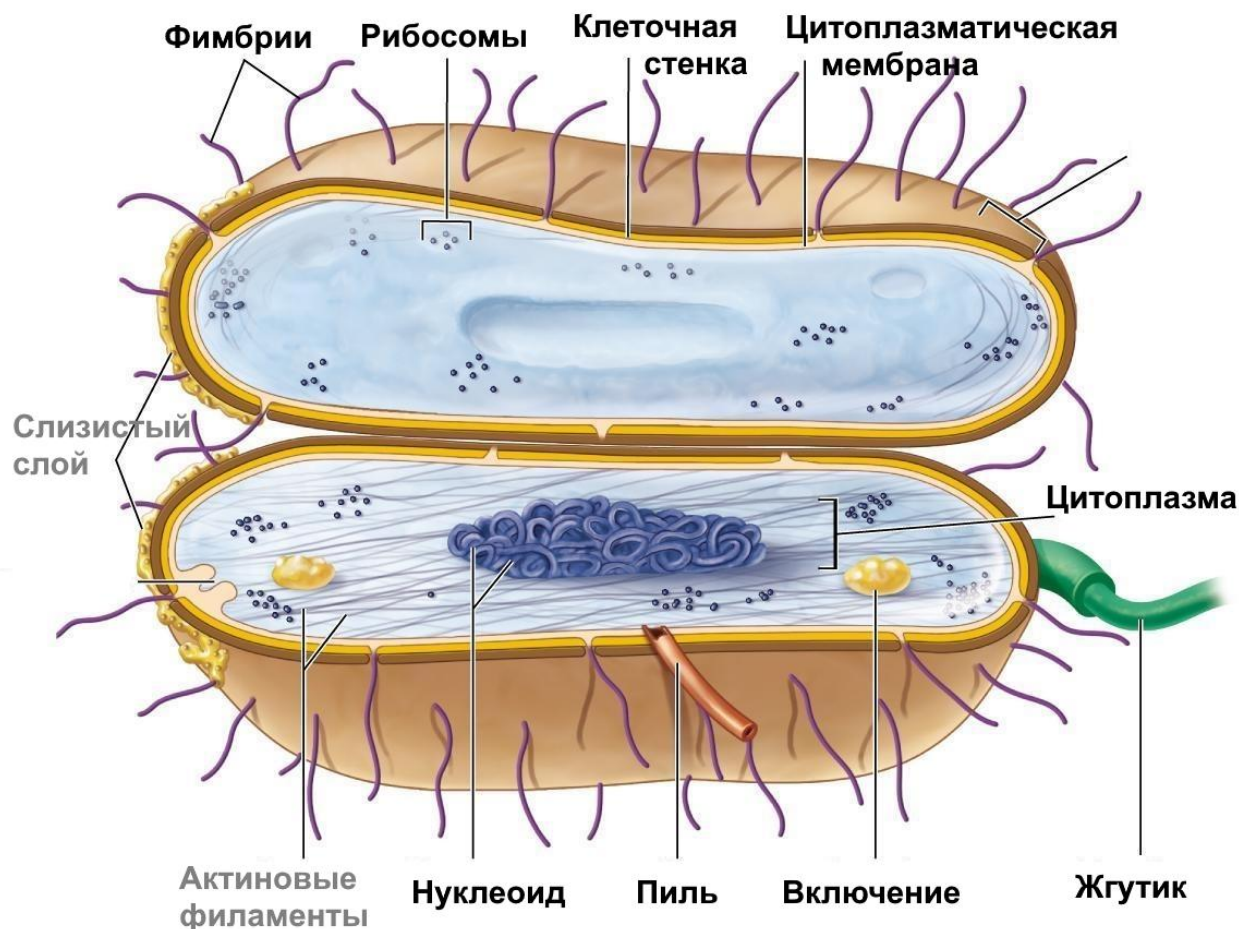
Для **идентификации** бактерий, то есть установления их места в систематике вплоть до уровня вида или варианта, изучают определенные признаки – **критерии вида**:

- **морфологические** (форма, размер, взаимное расположение, подвижность, окрашивание, включения, наличие капсулы – иначе говоря, внешний вид);
- **культуральные** (рост и размножение на определенных средах или при определенных условиях, внешний вид колоний);
- **биохимические** (набор ферментов, профиль жирных кислот для анаэробов);
- **серологические** (набор антигенов);
- **биологические** (вирулентность, токсигенность, чувствительность к антибиотикам и фагам);
- **генетические** (см. *геносистематику* в 4.1);
- **экологические** (место обитания).

Мнемоника: критерии вида собрались обсудить КУЛЬТУРный МОРФОЛОГ, СЕРдитый ЭКОЛОГ и ГЕНЕральный БИОЛОГ и БИОХИМИК.

5. Структура бактериальной клетки. Цитоплазматические структуры бактериальной клетки (цитоплазматическая мембрана, мезосомы, цитоплазма, нуклеоид, рибосомы, включения): строение, функции, методы выявления. Кислотоустойчивые бактерии, методы выявления

5.1. Общий план строения бактериальной клетки



Любая бактериальная клетка имеет **нуклеоид**, **цитоплазматическую мембрану**, **мезосомы**, **цитоплазму** и **рибосомы**. Все остальные органеллы являются *факультативными*.

5.2. Цитоплазматическая мембрана. Мезосомы. Цитоплазма

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) – это двойной слой **липидов** с направленными наружу гидрофильными головками и погруженными внутрь гидрофобными хвостами. У бактерий это чаще всего **фосфолипиды** и **нейтральные жиры**. Липиды – это основа механической стабильности мембраны.

ЦПМ также пронизывают **белки**: **структурные** (также поддерживают структуру мембраны) и **функциональные** (ферменты синтеза, переноса веществ и дыхания). Они бывают **интегральными** (проходят через всю толщину), **поверхностными** и **периферическими**.

ЦПМ выполняет целый ряд **функций**: структурную, барьерную, транспортную, интегрирующую, энергетическую, участвует в процессах биосинтеза, репликации ДНК, деления и спорообразования.

Мезосомы – это впячивания ЦПМ внутрь клетки. Наличие мезосом позволяет увеличить рабочую поверхность мембраны, разместив на ней большее количество ферментов (например, дыхательной цепи). Мезосомы также участвуют в процессах деления и спорообразования, а у немногочисленных бактерий еще в секреторных процессах.

За редкими исключениями бактерии не способны к эндо- и экзоцитозу.

Цитоплазма – это полужидкое содержимое клетки, ограниченное ЦПМ. На 75% цитоплазма состоит из воды, остальное составляют растворенные и взвешенные в ней органические и минеральные вещества. Жидкую часть цитоплазмы с растворенными в ней веществами называют **цитозолем**, а остальные элементы (нуклеоид, рибосомы, включения и др.) называют **структурными элементами**. Важнейшая **функция** цитоплазмы – объединение всех клеточных компонентов и обеспечение их взаимодействия.

Цитоплазматическая мембрана, мезосомы и цитоплазма **выявляются** электронной микроскопией.

5.3. Нуклеоид. Рибосомы

Нуклеоид – структурный элемент прокариотической клетки, в котором находится жизненно необходимый генетический материал (это всегда ДНК). Нуклеоид называют эквивалентом ядра эукариотической клетки, однако отличия между ними значительны:

- нуклеоид не отделен от ЦП ядерной мембраной;
- не имеет ядрышек и гистонов;
- почти всегда это одна хромосома с гаплоидным набором генов;
- почти всегда это кольцевая (замкнутая) молекула ДНК.

Так же как и хромосомы у эукариот, нуклеоид у прокариот выполняет **функции** хранения, передачи и реализации наследственной информации.

Кроме нуклеоида, в цитоплазме могут находиться **плазмиды** – также кольцевые молекулы двунитевой ДНК, но меньшие по массе. В них тоже кодируется наследственная информация, но она не является жизненно важной.

Нуклеоид **выявляется** электронной и фазово-контрастной микроскопией, а также в световой микроскоп при окраске по Романовскому-Гимзе (окрашивается в фиолетовый цвет на фоне бледно-розовой цитоплазмы).

Рибосомы у прокариот, в отличие от эукариот, не объединяются в эндоплазматическую сеть и имеют меньшую массу и размер. *Коэффициент седиментации* (скорость осаждения в центрифуге) для большой и малой субъединиц – **50S** и **30S** соответственно, а после их объединения – **70S**. **Функция** рибосом – синтез белка, и чем он интенсивнее, тем больше их в клетке. При активном синтезе рибосомы могут объединяться в **полисомы**. **Выявляются** рибосомы электронной микроскопией.

5.4. Включения цитоплазмы

Включения – необязательные компоненты бактериальной клетки: зерна, глыбки, капли или гранулы различной формы с запасаемыми химическими веществами. Включения преимущественно состоят из полисахаридов (*гликоген* и *крахмал*), липидов, полифосфатов (*зерна волютина*), минеральных веществ (S, Ca, Fe). **Функция** включений – трофическая и энергетическая. *Зерна волютина* могут **выявляться** световой микроскопией после окраски *по Леффлеру* или *по Нейссеру*.

5.5. Кислотоустойчивые бактерии

Кислотоустойчивые бактерии в составе своей клеточной стенки содержат много *липидов* и *восков*. Наиболее известные представители: *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулез), *Mycobacterium leprae* (лепра). Они плохо окрашиваются анилиновыми красителями, поэтому применяются специальные техники, такие как окраска *по Цилю-Нильсену*.

6. Поверхностные структуры бактериальной клетки (капсула, клеточная стенка, жгутики, фимбрии): строение, функции, методы выявления. Механизм окраски по Граму. Формы бактерий с дефектом клеточной стенки

6.1. Капсула

Капсула – это поверхностное слизистое образование, располагающееся снаружи от клеточной стенки и состоящее из синтезируемых бактерией биополимеров (обычно полисахаридов). В зависимости от выраженности выделяют:

- **макрокапсулу** (до 0,2 мкм) – имеет диаметр больше, чем таковой у клетки, и прочно с ней связана; обычно образуется при неблагоприятных условиях; видна в световой микроскоп при окраске *по Бурри-Гинсу*;

- **микрокапсулу** (менее 0,2 мкм) – имеется у многих бактерий, выявляется в электронном микроскопе;

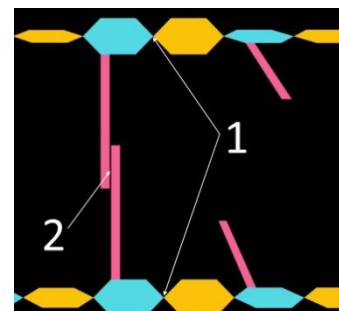
- **слизистый чехол** – не имеет четких границ и легко отделяется от клетки.

Капсула выполняет несколько **функций**:

- **защищает** от механических и температурных воздействий, а также от фагов;
- **запасает** некоторые питательные вещества;
- участвует в **адгезии**;
- является **фактором патогенности**, подавляя фагоцитоз;
- определяет **антигенную специфичность** (капсульный *K*-антиген), что используется в еще одном методе их выявления – применении *противокапсульных сывороток*.

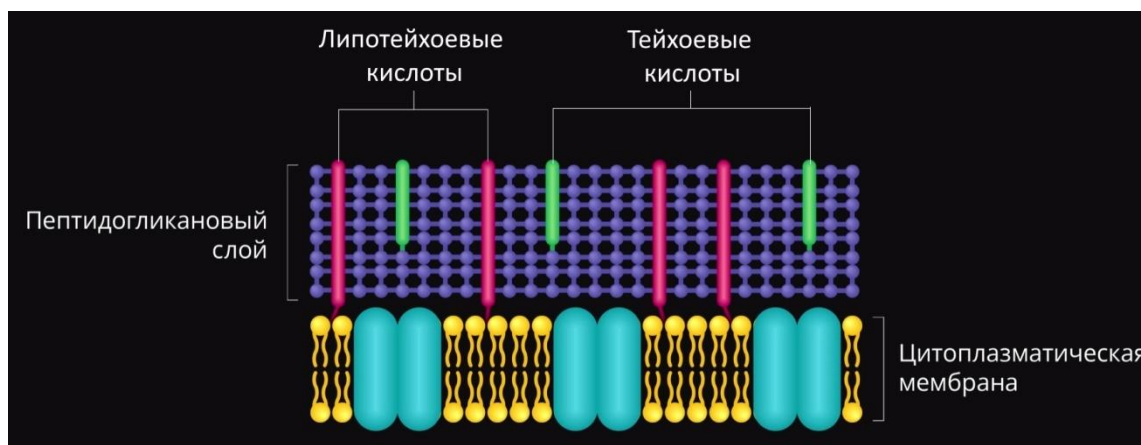
6.2. Клеточная стенка. Окраска по Граму

Клеточная стенка покрывает бактериальную клетку снаружи ЦПМ, но располагается под капсулой, если капсула имеется. Основу клеточной стенки составляет **пептидогликан** (*муреин*). Пептидогликан хорошо сохраняет свою структуру за счет связей двух типов: **гликозидных** связей (1) между молекулами глюкозы и **пептидных** связей (2) между олигопептидными хвостами. При этом не все пептидные хвосты участвуют в образовании межцепочечных связей, некоторые из них находятся в свободном состоянии.



Не считая наличия пептидогликана, строение клеточной стенки сильно отличается у бактерий двух групп: **грамположительных** (*Грам*⁺, окрашиваются в **фиолетовый**) и **грамотрицательных** (*Грам*⁻, окрашиваются в **красный**). Метод окраски *по Граму* описан в Приложении 1.

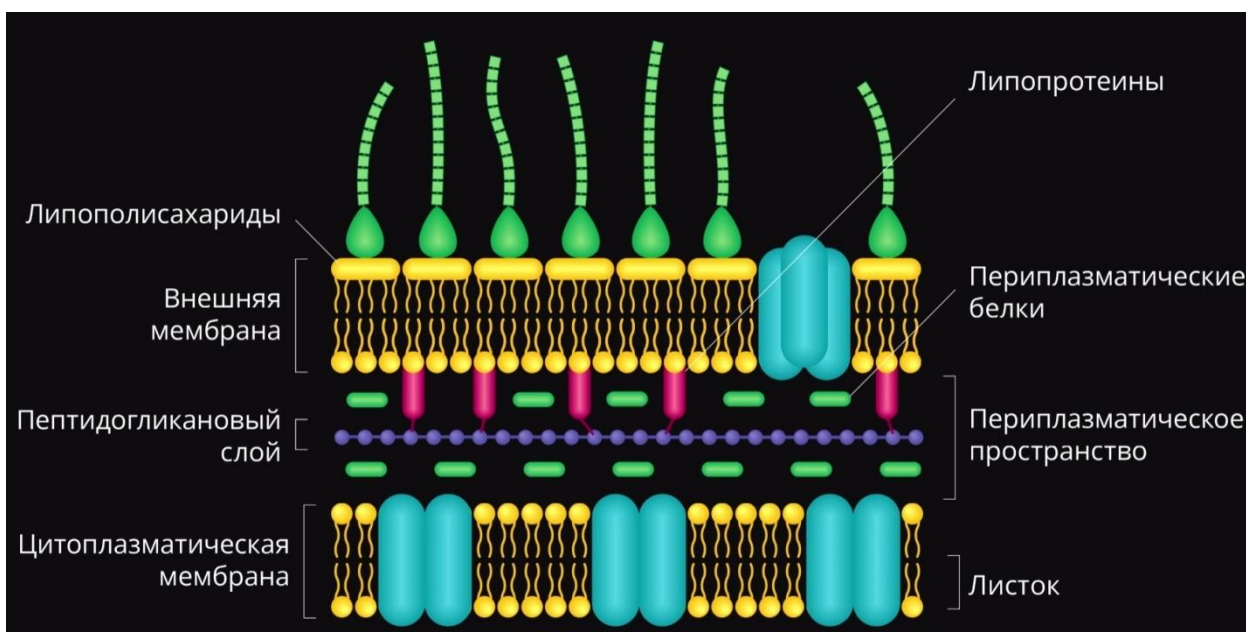
У **Грам**⁺ бактерий клеточная стенка **толстая**, причем основную ее часть составляет пептидогликан (до 90% массы), состоящий из **множества цепочек** (вплоть до 10).



Пептидогликан пронизывают **тейхоевые кислоты**, достигающие внешней поверхности клеточной стенки. Они являются основными антигенами **Грам+** бактерий, участвуют в клеточной рецепции и определяют заряд поверхности клетки. Также пронизывают пептидогликан **липотейхоевые кислоты**. Их особенность – липофильный якорь, погружающийся в ЦПМ и прикрепляющий к ней клеточную стенку. Между ЦПМ и клеточной стенкой пространство **отсутствует**.

Пенициллин и **лизоцим** особенно активны в отношении **Грам+** бактерий, так как их мишень – пептидогликан, которого у этих бактерий много. Лизоцим разрушает гликозидные связи, а пенициллин – межпептидные.

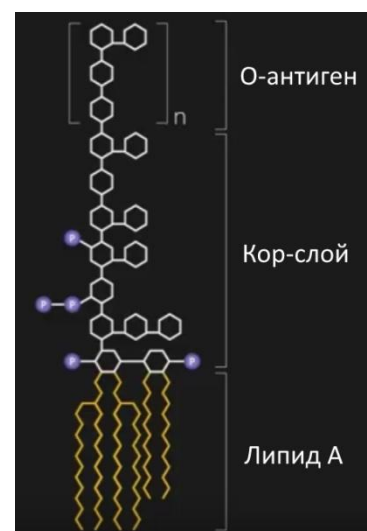
Клеточная стенка **Грам–** бактерий устроена более сложно. В сравнении она значительно **тоньше**, пептидогликан имеет всего **1-2 цепочки** и составляет только 5-10% от массы клеточной стенки.



В пептидогликане **отсутствуют** (липо)тейхоевые кислоты. Вследствие этого он прилегает к клеточной стенке неплотно, и образуется **периплазматическое пространство**. В нем имеются **периплазматические белки** (транспортные и ферменты).

Кнаружи от пептидогликана у **Грам–** бактерий находится **наружная (внешняя) мембрана**. Это наиболее толстый слой клеточной стенки. **Внутренний листок** наружной мембраны имеет такое же строение, как и любой из листков ЦПМ. При помощи **липопротеинов**, имеющих гидрофобный и гидрофильный домены, наружная мембрана связана с пептидогликаном.

Наружный листок на треть состоит из **липополисахаридов**, которые имеют в своем составе три компонента (рис. справа). **Липид А** «заякоривает» липополисахарид в наружной мембране и является одним из основных **факторов патогенности**, вызывая повышение температуры и токсические эффекты вплоть до шока. Далее следует выполняющий роль мостика **кор-слой**. Самый наружный компонент – **О-антиген**, уникальный для каждого серовара бактерии (в отличие от первых двух компонентов). Эта часть липополисахарида лучше всего распознается организмом и является наиболее иммуногенной. Она же часто определяется в серологической диагностике.



Наружная мембрана содержит множество белков, особенно транспортных и рецепторных (ферментные белки находятся в *периплазматическом пространстве*). **Грам-** бактерии менее чувствительны к пенициллину и лизоциму.

6.3. Жгутики

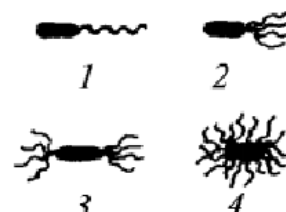
Жгутики – это органы движения бактерий. Они состоят из трех частей:

- **спиральная нить** – полый цилиндр из 11 рядов сократительного белка *флагеллина*, может достигать в длину нескольких микрометров;
- **крюк** – содержит иной белок, соединяет спиральную нить с базальным телом;
- **базальное тело** – комплекс из двух (Грам+) или четырех (Грам-) белковых колец, названных на крюк; единственное подвижное *M-кольцо* находится в ЦПМ и вращается за счет градиента концентрации протонов.

Благодаря вращению жгутиков, бактерии могут двигаться прямолинейно или кувырканьем (постоянная смена направлений). В неоднородной окружающей среде бактерии движутся целенаправленно за счет **таксисов** (хемо-, аэро-, фото-, термотаксис и др.)

По числу и расположению жгутиков выделяют:

- **атрихи** (нет жгутика);
- **монотрихи** (1 – один жгутик, самые подвижные);
- **политрихи** (много жгутиков), в том числе *лофотрихи* (2 – пучок на одном полюсе), *амфитрихи* (3 – пучки на обоих полюсах) и *перитрихи* (4 – по всей поверхности клетки).



Кроме подвижности, жгутики обеспечивают адгезию и определяют антигенную специфичность (H-антиген). **Выявляются** методами фазово-контрастной, темнопольной и электронной микроскопии, а также косвенно – по характеру роста в полужидкой среде (бактерии со жгутиками растут в стороны). Для световой микроскопии применяется метод **серебрения по Морозову**.

6.4. Фимбрии (пили)

Фимбрии – это поверхностные нити из белка *пилина*. Они короче и тоньше жгутиков, не участвуют в движении. Делятся на два типа:

- фимбрии 1-го типа (общие) – имеются в большом количестве (сотни-тысячи) у большинства бактерий; обеспечивают адгезию, механическую защиту и увеличивают поверхность всасывания и водно-солевого обмена;
- фимбрии 2-го типа (чаще *пили*, или *секс-пили*) – обеспечивают конъюгацию.

Фимбрии обоих типов обладают антигенной активностью, а также могут адсорбировать бактериофаги. **Выявляются** только электронной микроскопией.

6.5. Формы бактерий с дефектом клеточной стенки

При воздействии на бактерию ферментами, разрушающими пептидогликан (например *лизоцимом*), можно получить сферопласт или протопласт. **Протопласт** образуется из **Грам+** бактерий в результате полной утраты клеточной стенки (ведь она состоит только из пептидогликана). **Сферопласт** образуется из **Грам-** бактерий, в нем клеточная стенка частично сохранена за счет наружной мембраны. И протопласты, и сферопласты в благоприятных условиях могут превращаться в исходную форму. В неблагоприятных условиях (в том числе в изотонической среде из-за *плазмолиза*) они погибают либо теряют способность к размножению. Относительно стабильны в гипертонической среде.

Если же бактерия с дефектом клеточной стенки сохраняет способность к размножению и достаточно устойчивому развитию, ее называют **L-формой**. Они могут образовываться в организме под действием антител или антибиотиков и затем длительно находиться в нем, формируя носительство бактерии. Стабильные L-формы неспособны к реверсии в исходный вид, а отсутствие клеточной стенки для них является защитным приспособлением.

7. Питание микроорганизмов, его способы. Питательные вещества: источники органоенов, факторы роста, микроэлементы. Механизмы проникновения питательных веществ в бактериальную клетку

7.1. Питание микроорганизмов, его способы

Питание – это процесс поступления в м/о химических веществ, обеспечивающих восполнение запаса энергии, рост и развитие.

По потребностям в питательных веществах м/о делят на две группы:

- **прототрофы** растут на простейших питательных средах, содержащих простые углеводы, источник азота и набор ионов, а все остальные жизненно важные вещества синтезируют самостоятельно;

- **ауксотрофы** должны получать как минимум один метаболит (аминокислоту, витамин) из среды, будучи неспособными его синтезировать.

Простейшие и некоторые грибы питаются **голозойным способом**, то есть поглощают высокомолекулярные соединения и расщепляют их уже в своем организме.

Растения, большинство грибов и все бактерии питаются **голофитным способом**. При таком способе бактерия осуществляет *внеклеточное пищеварение* (ферменты выделяются во внешнюю среду) и *контактное пищеварение* (ферментами на поверхности м/о). Высокомолекулярные соединения расщепляются до низкомолекулярных, а затем уже проникают в клетку через барьеры.

Из трех возможных барьеров – капсулы, клеточной стенки и ЦПМ – наименьшей *проницаемостью* и наибольшей *избирательностью* обладает ЦПМ, которая и контролирует поступление веществ в клетку.

7.2. Питательные вещества

Из **биогеенных** химических элементов (С, О, N, H) лимитирующими являются углерод и азот. По способности усваивать источники углерода м/о делят на две группы:

- **аутоотрофы** – из простых неорганических соединений (CO₂), патогенных м/о нет;

- **гетеротрофы** – из сложных органических соединений:

- **метатрофы** (питаются мертвой органикой);

- **паратрофы** (питаются в условиях живого организма);

- **миксотрофы** умеют переключаться с аутоотрофного пути обмена на гетеротрофный.

По способности усваивать азот выделяют **аминоаутоотрофы** (*азотфиксирующие* – из атмосферного, *нитрифицирующие* – из аммиака, *аммонифицирующие* – из солей аммония) и **аминогетеротрофы**.

Необходимые **макроэлементы** – сера, фосфор, калий, кальций, магний, натрий и хлор.

Необходимые **микроэлементы** – марганец, цинк, медь, кобальт, никель, молибден, железо, бор, йод, селен и др. Микроэлементы нужны бактерии в очень малых, *следовых* количествах. Они входят в состав некоторых ферментных систем.

Для жизнедеятельности отдельных видов бактерий необходимы и другие вещества – **факторы роста**. По сути это аналоги витаминов животных. К важнейшим из них относятся **аминокислоты** (у разных видов разные незаменимые АК), **пуриновые** и **пиримидиновые основания**, **жирные кислоты** (входят в состав фосфолипидов), **гем** и **витамины** (чаще группы В и К).

7.3. Механизмы проникновения питательных веществ

Питательные вещества в бактериальную клетку поступают в клетку путем активного и пассивного транспорта.

Пассивный транспорт идет по градиенту концентрации и не требует затрат энергии. Все вещества перемещаются из области более высокой концентрации в область более низкой посредством **простой диффузии**. Так в бактериальную клетку поступают O₂, CO₂, H₂.

Вода проникает в клетку посредством *осмоса* – движения в сторону большей осмолярности. Диффузия с участием белков-переносчиков называется *облегченной диффузией*. У прокариот она встречается редко.

Активный транспорт идет против градиента концентрации, с затратой энергии и контролируется геномом. Этим путем в клетку попадает большинство гидрофильных веществ (сахара, нуклеотиды, аминокислоты, антибиотики). В переносе участвуют мембранные *белки-пермеазы*. Пермеазы класса *унипорт* переносят один тип субстрата, *симпорт* – два типа в одном направлении, *антипорт* – два типа в противоположных направлениях.

Активным механизмом также является *транслокация*, при которой переносимые вещества одновременно модифицируются (чаще фосфорилируются). Активный *везикулярный транспорт* – *эндо-* и *экзоцитоз*, *пиноцитоз* – у прокариот встречается редко.

8. Особенности метаболизма у прокариот. Ферменты бактерий. Конструктивный метаболизм

8.1. Метаболизм. Особенности метаболизма у прокариот

Метаболизм – это совокупность всех химических превращений в клетке, обмен веществ и энергии. Метаболизм складывается из *анаболизма* (биосинтез макромолекул из более простых соединений) и *катаболизма* (разрушение макромолекул с получением и запасанием энергии).

Метаболизм прокариот имеет следующие **особенности**:

- **высокая интенсивность**;
- способность разных видов включать в метаболизм почти любые органические и неорганические соединения;
- способность быстро и широко адаптироваться к изменяющимся условиям, многообразию путей метаболизма;
- примитивные и несовершенные механизмы регуляции метаболизма.

8.2. Ферменты бактерий

Ферменты бактерий – высокоспецифичные катализаторы химических реакций, проходящих в клетке. Они характеризуются следующим:

- делятся на шесть **классов**, так же как и ферменты человека: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы;
- различают **экзоферменты**, выделяющиеся во внешнюю среду, и **эндоферменты**; экзоферменты расщепляют высокомолекулярные вещества в процессе питания, а также определяют *инвазивность* бактерий – их способность проникать через тканевые барьеры;
- на постоянной основе в бактериальной клетке работают **конститутивные ферменты**, однако численно преобладают **индуцибельные ферменты**, которые синтезируются при необходимости (например, переключение метаболизма на более доступный субстрат);
- некоторые бактерии продуцируют особые **ферменты-токсины** (гиалуронидазу, коллагеназу, гемолизины и др.), действующие на клетки и ткани макроорганизма, то есть выступающие в качестве *факторов патогенности*;
- ферменты бактерий нашли свое применение в промышленности (*органические кислоты*), генной инженерии (*рестриктазы*), виноделии, пивоварении, силосовании кормов.

8.3. Конструктивный метаболизм (анаболизм)

Основные анаболические пути бактерий:

- **углеводы** – синтез *аутотрофами* из CO_2 , *гетеротрофами* из углеродсодержащих молекул с длиной цепи C2-C3;
- **аминокислоты** – синтез из метаболитов ЦТК (пирувата, фумарата, α -кетоглутарата); *ауксотрофные* по отдельным аминокислотам бактерии используют готовые АК из организма хозяина;
- **липиды** – как правило, имеются полные ферментные системы для синтеза насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, фосфолипидов (схожи с таковыми у человека);
- **нуклеотиды** – большинство м/о имеет полные ферментные системы для синтеза из низкомолекулярных соединений.

9. Дыхание микроорганизмов, его типы. Ферменты и структуры клетки, участвующие в процессе дыхания. Классификация бактерий по отношению к кислороду воздуха

9.1. Дыхание микроорганизмов, его типы

Дыхание – это процесс получения энергии путем окисления органических и неорганических соединений. У большинства м/о энергия запасается в форме АТФ. В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют три типа дыхания.

I. Аэробное дыхание – конечным акцептором электронов (окислителем) выступает **кислород**. Дыхательный процесс принципиально не отличается от такового в клетках человека. Например, если исходным субстратом выступает *углевод*, он ферментативно расщепляется до пировиноградной кислоты (*гликолиз*), та в свою очередь окисляется до ацетил-КоА, после чего в ЦТК водородные атомы и электроны передаются на *пиридиновые дегидрогеназы*, которые вступают в **дыхательную цепь**. В конечном счете, ионы водорода связываются с кислородом, а в процессе **окислительного фосфорилирования** образуется АТФ.

II. Анаэробное дыхание – конечным акцептором электронов выступают **неорганические вещества** (сульфаты, нитраты). Начальные этапы дыхания у аэробов и анаэробов совпадают, но из-за отсутствия у последних некоторых ферментов дыхательной цепи (*цитохромов*) конечные этапы окисления у них заблокированы. В итоге субстраты при анаэробном дыхании расщепляются не полностью. Энергия запасается путем **субстратного фосфорилирования**. Энергетический выход при этом гораздо ниже, чем при окислительном фосфорилировании.

III. Брожение – конечным акцептором электронов, равно как и донором, выступают **органические соединения**. Это тоже анаэробный процесс и субстраты также окисляются не полностью. Особенность брожения – это превращение на последних этапах пирувата в различные конечные метаболиты (спирты и органические кислоты). В этих реакциях энергия не высвобождается, но они необходимы для регенерации НАД⁺. Энергия также запасается путем **субстратного фосфорилирования**.

9.2. Дыхательный аппарат бактерий

Наибольшая плотность дыхательных ферментов у бактерий наблюдается в **мезосомах** – инвагинациях ЦПМ внутрь клетки. Среди ферментов выделяют:

- **пиридиновые дегидрогеназы** (первичные) – окисляют субстрат, отнимая водород;
- **флавиновые дегидрогеназы** (вторичные) – принимают водород от первичных дегидрогеназ, но для отдельных субстратов могут и сами работать как первичные;
- **цитохромы** – переносчики водорода от вторичных дегидрогеназ на кислород;
- **убихиноны** – свободные переносчики водорода по мембране (не ферменты).

9.3. Классификация бактерий по отношению к кислороду

Аэробы:

- **облигатные аэробы** – не могут жить и размножаться без O₂; только аэробное дыхание;
- **микроаэрофилы** – растут только в условиях уменьшенной концентрации O₂.
- **капнофилы** – растут только в условиях увеличенной концентрации CO₂.

Анаэробы:

- **облигатные анаэробы** – погибают в присутствии O₂ (отсутствует *супероксиддисмутаза*, защищающая клетку от продуктов окисления); только анаэробное дыхание;
- **факультативные анаэробы** – могут переключаться на аэробное дыхание;
- **аэротолерантные** – могут расти в присутствии O₂ (имеется *супероксиддисмутаза*), но не способны его использовать; только брожение.

10. Рост и способы размножения бактерий. Механизм и фазы простого деления. Покоящиеся формы микроорганизмов: причины образования, строение, значение

10.1. Рост бактерий. Фазы роста культуры

Рост для клетки – это генетически контролируемое увеличение объема и массы микробной клетки. **Рост для популяции** – это увеличение ее биомассы.

Клеточная культура (популяция) на питательной среде проходит шесть **фаз роста**:

- 1) **фаза задержки роста** – адаптация клеток к среде обитания, деления не происходит;
- 2) **период положительного ускорения** – начало деления;
- 3) **фаза экспоненциального роста** – максимальная скорость деления, минимальный размер клеток;
- 4) **фаза замедления скорости роста** – снижение количества питательных веществ и накопление метаболитов, как следствие – снижение скорости деления;
- 5) **стационарная фаза** – почти полная остановка деления, переход на запасенные субстраты; количество клеток относительно постоянно (отмирает, как и делится, малый процент клеток);
- 6) **фаза отмирания** – массовая гибель бактерий.

10.2. Способы размножения бактерий

Размножение микроорганизмов – это увеличение их концентрации в единице объема среды, направленное на сохранение вида. **Особенности** размножения микроорганизмов:

- разнообразие способов и возможность переключения между ними;
- возможность одновременного размножения разными способами;
- высокая скорость.

Период генерации – это время, за которое количество бактерий удваивается.

Прокариоты размножаются исключительно **бесполыми способами**:

- **простое деление** (равномерное *бинарное* деление) – самый распространенный способ, образуются две дочерние особи с генетической информацией материнской клетки;
- **множественное деление** (шизогония) – равномерное бинарное деление без периодов роста с уменьшением размеров клеток; встречается у цианобактерий и простейших;
- **почкование** (неравномерное бинарное деление) – выросшая на одном из полюсов материнской клетки *почка* отделяется от нее; новая клетка первоначально меньше материнской, но содержит тот же набор генетической информации; характерно для грибов;
- **фрагментация** – деление на несколько *фрагментов* разной величины, каждый из которых затем продолжает самостоятельное развитие, характерна для актиномицет и микоплазм; (почкование – это частный случай фрагментации);
- **образование экзоспор** – характерно для стрептомицет и грибов;
- особый цикл развития *хламидий*.

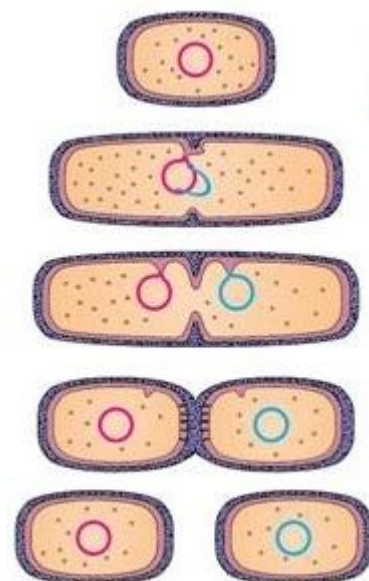
10.3. Механизмы и фазы простого деления (рис. справа)

I. Рост:

- происходит до достижения определенных размеров;
- в процессе деления рост останавливается.

II. Кариокинез:

- репликация ДНК по *полуконсервативному* механизму;
- в каждую дочернюю клетку отходит одна новая и одна старая нуклеотидная цепь.



III. Цитокинез (деление клетки):

- начинается параллельно с кариокинезом;
- у места контакта ДНК с ЦПМ имеется *мезосома*, рядом с которой синтезируется мембрана для будущей перегородки;
- после окончания репликации ДНК мембрана образует перегородку, отделяя клетки.

IV. Расхождение дочерних клеток:

- средний слой клеточной стенки лизируется и клетки отделяются друг от друга;
- если клетки полностью не расходятся, они могут принимать вид цепочек (бациллы и стрептококки), парных клеток (диплококки), гроздьев, пакетов и т.д. (см. 3.3).

10.4. Покоящиеся формы м/о. Механизм образования эндоспор

Вегетативные формы м/о активно растут и размножаются, они не только жизнеспособны, но и жизнедеятельны. Напротив, **покоящиеся формы** хотя и жизнеспособны, но не жизнедеятельны, их метаболизм резко замедлен. Для них характерно:

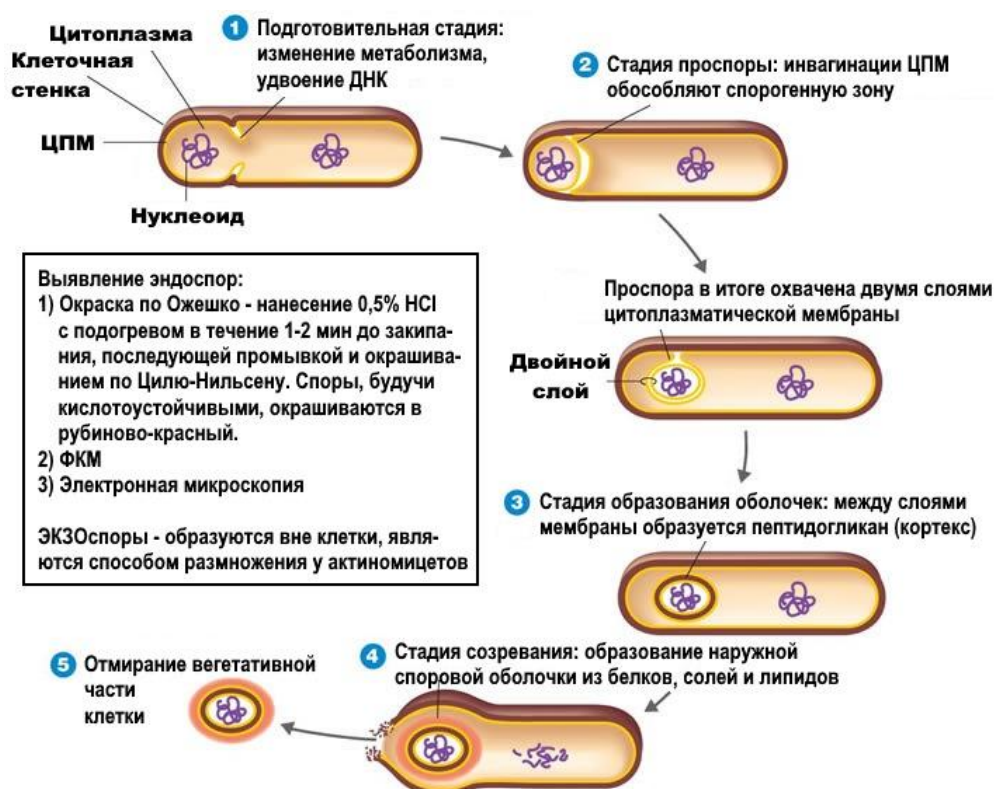
- толстая, малопроницаемая оболочка;
- небольшое содержание воды;
- отсутствие роста, размножения, выделения ферментов и токсинов;
- высокая *резистентность* к повреждающим факторам (внешним и иммунным);
- способность долго сохраняться во внешней среде или организме человека.

Большинство покоящихся форм необходимы м/о для переживания неблагоприятных условий. Некоторые покоящиеся формы – этап циклического развития или размножения.

К **покоящимся формам** относят:

- **споры** – бактерии и грибы;
- **цисты** – спирохеты и простейшие;
- **малые формы** (риккетсии) и **элементарные тельца** (хламидии);
- **вирионы, лизогенные формы** – вирусы;
- **L-формы** – бактерии (могут размножаться).

Эндоспоры бактерий образуются при попадании в неблагоприятные условия: недостаток питательных веществ, высушивание, накопление токсичных продуктов обмена и т.п. Споры образуют только некоторые **Грам+** бактерии. **Стадий спорообразования** пять:



11. Принципы организации, аппаратура и режим работы бактериологической, вирусологической, иммунологической лабораторий. Правила техники безопасности при работе с возбудителями 3-4 групп патогенности

11.1. Биологическая опасность. Оснащение микробиологических лабораторий

Биологическую опасность, или риск для здоровья людей и окружающей среды, могут представлять инфицированные организмы или биологический материал, содержащий микроорганизмы или токсины биологического происхождения.

Уровень биобезопасности – это уровень мер предосторожности, необходимых при работе с потенциально опасными биологическими агентами. Различают четыре уровня биобезопасности.

Лаборатории с **первым уровнем** биобезопасности (самым низким) работают с биологическими агентами, которые представляют минимальную опасность для персонала и окружающей среды. Это, как правило, возбудители **IV группы патогенности**, т.е. условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы.

Специальное оснащение при этом не требуется. Должны иметься приспособления для мытья рук, легко обеззараживаемые рабочие поверхности, прочная мебель, окна с противомоскитными сетками, отсутствие автоматической вентиляции, личная защитная одежда (перчатки, халаты), автоматические дозаторы, защита глаз и лица.

Учебный практикум кафедры микробиологии считается учебной микробиологической лабораторией с первым уровнем биобезопасности, где студенты работают с микроорганизмами **IV группы патогенности**.

Лаборатории со **вторым уровнем** биобезопасности имеют возможность работы с биологическими агентами, представляющими потенциальную опасность для персонала и окружающей среды. Это, как правило, возбудители **III группы патогенности**, которые могут вызывать серьёзные заболевания, для которых, однако, разработано эффективное лечение и профилактика.

Оснащение таких лабораторий принципиально не отличается от оснащения лабораторий с первым уровнем безопасности. Предпринимаются строгие меры предосторожности во время проведения процедур, при которых могут создаваться инфекционный аэрозоль или брызги. Особые меры предосторожности применяют в отношении острых и режущих предметов.

Лаборатории с **третьим** или **четвертым уровнем безопасности**, которые работают с высокопатогенными и особо опасными инфекциями, оснащаются **боксами** или **герметичными костюмами** с автономной подачей воздуха. В них также устанавливается особый режим работы. Подробнее об этом см. в 112.2. части третьей «Частная микробиология».

11.2. Техника безопасности при работе с возбудителями III-IV групп патогенности

При работе с возбудителями III-IV групп патогенности придерживаются следующих основных **правил**:

- 1) во время работы все инструменты, имевшие контакт с материалом, фламбируются в пламени горелки или сбрасываются в емкости с дезинфицирующим раствором или специальные емкости для последующего обеззараживания;
- 2) бактериологическая петля должна быть замкнута в непрерывное кольцо и иметь плечо длиной не более 6 см;
- 3) при пипетировании необходимо пользоваться только резиновыми грушами или автоматическими устройствами; пипетирование ртом в лабораториях строго запрещено;
- 4) рабочий стол по окончании работ, обрабатывается дезинфицирующим раствором или 70-ти процентным спиртом;
- 5) по окончании отдельных этапов исследования персонал обязан обработать руки 70-ти процентным раствором спирта и вымыть руки с мылом;

б) запрещается:

- оставлять после окончания работы на рабочих местах нефиксированные мазки или посуду с материалом;
- переливать жидкий инфекционный материал через край сосуда (пробирки, колбы, флакона);
- хранить верхнюю одежду, головные уборы, обувь, зонты, хозяйственные сумки, косметику, а также продукты питания;
- курить, пить воду, принимать пищу;
- оставлять без надзора рабочее место;
- сливать жидкие отходы (инфицированные жидкости, исследуемый материал и другое) в канализацию без предварительного обеззараживания;
- содержать и выращивать цветы в вазонах;

7) при появлении у сотрудника симптомов, характерных для инфекционного заболевания, вызываемого возбудителем, с которым он работал, сотрудник обязан поставить в известность руководителя лаборатории.

12. Микроскопический (бактериоскопический) метод исследования: определение, цели, этапы, оценка. Типы микроскопических препаратов

12.1. Микроскопический метод исследования

Микроскопический метод исследования – совокупность способов обнаружения и изучения *морфологических* и *тинкториальных* (способность окрашиваться) свойств микробов в исследуемом материале с помощью микроскопа.

Цели метода: определение чистоты выделенной культуры либо установление этиологии заболевания (то есть микроорганизма, который его вызвал).

Метод включает **четыре этапа:**

- 1) забор, хранение и транспортировка материала;
- 2) приготовление микропрепарата (включая, если необходимо, окрашивание);
- 3) микроскопия выбранным способом с оценкой формы, размеров, взаимного расположения, окраски микробов;
- 4) выдача заключения.

Достоинства метода включают простоту, доступность, быстроту и экономичность. **Недостатки** – низкая чувствительность (при малой концентрации м/о могут не определяться), низкая специфичность (из-за схожести морфологии редко удается определить м/о вплоть до вида), опасность инфицирования.

12.2. Типы микроскопических препаратов

I. Препараты для изучения **убитых микроорганизмов:**

а) **фиксированный мазок** – на предметном стекле исследуемый материал эмульгируют в физрастворе, после чего фиксируют; более подробно методика описана в Приложении 1;

б) **мазок из жидкого материала** – аналогично предыдущему, только без физраствора;

в) **мазок из вязкого материала** (гной, мокрота) – капля материала помещается между двумя предметными стеклами, после чего их разводят и получают два мазка;

г) **тонкий мазок крови** – кровь по предметному стеклу тонко размазывают краем другого стекла, поставленного под углом 45° (рис. справа);

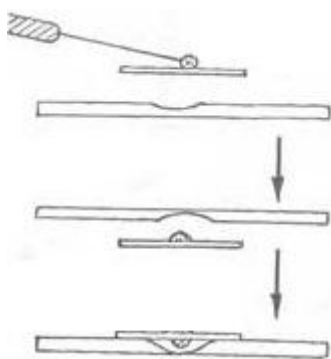
д) **толстая капля крови** – каплю крови распределяют по предметному стеклу бакпетлей по площади диаметром 1 см, после чего оставляют сохнуть.

е) **препарат-отпечаток** – кусочек ткани несколько раз прикладывают к стеклу;

ж) **препарат-соскоб** – кусочек ткани готовят как мазок из вязкого материала;

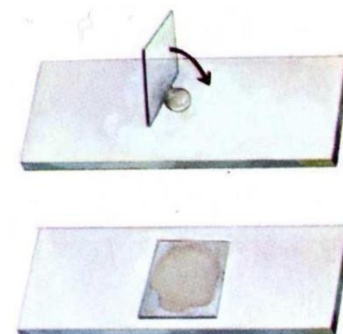
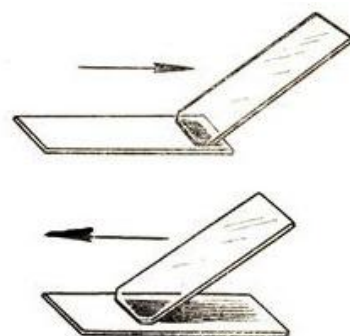
з) **препарат для электронной микроскопии** – нанесение материала тончайшим слоем на специальную пленку, которая не поглощает электроны.

II. Препараты для изучения **живых микроорганизмов:**



а) **висячая капля** – каплю жидкой культуры м/о на покровном стекле герметично накрывают предметным стеклом с лункой и переворачивают (рис. слева);

б) **раздавленная капля** – возле капли материала на предметном стекле ребром ставят покровное стекло, после чего, наклоняя его, придавливают каплю (рис. справа).



13. Методы окраски микроорганизмов. Виды микроскопов. Принципы светлопольной, темнопольной, фазово-контрастной, люминесцентной, электронной микроскопии

13.1. Методы окраски м/о. Светлопольная микроскопия

Методы окраски делятся на два типа:

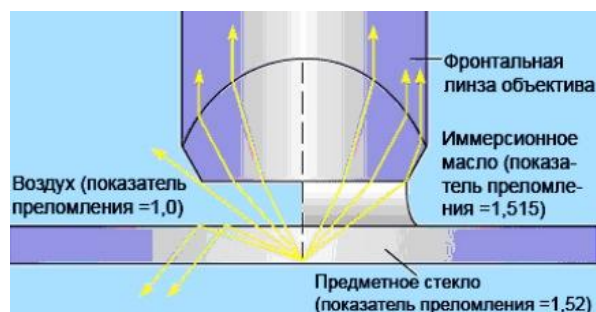
а) **простые** – с использованием одного красителя (чаще водный фуксин или метиленовый синий);

б) **сложные** – с использованием двух-трех контрастных по цвету красителей, проводятся в несколько этапов; подробнее о них см. в Приложении 1.

Светлопольная микроскопия – основной метод микроскопии с использованием излучения видимого спектра (то есть *света*). Основные части **оптической системы** светового микроскопа – это *окуляр*, *объектив* и осветительное устройство.

Увеличение обычного светового микроскопа не превышает **400 раз**, а при использовании **иммерсионного объектива** увеличивается до **1000 раз**. Это достигается за счет помещения между объективом и препаратом капли **иммерсионного масла** (например, кедрового), которое устраняет резкое изменение показателя преломления световых лучей в воздушной среде (*рис. справа*).

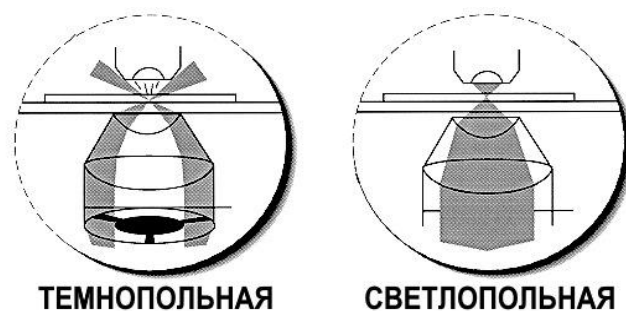
Разрешающая способность (минимальное расстояние между двумя точками, на котором они не сливаются в один объект) светового микроскопа – **от 0,2 мкм**. Как правило, препараты для светлопольной микроскопии должны быть **окрашены**.



13.2. Темнопольная микроскопия

Темнопольный микроскоп отличается от светлопольного наличием специального темнопольного *фильтра* или особого темнопольного *конденсора* (линзы, собирающей лучи от источника света). Оба эти элемента дают одинаковый эффект: основная часть лучей **не** проходит через исследуемый объект и **не** попадает в объектив. Вместо этого лучи проходят в стороне от образца (*рис. справа*), но небольшая их часть из-за явления дифракции *рассеивается* от частиц препарата и попадает в объектив. В отсутствие частиц (например, микроорганизмов) дифракции не наблюдается и поле остается полностью темным.

В темнопольном микроскопе чаще всего изучают **живые неокрашенные** микроорганизмы. Поле зрения остается совершенно темным, а микроорганизмы – ярко светящимися.

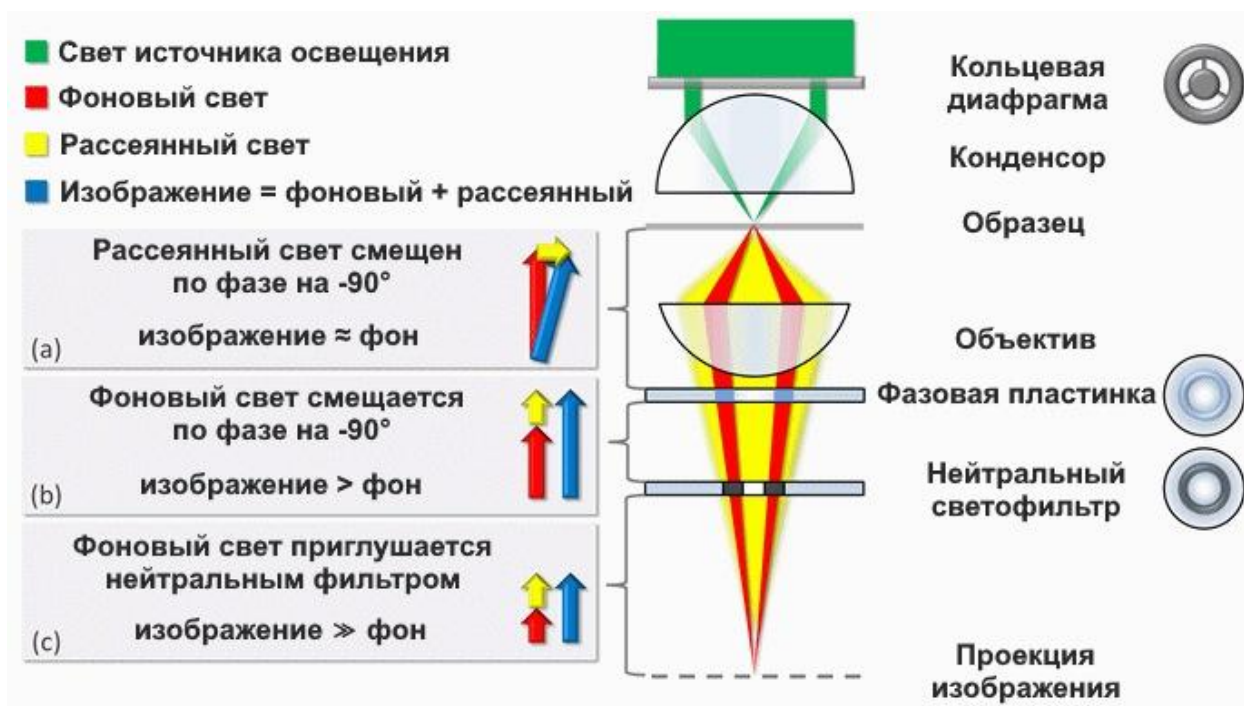


13.3. Фазово-контрастная микроскопия

Глаз человека плохо различает бесцветные прозрачные объекты, так как **интенсивность** света, который через них проходит, не меняется. В то же время **фаза колебаний** прошедшего света меняется, но глаз эти изменения уловить не в состоянии. Основной принцип **фазово-контрастной микроскопии** – перевести неуловимые глазом **фазовые изменения** в уловимые **изменения интенсивности** света.

При микроскопии **свет источника освещения** проходит через конденсор и **кольцевую диафрагму**, которые тонко фокусируют его на образце. Часть света рассеивается частица-

ми образца, при этом фаза колебаний света смещается на -90° – это **рассеянный свет** (рис. снизу). Другая часть света попадает в объектив неизменённой – это **фоновый свет**. В случае с прозрачным образцом **рассеянный свет** получается слабым, поэтому **изображение** слабо отличается от **фона**. Такой маленький контраст человеческий глаз уловить не в состоянии.



В фазово-контрастном микроскопе имеется **фазовое кольцо**, при прохождении через которое **фоновый свет** также смещается на -90° и его фаза становится такой же, как у **рассеянного света**. В результате **изображение** в точках, где на **фоновый свет** накладывается **рассеянный свет**, становится заметно ярче. Это происходит благодаря тому, что фазовые изменения (см. векторы в (a)) были преобразованы в изменения интенсивности (см. векторы в (b)).

Дополнительно эту разницу усиливают при помощи кольцевого нейтрального светофильтра. Через его кольцо преимущественно проходит и ослабляется **фоновый свет**, что делает разницу между **изображением** и **фоном** еще более сильной. В итоге прозрачные части изучаемого объекта выглядят более яркими, чем их окружение.

Все описанное верно для **негативного фазового контраста**. Используется еще и **позитивный фазовый контраст**, при котором фоновый свет смещают не на -90° , а на $+90^\circ$. В результате вектор **рассеянного света** становится антипараллельным и вычитается из вектора **фонового света**. В остальном принцип метода такой же. При его использовании прозрачные части изучаемого объекта выглядят более темными, чем их окружение.

Фазово-контрастная микроскопия используется для исследования малых прозрачных и бесцветных живых объектов.

13.4. Люминесцентная микроскопия

Люминесцирующие вещества поглощают свет, а затем испускают его, но уже с большой длиной волны: ультрафиолет «преобразовывается» в синий, синий – в зеленый и т.д.

При **люминесцентной микроскопии** источником света служит ртутная лампа, испускающая много света в сине-фиолетовом и ультрафиолетовом диапазонах. Следом за источником устанавливается **первый светофильтр**, пропускающий только ультрафиолет или коротковолновый свет (фиолетовый и синий).

Допустим, что первый светофильтр пропускает только **фиолетовый свет**. Тогда от образца, содержащего люминесцирующие вещества, будет исходить рассеянный **фиолетовый свет** и вызванный люминесценцией **синий свет** (рис. справа). Чтобы рассеянный свет не мешал наблюдать люминесценцию, в окуляре размещают второй светофильтр, отсекающий **фиолетовый свет**. В итоге до наблюдателя вообще не доходит свет от ртутной лампы, а только лишь вызванное им свечение **синего цвета** из-за люминесценции.



Люминесцентная микроскопия дает цветное изображение высокой контрастности, а благодаря использованию более коротких ультрафиолетовых лучей разрешающая способность возрастает до 0,1 мкм (по сравнению с 0,2 мкм у светового).

Чем меньше разрешение микроскопа, тем больше его разрешающая способность.

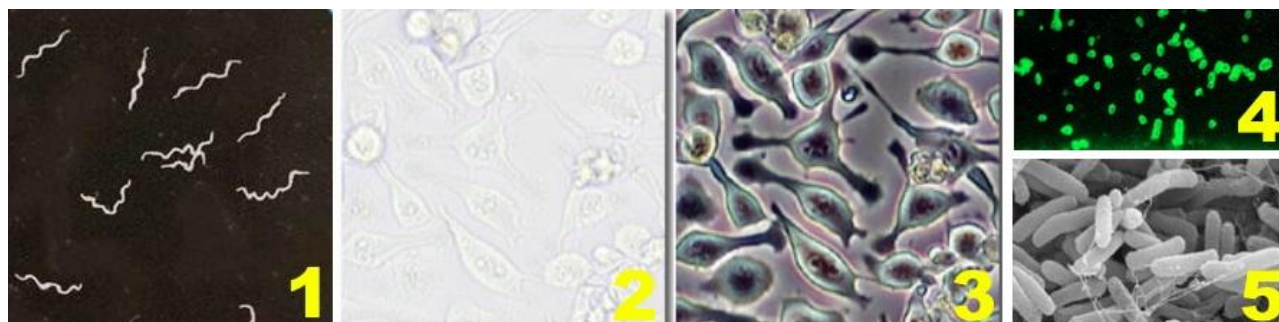
Только очень малая часть объектов исследования в микробиологии обладают собственной (*первичной*) люминесценцией. Большинство необходимо окрашивать **флюорохромами** – люминесцирующими красителями. Используют также **реакцию иммунофлюоресценции**, после проведения которой с помощью люминесцентной микроскопии можно быстро идентифицировать микроорганизм.

13.5. Электронная микроскопия

При **электронной микроскопии** вместо видимого света для «освещения» объекта используется поток электронов. Длина волны при этом уменьшается в десять тысяч раз, а разрешающая способность увеличивается в тысячу раз (0,2 нм против 0,2 мкм у светового микроскопа).

В **просвечивающих** электронных микроскопах установлена **электронная пушка**, которая направляет пучок электронов на заранее подготовленный препарат. Изучаемый объект «прокрашивают» солями тяжелых металлов, после чего из него делают ультратонкие срезы. Проходя через них, часть электронов задерживается и не доходит до *экрана*. Хорошо отражающие электроны части клеток на экране выглядят светлыми, плохо отражающие – темными.

В **сканирующих** электронных микроскопах пучок электронов фокусируется в тонком **зонде**, который движется по поверхности образца. Изображение формируют те электроны, что отражаются от поверхности образца. Если же напылить на образец **электронно-плотное** вещество, то можно получить точную реплику поверхности изучаемого объекта.



1 – темнопольная микроскопия (трипомоны); 2 и 3 – поле зрения в световом и фазово-контрастном микроскопе (живые клетки); 4 – люминесцентная микроскопия (риккетсии); 5 – сканирующая электронная микроскопия (кишечная палочка)

14. Материал для микробиологического исследования: виды, правила забора, хранения, транспортировки в лабораторию. Особенности взятия материала при подозрении на анаэробную инфекцию

14.1. Материалы для микробиологического исследования

Вид материала для микробиологического исследования выбирается исходя из цели исследования. При взятии материала строго соблюдают правила *асептики*.

- **Гной** (серозно-гнойный экссудат):
 - из закрытых очагов берут шприцем, из открытых – шприцем, пипеткой, тампоном;
 - собирают в стерильную пробирку или пробирку с *мясопептонным бульоном*;
 - мазок и посев делаются немедленно (бактерии могут подвергнуться *лизису*).
- **Слизь из зева и носа**:
 - мазок из зева берется натошак при помощи тампона;
 - слизь из носа забирают тампоном после высмаркивания и очистки носа;
 - мазок и посев с тампонов делаются немедленно.
- **Мокрота**:
 - мокроту собирают утром натошак после гигиены полости рта стерильной водой;
 - мокрота сплевывается в стерильную банку, которая сразу же закрывается и отправляется на исследование;
 - мокрота может храниться в холодильнике одни сутки;
 - аналогичным образом собираются **промывные воды бронхов**.
- **Кровь**:
 - в норме кровь – это стерильная жидкость, нахождение в ней бактерий называется *бактериемией*;
 - кровь берется во время озноба или на высоте лихорадки;
 - кровь немедленно разводят большим количеством жидкой среды (1:10), которую выбирают в зависимости от того, какая инфекция предполагается.
- **Сыворотка (плазма) крови** для серологического исследования:
 - кровь для исследования берется утром натошак в чистую сухую пробирку;
 - для транспортировки выделяют **сыворотку** крови (плазму без фибриногена) и немедленно ее замораживают.
- **Моча**:
 - собирают в стерильную, плотно закрывающуюся посуду при помощи *катетера*;
 - предварительно проводится туалет половых органов;
 - у мужчин допустим сбор мочи при естественном мочеиспускании.
- **Выделения из половых органов**:
 - у мужчин исследуют отделяемое из уретры и первую порцию мочи;
 - у женщин исследуют соскобы со стенок влагалища, стенок уретры, отделяемое шейки матки;
 - материал различными способами собирают не ранее чем через 4 часа после мочеиспускания и туалета стерильными тампонами, смоченными стерильным физраствором.
- **Рвота** – собирается в стерильные банки и нейтрализуется растворами солей натрия.
- **Испражнения** – собираются из судна или непосредственно из прямой кишки, после чего сразу же засеваются либо смываются в пробирку со стерильным физраствором.
- **Желчь** – собирается во время дуоденального зондирования.
- **Ликвор** – собирается при выполнении спинномозговой пункции.
- **Биоптаты тканей**.
- **Трупный материал**.

14.2. Взятие материала при подозрении на анаэробную инфекцию

Признаками **анаэробной инфекции** являются:

- гнилостный характер поражения;
- серо-зеленый экссудат резко неприятного запаха;
- наличие газа в тканях.

Основная **задача** – взятие материала в строго анаэробных условиях:

- стерильным шприцем пунктируют замкнутые полости;
- материал вносят во флакон с бескислородной газовой смесью (N, H₂, CO₂);
- при отсутствии транспортных флаконов берут большое количество материала (на-пример, гноя) и сразу же исследуют (анаэробы внутри пробы погибают не сразу);
- нельзя использовать пробы, собранные с поверхности кожи, ран слизистых, а также выделения (мочу, мокроту, желудочное и кишечное содержимое и т.п.).

15. Культуральный (бактериологический) метод исследования: определение, цели, этапы, оценка

15.1. Определение, цели и оценка бактериологического метода

Бактериологический метод исследования – это метод, основанный на выделении чистых культур бактерий с помощью культивирования на питательных средах и их идентификации до вида на основании изучения морфологических, культуральных, биохимических, генетических, серологических, биологических, экологических характеристик.

Обратите внимание: по сути в определении перечислены критерии вида м/о (см. 4.3).

Цели бактериологического метода:

- 1) Постановка диагноза исходя из идентифицированного м/о.
- 2) Определение некоторых свойств м/о, например чувствительности к антибиотикам.
- 3) Определение количества м/о.
- 4) Внутривидовое различие м/о: определение *варов* – *сероваров* и др. для эпидемиологических целей (позволяет ответить на вопрос об общем источнике заражения).

Достоинства метода включают высокую чувствительность и специфичность, возможность определения количества и чувствительности м/о к антибиотикам, а также возможность раннего применения при заболевании. **Недостатки** включают длительность, трудоемкость, опасность инфицирования и высокую стоимость.

Обратите внимание: оценка достоинств и недостатков бактериологического и бактериоскопического методов прямо противоположна за исключением того, что в недостатках обоих числится опасность инфицирования.

15.2. Этапы бактериологического исследования

Схема **бактериологического исследования** для аэробов/факультативных анаэробов и облигатных анаэробов несколько отличается. Особенности, касающиеся облигатных анаэробов, выделены *курсивом*.

▪ **Первый этап:**

1) Забор, транспортировка и хранение материала. *Материал транспортируют с использованием специальных транспортных систем для анаэробов.*

2) Посев в среду обогащения (при необходимости). *Для анаэробов не производится.*

3) Микроскопия с оценкой присутствующей микрофлоры, ее количества. В дальнейшем должны быть выделены такие же м/о, как в первичном мазке.

4) *Предварительная обработка температурным или алкогольным шоком для выделения спорообразующих анаэробов.*

5) Посев методом механического разбавления в чашку с общей, селективной или дифференциально-диагностической питательной средой. *Для анаэробов основой для сред чаще всего служит кровяной агар.*

6) *Посев материала в жидкую тиогликолевую среду для определения летучих жирных кислот.*

▪ **Второй этап:**

1) Изучение морфологии колоний: оценка формы (правильная/неправильная), размера, поверхности (матовая/блестящая/складчатая), краев (ровные/волнистые/зубчатые), цвета (окрашенная/бесцветная), консистенции (вязкая/плотная), прозрачности. *Колонии анаэробов дополнительно можно исследовать в УФ-свете для выявления флюоресценции.*

2) *Хроматография тиогликолевой среды и определение профиля жирных кислот.*

3) Накопление чистой культуры: колонии всех морфотипов пересевают в отдельные пробирки. *Изолированные колонии предполагаемых облигатных анаэробов пересеивают как в анаэробные, так и в аэробные условия, чтобы подтвердить их чувствительность к воздуху.*

▪ **Третий этап:**

1) Оценка чистоты культуры в мазке по Граму: клетки в мазке должны быть морфологически и тинкториально однородными.

2) Окончательная идентификация чистой культуры согласно критериям вида. Чаще всего исследуют биохимические и серологические признаки. *Учитывается профиль жирных кислот.*

3) Определение спектра чувствительности к антибиотикам.

▪ **Четвертый этап:**

1) Учет и анализ результатов.

2) Выдача заключения на бланке.

16. Питательные среды: требования, классификации (по происхождению, составу, консистенции, назначению, цели использования), приготовление. Рост бактерий в жидких и на плотных питательных средах

16.1. Питательные среды: требования и классификация

Питательные среды – разнообразные субстраты для выращивания бактерий в лабораторных или производственных условиях. К ним предъявляются следующие **требования**:

- содержание всех элементов, из которых построена бактериальная клетка;
- влажность (необходима для *диффузии* питательных веществ);
- стерильность;
- изоосмотичность (для предотвращения набухания клеток);
- определенное значение pH и его стабильность (за счет *буферных* свойств);
- для жидких сред – прозрачность (возможность визуального наблюдения за ростом).

Классификация питательных сред:

♦ По происхождению:

- **естественные** – из мяса, молока, картофеля и т.п., состав их непостоянен;
- **искусственные** – в качестве источников азота используют высокомолекулярные органические компоненты (пептон, мясной экстракт, казеин) растительного и животного происхождения; готовятся по рецептам, состав относительно постоянен;
 - *простые искусственные* – из добавок содержат только соли; примеры: мясопептонный бульон, мясопептонный агар и др.);
 - *сложные искусственные* – содержат стимулирующие добавки (сахара, витамины, кровь, микроэлементы и др.);
- **синтетические** – в качестве источника азота используют аминокислоты и другие низкомолекулярные органические и неорганические соединения; состав точен и химически чист; используют при получении вакцин, сывороток, антибиотиков.

♦ По составу:

- **минимальные** – обеспечивают минимальные потребности м/о;
- **полные** – содержат все необходимое для полноценного роста м/о.

♦ По консистенции:

- **плотные** – содержат, помимо жидкого компонента, уплотнители:
 - *агар* (1-3%) – полисахарид морских водорослей;
 - *желатин* – применяется редко, разлагается многими м/о и плавится при 30 °С;
 - *силикагель* – применяется при необходимости исключить органику;
- **полужидкие** – *агар* (0,5%);
- **жидкие** (мясопептонный, сахарный, кровяной бульоны, молоко и др.).

♦ По назначению:

- **общего назначения** – для роста большинства м/о (например, мясопептонный агар);
- **элективные** – подавляют рост большинства м/о, способствуя росту определенных видов; могут содержать антибиотики, антисептики, соли, красители (пример: желточно-солевой агар);
- **дифференциально-диагностические** – позволяют по внешнему виду колоний и среды отделить один вид от другого; могут содержать углеводы, белки, индикаторы pH, красители (пример: среды Эндо, Левина, Клиглера).

♦ По цели использования:

- **транспортные** – способствуют сохранению, но не размножению;
- **обогащения** – обладают элективными свойствами, способствуют размножению;
- **для получения изолированных колоний** (то есть *выделения* чистой культуры);
- **для накопления чистой культуры**;
- **консервирующие** – для длительного хранения в условиях заморозки.

16.2. Приготовление питательных сред

Питательные среды продаются в виде концентратов, готовящихся следующим образом:

- 1) **растворение** навески в *дистиллированной воде* в известных пропорциях;
- 2) **кипячение** (около 1 мин) до полного растворения;
- 3) **стерилизация** в автоклаве (15 мин);
- 4) **внесение добавок** (селективных или стимулирующих);
- 5) **разливка** по стерильным чашкам Петри;
- 6) **подсушивание** застывших сред в термостате (30 мин).

Готовые чашки Петри можно хранить в холодильнике в запаянных пакетах до 10 суток.

16.3. Рост бактерий в жидких и на плотных питательных средах

Рост бактерий в **жидких** питательных средах описывается тремя способами:

- 1) **равномерное помутнение** среды – характерно для факультативных анаэробов;
- 2) **придонное (пристеночное) помутнение** среды – характерно для облигатных анаэробов и стрептококков; осадок может быть плотным, рыхлым, хлопьевидным.
- 3) **пленка на поверхности** среды – характерна для аэробов.

Рост бактерий на **плотных** питательных средах описывается при помощи признаков:

- 1) **размер** – от мелких (1-2 мм) до крупных (более 4 мм);
- 2) **форма** – правильная (круглая), неправильная;
- 3) **край** – ровный, волнистый, зубчатый, складчатый;
- 4) **поверхность** – матовая, блестящая, складчатая;
- 5) **прозрачность** – прозрачная, полу- и непрозрачная;
- 6) **консистенция** – вязкая, плотная (определяется касанием бакпетлей);
- 7) **цвет** – бесцветная, окрашенная.

Окраска колоний или среды вокруг них может быть обусловлена двумя факторами. Некоторые микроорганизмы (например, золотистый стафилококк) могут продуцировать **пигмент**, который окрашивает колонию, а иногда и среду вокруг них. Вторым случаем – это окраска благодаря **специальному составу среды**, в которую могут входить цветные индикаторы pH, избирательно накапливающиеся красители или соли некоторых металлов.

Давая общую характеристику колонии, ее относят к одному из четырех **морфотипов**:

- **S-колонии** (*гладкие*): края ровные, поверхность выпуклая, гладкая и блестящая; чаще всего более вирулентны;
- **R-колонии** (*шероховатые*): края неровные, поверхность плоская, шероховатая и без блеска; чаще всего менее вирулентны;
- **M-колонии** (*слизистые*): окружены слизистым валиком, характерны для клебсиелл;
- **D-колонии** (*карликовые*): видны только под микроскопом (малое увеличение), характерны для микоплазм и L-форм.

Бактерии могут переходить из S-формы в R-форму, что называется **диссоциацией**. У патогенных м/о это наблюдается под действием химиопрепаратов, иммунитета или при попадании во внешнюю среду.

17. Методы выделения чистых культур аэробных, факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий

17.1. Выделение чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных м/о

I. Методы механического разобщения:

- 1) *посев бактериальной петлей*, шпателем или пипеткой:
 - материал на петле расходуется постепенно;
 - по линиям, нанесенным в конце посева, вырастают изолированные колонии;
- 2) *посев пластинчатыми разводками*:
 - в чистые чашки Петри заливают материал в десятикратном разведении, затем заливают расплавленный агар и перемешивают;
 - используют при большом содержании бактерий в материале;
- 3) разобщение *на основе подвижности*:
 - материал засевают в конденсат на скосе мясопептонного агара;
 - подвижные бактерии «мигрируют» вверх по скосу;
- 4) разобщение *на основе размеров*:
 - смесь микроорганизмов фильтруют через микропористые фильтры;
 - используют для получения чистых культур вирусов и микоплазм.

II. Методы, основанные на избирательной чувствительности м/о к воздействию внешних факторов:

- 1) *физических*:
 - высокой температуры (например, выделение спорообразующих бактерий);
 - низкой температуры (выделение *Y. pestis*);
- 2) *химических*:
 - кислот (выделение возбудителей туберкулеза);
 - щелочей (выделение *V. cholera*);
 - солей (выделение стафилококка на ЖСА с 10-15% NaCl);
 - антибиотиков (выделение микоплазм на среде с пенициллином);
 - красителей (выделение микобактерий);
 - специфических ингибиторов (селенит натрия для выделения сальмонелл).

III. Метод заражения чувствительных лабораторных животных основан на явлении быстрого размножения микроорганизмов определенного вида в организмах определенных животных. Другие же виды м/о погибают под действием защитных факторов организма. Этим методом выделяют, например, пневмококк из организма белой мыши.

17.2. Выделение чистых культур облигатно-анаэробных м/о

Основными особенностями культивирования **облигатных анаэробов** являются использование специальных сред и специальных условий.

К **питательным средам** предъявляются следующие **требования**:

- соответствие сложным пищевым потребностям анаэробов (высокопитательные среды с витамином К, геминном);
- содержание стимулирующих добавок (бараньи эритроциты, глюкоза, L-аргинин и др);
- содержание селективных добавок (аминогликозидные антибиотики);
- низкий окислительно-восстановительный потенциал (добавление восстановителей).

Часто используемые **среды**: анаэробный кровяной агар с гентамицином или канамицином и ванкомицином, тиогликолевая полужидкая среда, железо-сульфитный агар.

Специальные условия культивирования подразумевают содержание кислорода в атмосфере не более 0,1%. Для их создания используют *анаэробные камеры* (50-200 чашек Петри), *микроанаэростаты* (10-12 чашек) или *анаэробные пакеты* (1-2 чашки). Анаэробную камеру заполняют анаэробной смесью газов, в остальных случаях кислород связывают химически при помощи водорода с образованием воды.

18. Методы идентификации выделенной чистой культуры бактерий. Идентификация микроорганизмов без выделения чистой культуры

18.1. Идентификация по морфологическим, культуральным и биохимическим критериям

Методы идентификации чистой культуры опираются на критерии вида микроорганизмов (см. подробнее в 4.3).

Наименее надежными из них являются **морфологические** и **культуральные**. Изучения размеров, формы, взаимного расположения, тинкториальных свойств и характера роста на плотных и в жидких средах иногда может быть достаточно для выдачи предварительного заключения.

Достаточно надежно идентифицировать микроорганизм вплоть до вида (иногда подвида) можно при помощи метода **биохимической идентификации**. Его сущность заключается в определении ферментативной активности бактерий, а для анаэробов также определения профиля летучих жирных кислот.

Для определения вида в подавляющем большинстве случаев необходимо проведение многих биохимических тестов (нескольких десятков). Принцип биохимической идентификации (или, по крайней мере, сужения круга поиска) также используется в *дифференциально-диагностических средах*.

Применяются также одноразовые **тест-системы** для биохимической идентификации. Они представляют собой пластиковые планшеты с лунками, заполненными субстратами с индикатором рН. Тест-системы позволяют изучать сразу до 64 биохимических признаков.

Приводим наиболее важные из определяемых **ферментов**:

- **карбогидразы** (гидролиз углеводов) – среды Эндо, Левина, Плоскирева с лактозой и анилиновыми красителями; + окрашенные колонии;
- **желатиназа** (протеаза) – посев уколом в столбик; + разжижение желатина;
- **триптофаназа** (гидролиз триптофана с образованием индола) – МПБ с триптофаном и щавелевой кислотой (индикатор индола); + розовое окрашивание;
- **десульфураза** (удаление серы из цистеина и метионина) – среды с серосодержащими АК и солями железа; + почернение среды из-за образования сульфидов металлов;
- **уреаза** (гидролиз мочевины) – среда с мочевиной и феноловым красным; + покраснение среды;
- **лецитиназа** (расщепление лецитинов) – желточный агар; + появление вокруг колоний опалесцирующих зон (венчиков помутнения);
- **оксидаза** (ОВР) – индикаторная бумага; + фиолетовое окрашивание;
- **каталаза** (ОВР) – внесение капли H₂O₂; + появление пузырьков газа;
- **гемолизины** (вызывают гемолиз эритроцитов) – посев на кровяной агар; **β-гемолиз** (полный) – зоны просветления вокруг колоний; **α-гемолиз** (неполный) – зоны зеленого цвета вокруг колоний; **γ-гемолиз** (отсутствие гемолиза) – без изменений;
- **плазмокоагулаза** (коагуляция плазмы) – внесение культуры в цитратную плазму крови кролика; + образование желеобразного сгустка.

Студент, не страдай! Запомнить ферменты, используемые среды и признаки положительных реакций будет проще после изучения курса частной микробиологии, где все они неоднократно будут упоминаться.

18.2. Идентификация по серологическим, биологическим и генетическим критериям

С целью установления видовой принадлежности бактерий часто изучают их антигенное строение, то есть проводят **серологическую идентификацию** – идентификацию по антигенным свойствам. Каждый микроорганизм имеет в своем составе разные антигенные субстанции. В частности, представители семейства энтеробактерий могут содержать соматический *O-антиген*, жгутиковый *H-антиген* и капсульный *K-антиген*. Их можно опре-

делить с помощью специфических *агглютинирующих антисывороток*. Этот метод относят к одному из главных методов установления вида (и серовара) выделенной культуры.

Чаще всего используется *ориентировочная реакция агглютинации* на стекле. С этой целью на предметное стекло наносят разные диагностические антисыворотки, а затем в каждую каплю вносят небольшое количество чистой культуры. За несколько минут наблюдают за феноменом агглютинации. Образование *агглютината* (хлопьев) свидетельствует о гомологичности антигенов возбудителя и антител диагностической сыворотки, что позволяет определить вид инфекционного агента. При наличии позитивной ориентировочной реакции агглютинации ее ставят в развернутом варианте.

Используются и другие реакции: РНГА, РСК, РП, РИФ, ИФА. Методика их проведения подробно описывается в части второй «Иммунология».

Иногда идентификацию бактерий проводят, заражая лабораторных животных чистой культурой и наблюдая за теми изменениями, которые вызывают возбудители в организме (туберкулез, ботулизм, столбняк, сальмонеллез). Такой метод называют **биологической идентификацией**.

Надежными и высокоспецифичными, но сложными и дорогостоящими **являются молекулярно-генетические** методы идентификации, в особенности основанные на выявлении характерных последовательностей ДНК (ПЦР, ДНК-гибридизация, секвенирование).

Серологический (РИФ для хламидий и микоплазм; ИФА для вируса гепатита В и ВИЧ) и *молекулярно-генетический* (туберкулез, хламидии, вирусы гепатитов) методы идентификации могут применяться **без выделения чистой культуры**, то есть непосредственно в биологическом материале. Это имеет первостепенное значение для экспресс-диагностики, а также для идентификации некультивируемых или плохокультивируемых микроорганизмов.

19. Сравнительная характеристика достоинств и недостатков микробиологических методов исследования

Метод исследования	Достоинства	Недостатки
Микроскопический	+ простота; + доступность; + быстрота; + экономичность	– низкая чувствительность световых микроскопов; – низкая специфичность из-за схожести морфологии м/о разных видов
Бактериологический	+ высокая чувствительность; + высокая специфичность (при дополнении другими методами); + возможность определения количества м/о в материале; + возможность определения чувствительность к антибиотикам; + ранний метод диагностики	– большая длительность; – трудоемкость; – опасность инфицирования; – относительно высокая стоимость
Серологический	+ высокая чувствительность; + высокая специфичность; + ранний метод при выявлении антигенов; + быстрота	– поздний метод при выявлении антител; – частые ложноположительные и ложноотрицательные результаты; – опасность инфицирования
Биологический	+ достаточно высокая чувствительность; + высокая специфичность; + ранний метод исследования	– длительность; – высокая стоимость; – опасность инфицирования – подходит для немногих инфекций
Молекулярно-генетический	+ максимальная чувствительность; + максимальная специфичность; + подходит для некультивируемых организмов; + быстрота; + низкая опасность инфицирования	– во многих случаях требуется подтверждение методами «золотого стандарта» (бактериологическим); – высокая стоимость; – разработаны не для всех инфекционных агентов
Аллергологический	+ быстрота получения результатов; + ранний метод диагностики при ГНТ	– недостаточная чувствительность; – опасность осложнений; – поздний метод диагностики при ГЗТ

30. Учение об инфекции (инфекционном процессе): определение понятия, причины и условия возникновения. Отличия инфекционных и неинфекционных заболеваний. Механизмы и пути передачи возбудителей инфекционных заболеваний. Периоды и исходы инфекционного заболевания

30.1. Инфекция. Отличия инфекционных и неинфекционных болезней

Инфекция (инфекционный процесс) – совокупность физиологических и патологических процессов, которые возникают в **макроорганизме** в результате взаимодействия с патогенными микроорганизмами.

Необходимыми **условиями** развития инфекционного процесса являются:

- 1) **микроорганизм** – причина инфекционного процесса;
- 2) **восприимчивый макроорганизм**;
- 3) **условия внешней среды**, влияющие на взаимодействие первого и второго.

Отличия инфекционных заболеваний от неинфекционных можно разделить на несколько групп:

♦ **особенности распространения:**

- способность возбудителя передаваться от инфицированного человека или животного здоровому – **контагиозность** (заразительность);
- тенденция к **эпидемическому** (массовому) распространению;
- по наследству может передаваться только **предрасположенность**;
- могут передаваться **внутриутробно** или вызывать **тератогенные** эффекты;

♦ **специфика течения и эпидемиологии болезни:**

- возбудитель определяет **специфичность** процесса; эта специфичность, однако, **не абсолютна**: одно заболевание могут вызывать разные м/о (сепсис), а один м/о – разные заболевания (хламидии – трахому, уретрит и орнитоз);
- наличие **инкубационного периода** и остальных **стадий болезни**;
- **сезонность** в течение года (грипп) и **цикличность** на протяжении более длинных периодов (десятилетия), связанная с изменениями вирулентности возбудителя;
- **возрастные различия**: наибольшая восприимчивость детей и пожилых людей;

♦ **роль иммунной системы:**

- формирование **иммунитета** различной степени напряженности и специфичности;
- возможности **специфической профилактики** некоторых болезней.

30.2. Периоды и исходы инфекционного заболевания

	Период заболевания			исходы
	инкубационный	продромальный	разгар	
Длительность	часы – годы	часы – дни	дни – месяцы	- выздоровление (в т.ч. с остаточными явлениями); - хронизация; - микробоносительство; - суперинфекция; - вторичная инфекция; - индукция аутоиммунных процессов; - летальный.
Симптомы	–	неспецифические	специфические	
Микробиология	адгезия и колонизация	размножение, инвазия, продукция токсинов, ферментов и их воздействие на организм;		
Иммунный ответ	распознавание		+ (IgM > IgG)	
Выделение возбудителя в окружающую среду	не выделяется (кроме вируса гепатита А и ВИЧ)	не выделяется (кроме кори и коклюша)	интенсивно выделяется	

Следует помнить, что клиническое выздоровление почти всегда **опережает** полное освобождение организма от возбудителя.

30.3. Механизмы и пути передачи возбудителей инфекционных заболеваний

Вид механизмов передачи	Механизмы передачи	Ворота инфекции	Пути передачи
Горизонтальные	фекально-оральный	кишечник	- алиментарный (пищевой) - водный - прямой контакт (через руки) - непрямой контакт (через предметы обихода, лапки насекомых)
	аэрозольный	респираторный тракт	- воздушно-капельный - воздушно-пылевой
	кровяной	кровь	- трансмиссивный (укус кровососущего насекомого) - парентеральный (инъекционный, гемотрансфузионный) - половой контакт
	контактный	кожа и слизистые оболочки	- раневой - прямой контакт (через руки, половой контакт) - непрямой контакт (через предметы обихода, посуду, игрушки, лапки насекомых)
Вертикальный		ткани плода	- трансплацентарный

31. Роль микроорганизма в инфекционном процессе. Патогенность и вирулентность: определение понятий, характеристика, генетический контроль. Острова патогенности. Секреторные системы. Внутриклеточный паразитизм микроорганизмов (кр. вирусов)

31.1. Роль микроорганизма в инфекционном процессе

На развитие инфекции влияют следующие **особенности микроорганизма**:

- 1) **вид** возбудителя;
- 2) **инфицирующая доза** – минимальное количество микробных клеток, способных вызвать инфекционный процесс (наименьшая у иерсиний чумы – 6-10 клеток);
- 3) **входные ворота** инфекции:
 - могут быть специфичными (кровь для риккетсий, ЖКТ для сальмонелл и т.д.);
 - могут иметься несколько вариантов (гонококк: половые органы, конъюнктура, прямая кишка; стафилококк: кожа, органы дыхания, мочеполовая система и др.);
 - реже всего воротами служит неповрежденная кожа (лептоспиры, франциселлы);
 - в неестественном биотопе бактерии погибают.
- 4) **патогенность** и **вирулентность**.

31.2. Патогенность и вирулентность. Острова патогенности

Патогенность – видовой признак возбудителя, характеризующий его потенциальную способность вызывать инфекционный процесс у чувствительного к нему хозяина. Патогенность характеризуют следующие признаки:

- **потенциальность** – необходимо наличие восприимчивого макроорганизма и условий среды;
- **видовой признак** – возбудитель патогенен для ограниченного числа видов;
- **полидетерминантность** – обусловленность совокупностью генов и мобильных генетических элементов;
- **специфичность** – способность вызывать типичные изменения у макроорганизма;
- **динамичность** – приобретение, усиление, ослабление или утрата патогенности.

По степени патогенности различают микроорганизмы:

- 1) **облигатно-патогенные** – активно проникают в здоровые организмы, преодолевая их защитные механизмы; отношения с хозяином – *паразитизм*;
- 2) **условно-патогенные (оппортунистические)** – как правило, не вызывают заболеваний у здорового человека, могут колонизировать его кожу и слизистые, находятся в отношениях *мутуализма, комменсализма* или *нейтрализма*; однако при определенных условиях (иммунодефициты, обширные повреждения наружных покровов, массивность инфицирования) все же могут инициировать инфекционный процесс;
- 3) **непатогенные (сапрофиты)** – колонизируют кишечник, слизистые, кожу человека, где обеспечивают защиту от патогенных бактерий, переваривание, синтез витаминов и др.

Островами патогенности называют нестабильные фрагменты ДНК (хромосомной или плазмидной), гены которых отвечают за высокий уровень патогенности. Они характеризуются следующим:

- составляют 5-20% генома и кодируют один или более *факторов патогенности*;
- могут утрачиваться (вместе с патогенностью) и передаваться другим м/о;
- способны к горизонтальной внутри- и межвидовой передаче, поэтому по отношению Г+Ц отличаются от остального генома (из-за своего чужеродного происхождения);
- содержат гены, кодирующие механизмы генетического обмена (транспозоны и др.).

31.3. Вирулентность

Вирулентность – свойство микроорганизма, характеризующее меру патогенности конкретного штамма патогенного возбудителя, то есть степень фенотипического проявления патогенности в момент исследования. Ее характеризуют следующие признаки:

- **индивидуальный признак** – относится не к виду, а к штамму;
- **вариабельность** – штаммы внутри вида могут быть высоковирулентными (малая инфицирующая доза), умеренновирулентными (большая инфицирующая доза), слабовирулентными (поражают ослабленных лиц) и авирулентные (не вызывают инфекцию);
- **динамичность** – снижение (*аттенуация*) или повышение вирулентности:
 - *генотипическая* (мутации, рекомбинации, утрата или приобретение внехромосомных факторов наследственности);
 - *фенотипическая* (пассирование культур через иммунные организмы (снижение) или высоковосприимчивые организмы (повышение вирулентности)).

Количественные критерии определяются в условиях эксперимента на животных:

- DCL – доза микробных клеток, которая является смертельной для 100% животных;
- DLM – доза микробных клеток, которая является смертельной для 95% животных;
- LD50 – доза микробных клеток, которая является смертельной для 50% животных;
- ИД50 – доза микробных клеток, вызывающая клиническое заражение 50% животных;

31.4. Секреторные системы

Для реализации вирулентности нужны механизмы доставки патогенных протеинов на поверхность бактериальной клетки или их введения непосредственно в эукариотическую клетку. Для этой цели у микроорганизмов имеются **секреторные системы** четырех типов:

Тип	Примеры белков	Особенности секреции
I	<i>E.coli</i> : α-гемолизин, <i>B. pertussis</i> : АЦ	• белок в процессе транспорта <u>не</u> изменяется; • белок за один этап проходит через ЦПМ и НМ; • белок транспортируется <u>на поверхность</u> клетки м/о
II	эластаза, фосфолипаза С	• в процессе транспорта от белка <u>отщепляется конечный фрагмент</u> ; • на первом этапе при участии <i>sec</i> -белков проходит ЦПМ; • на втором этапе <u>без участия</u> дополнительных белков проходит НМ
III	белки <i>Shigella</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Klebsiella</i>	• белок в процессе транспорта не изменяется; • белок за один этап проходит через ЦПМ и НМ; • белок транспортируется непосредственно <u>в цитоплазму эукариотической клетки</u>
IV	<i>H. pylori</i> : цитотоксин	• на первом этапе при участии <i>sec</i> -белков проходит ЦПМ; • на втором этапе <u>с участием</u> дополнительных белков проходит НМ

30.5. Внутриклеточный паразитизм

К облигатным внутриклеточным паразитам относят (кроме вирусов) риккетсии, хламидии и *M. leprae*, которые удовлетворяют свои трофические потребности только в условиях внутриклеточного существования. Клетка также защищает их от действия антител, фагоцитоза, бактериофагов и антибиотиков.

К факультативным внутриклеточным паразитам, которые могут существовать вне клетки, но размножаются преимущественно внутри, относят возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, туляремии, гонореи, сальмонеллеза и др.

32. Факторы патогенности (вирулентности) микроорганизмов: адгезины, инвазины, факторы подавления иммунной системы, токсины, аллергены. Типы экзотоксинов и их биологические свойства

32.1. Понятие о факторах патогенности

Факторы патогенности – приспособительные механизмы возбудителей инфекционных болезней к меняющимся условиям макроорганизма, синтезируемые в виде специализированных структурных или функциональных молекул.

У **облигатно-патогенных** бактерий набор факторов патогенности специфичен для вида, а у **условно-патогенных** – малоспецифичен и изменчив (чаще всего это эндотоксин и ферменты-токсины). Среди **вирусов** непатогенные штаммы отсутствуют.

В роли факторов патогенности могут выступать:

- 1) **структурные компоненты** микробной клетки (белки, полисахариды, липиды и их комплексы);
- 2) **ферментные системы**;
- 3) **метаболиты**, выделяемые в среду;
- 4) бактериальные **токсины**.

Факторы патогенности объединяют в следующие основные группы: адгезины, инвазины, факторы агрессии и токсины (эндо- и экзотоксины).

32.2. Адгезины. Инвазины

Адгезины обеспечивают **адгезию** – способность м/о адсорбироваться на чувствительных клетках. Адгезины прикрепляются к **рецепторам адгезии** макроорганизма, которые по случайности комплементарны им либо образовались вследствие патологического процесса (гемагглютинин вируса, встроенный в мембрану). Если подходящих рецепторов адгезии нет, м/о не способен к заражению организма (основа **врожденного иммунитета**).

Адгезии способствуют следующие **факторы**:

- 1) **неспецифические** физико-химические взаимодействия (гидрофобные, снижение отрицательного заряда бактерий);
- 2) **адгезины**:
 - **пили** I и IV типов (**Грам–** бактерии);
 - **поверхностные белки** и **тейхоевые кислоты** клеточной стенки (**Грам+** бактерии);
 - **ЛПС** клеточной стенки;
 - **гемагглютинины** вирусов.

С процессом адгезии тесно связана **колонизация** – устойчивое размножение бактерий, ведущее к их накоплению. Колонизации способствуют такие факторы патогенности, как капсула, ферменты, разрушающие слизь (**нейраминидаза, лецитиназа**).

Инвазины обеспечивают **инвазию** – способность проникать через слизистые оболочки, кожу и соединительнотканые барьеры во внутреннюю среду организма и распространяться в ней. Инвазии способствуют следующие факторы:

- 1) **механические** – проникновение за счет подвижности:
 - через неповрежденную кожу и слизистые (лептоспиры);
 - через микротравмы кожи и слизистых (бледная трепонема);
- 2) **химические** – за счет микробных ферментов:
 - **гиалуронидаза** – расщепление основного компонента соединительной ткани – сиаловой кислоты (*C. perfringens*, стрепто- и стафилококки);
 - **нейраминидаза** – расщепление сиаловой кислоты, составляющей межклеточную основу между клетками эпителия (*N. meningitidis*, микоплазмы, вирус гриппа);
 - **фибринолизины** – растворение сгустков фибрина (стрепто- и стафилококки);
 - **коллагеназа** – расплавление мышечной ткани (*C. perfringens*, *C. histolyticum*);

3) *биологические:*

- инвазия при помощи *переносчиков* (боррелии – вши, иерсинии чумы – блохи);
- внутриклеточное проникновение: облигатный внутриклеточный паразитизм (риккетсии, хламидии и *M. leprae*), пенетрация и разрушение эпителиоцитов (эшерихии, сальмонеллы, иерсинии);
- внедрение чужеродного генетического материала (ДНК-овые и ретровирусы).

32.3. Факторы агрессии

Агрессины (факторы агрессии) обеспечивают способность возбудителя противостоять элиминирующим механизмам макроорганизма. К факторам агрессии относятся:

1) *антифагоцитарные факторы:*

- подавление поглощения (капсула, М-белок стрептококков, Vi-антиген *S. typhi*);
- подавление слияния фагосомы с лизосомой (сульфатиды микобактерий);
- выживание внутри фаголизосомы (супероксиддисмутаза стафилококков);
- выход из фагосом (фосфолипаза листерий);
- выживание внутри фагоцитов (*M. tuberculosis*, *S. typhi*, *L. pneumophila* и др.);
- деструкция макрофагов (экзотоксин *P. aeruginosa*, бруцеллы – после поглощения).

2) *ферменты агрессии:*

- *протеазы* – разрушение иммуноглобулинов;
- *плазмокоагулаза* – свертывание плазмы с образование фибринозного чехла;
- *лецитиназа* – разрушение мембран лейкоцитов;
- *ДНК-аза*;

3) *антигенная изменчивость* (боррелии);

4) *антигенная мимикрия* (β -гемолитические стрептококки А, иерсинии чумы);

5) *белки теплового шока* – аутоиммунные процессы (боррелии);

6) *угнетение* (вирус кори) или *разрушение* (ВИЧ) *T-хелперов*.

32.4. Эндотоксины

Эндотоксины – это *липополисахариды* клеточной стенки (преимущественно **Грам-**бактерий), выделяющиеся только после гибели бактерий. Наиболее токсичной частью КС является *липид А*. Эндотоксины характеризуются следующим:

- относительно экзотоксинов менее токсичны, но действуют быстрее;
- неспецифичны: эндотоксины разных бактерий вызывают схожие эффекты;
- являются слабыми антигенами, протективные антитела к ним не образуются;
- не инактивируются температурой (*термостабильны*) и формалином.

Поступление в кровь малых доз эндотоксина приводит к увеличению температуры тела (выделение ИЛ-1 гранулоцитами и моноцитами), активации комплемента по альтернативному пути, пролиферации В-лимфоцитов, усилению противоопухолевого и противовирусного иммунитета.

Поступление в кровь больших доз эндотоксина приводит к развитию *инфекционно-токсического шока*. В основе его патогенеза лежат активация комплемента, выделение цитокинов, образование нитратов и другие механизмы, в конечном счете приводящие к расширению сосудов, увеличению их проницаемости и развитию *ДВС-синдрома*. Клиническая картина включает нарастание лихорадки, снижение АД, спутанность сознания, сыпь, тошноту и рвоту, симптомы почечной и печеночной недостаточности.

Развитие инфекционно-токсического шока при лечении инфекций, вызванных **Грам-**бактериями, можно предотвратить использованием бактериостатических антибактериальных препаратов (а не бактерицидных).

33. Типы экзотоксинов и их биологические свойства

33.1. Экзотоксины. Свойства экзотоксинов

Экзотоксины – это вещества *белковой природы*, которые секретируются микробной клеткой прижизненно. Продуцируют экзотоксины как Грам+, так и Грам– бактерии. Экзотоксины характеризуются следующим:

- относительно эндотоксинов более токсичны, но имеют латентный период;
- специфичны: экзотоксины разных бактерий вызывают различные эффекты;
- являются сильными антигенами, к ним образуются антитела – *антитоксины*;
- некоторые термолabileны (столбнячный, дифтерийный), другие *термостабильны* (ботулинический);
- некоторые инактивируются формалином с получением *анатоксина* (утрачивает токсичность, но сохраняет иммуногенность), используемого для вакцинации;
- зачастую отсутствуют у непатогенных штаммов (энтеротоксины *E. coli*);
- различные штаммы могут продуцировать разные экзотоксины (*S. aureus*);
- некоторые экзотоксины находят прямое медицинское применение (*ботулотоксин* – уменьшение морщин, спазмов мышц; *стрептокиназа* – тромболитическая терапия);

Большинство экзотоксинов составляют единую полипептидную цепь, требующую для активации *протеолиза*, но некоторые состоят из двух фрагментов: токсической субъединицы **A** и транспортной субъединицы **B** (холерный и коклюшный токсины).

Также большинство экзотоксинов выделяются во внешнюю среду прижизненно (полностью или частично), однако некоторые хотя и вырабатываются клеткой прижизненно, во внешнюю среду выделяются только при ее разрушении, поскольку структурно прочно с ней связаны («мышинный» токсин *Y. pestis*, экзотоксины *S. dysenteriae*).

33.2. Классификация экзотоксинов

По механизму действия бактериальные токсины подразделяют на шесть групп:

1) **Мембранотоксины** – повреждают клеточные мембраны с образованием пор и последующим разрушением клеток вследствие нарушения ионного баланса (α -токсин *S. aureus*, стрептолизин *Streptococcus pyogenes*).

2) **Ингибирование синтеза белка** – повреждение рРНК или фактора элонгации с последующей гибелью клеток (дифтерийный экзотоксин).

3) **Активация путей вторичных посредников** – нарушение синтеза белков без непосредственной гибели клеток (холероподобные токсины – \uparrow АЦ и цАМФ, термостабильный энтеротоксин *E. coli* – \uparrow ГЦ и цГМФ; нейротоксины *C. botulinum* и *C. tetani* – белки синаптических пузырьков).

4) **Суперантигены** – напрямую активируют множество Т-лимфоцитов, приводя к:

- выбросу больших количеств *цитокинов* и развитию токсических проявлений (вплоть до инфекционно-токсического шока);
- аутоиммунным реакциям вследствие активации *аутореактивных* В- и Т-лимфоцитов;
- снижению количества *T-хелперов*, а значит ослаблению иммунитета.

5) **Эксфолиатины** *S. aureus* – влияют на процесс взаимодействия клеток и межклеточного вещества, приводя к отслоению эпидермиса («пузырчатка новорожденных»).

6) **Эритрогенины** *S. pyogenes* – вызывают сыпь при скарлатине и покраснение кожи.

34. Роль макроорганизма, природных и социальных факторов в инфекционном процессе. Механизмы, контролирующие репродукцию инфекционных агентов *in vivo*. Механизмы персистенции микроорганизмов

34.1. Роль макроорганизма: контроль репродукции инфекционных агентов *in vivo*

Важнейшим фактором, влияющим на восприимчивость макроорганизма, является состояние **конститутивных** (врожденный иммунитет) и **индуцибельных** (приобретенный иммунитет) **иммунных механизмов**. Наличие и характер инфекционного процесса обуславливаются состоянием иммунной системы макроорганизма в той же мере, в какой они обуславливаются патогенностью микроорганизма. Развитие инфекционного процесса означает нарушение баланса между *резистентностью* хозяина и *патогенностью* м/о.

Конститутивные механизмы (анатомические и гистогематические барьеры, выделительная реакция, воспаление, фагоцитоз, НК-клетки, система комплемента и др.) характеризуются следующим:

- природные, врожденные механизмы;
- неспецифичны;
- обеспечивают защиту на ранних этапах развития инфекции.

Индукцибельные механизмы (гуморальный и клеточный иммунитет) характеризуются следующим:

- развиваются как реакция на конкретное инфекционное заболевание;
- высокоспецифичны;
- обеспечивают защиту на поздних стадиях инфекции.

34.2. Роль макроорганизма: остальные факторы

Помимо состояния иммунитета, на восприимчивость макроорганизма влияют:

- 1) **возраст** – дети и пожилые люди более восприимчивы;
- 2) **состояние нервной и эндокринной систем** – люди с нарушениями более восприимчивы, поскольку иммунокомпетентные клетки имеют рецепторы для нейроэндокринных медиаторов (АКТГ, СТГ, кортикостероиды, КА, серотонин и др.);
- 3) **перенесенные и хронические заболевания**, ослабляющие иммунитет;
- 4) **образ жизни**:
 - + двигательная активность, рациональное питание, положительные эмоции, режим отдыха, нормальная масса тела, соблюдение личной гигиены, закаливание;
 - ожирение, вредные привычки (табакокурение, злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков), беспорядочные половые связи;
- 5) **наследственная предрасположенность**:
 - система **Ig**-генов определяет интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа к конкретному возбудителю;
 - гены, контролирующие степень естественного иммунитета к возбудителю.

34.3. Роль природных и социальных факторов внешней среды

Природные и социальные факторы оказывают косвенное влияние на инфекционный процесс. Можно говорить, что развитие инфекционного процесса означает нарушение баланса между *резистентностью* хозяина и *патогенностью* микроорганизма в сложившихся условиях окружающей среды.

- 1) **Природные факторы** – влияют и на микро-, и на макроорганизм:
 - **температура**;
 - **природные очаги** инфекционных заболеваний (малярия, клещевой энцефалит);
 - **химические загрязнения**;
 - **радиационный фон**;

- *стихийные бедствия*, природные катаклизмы.
- 2) **Социальные факторы** – влияют только на макроорганизм:
 - *санитарная обстановка*, бытовые условия;
 - уровень *материального достатка*;
 - *национальные обычаи*;
 - уровень *развития здравоохранения*.
- 3) **Терапевтические воздействия**.

34.4. Способы сохранения жизнедеятельности возбудителей во внешней среде

Некоторые патогенные бактерии обладают способностью к образованию **эндоспор** – метаболические неактивных (покоящихся) форм. Эндоспоры образуются при попадании вегетативной клетки в неблагоприятную внешнюю среду. Стимулируют спорообразование следующие факторы:

- *недостаток питательных веществ*;
- *высушивание*;
- накопление в среде в большом количестве *токсичных продуктов обмена*;
- *минеральные соли*, содержащие ионы кальция, магния, калия, марганца, железа;
- минимальные концентрации некоторых *редких металлов* (кобальта, лития, кадмия).

Споры очень **резистентны** к физическим (высушиванию, высокой температуре, радиации, вакууму) и химическим (дезинфектантам, токсическим веществам, кислороду) факторам. Это позволяет им выжить в условиях, губительно действующих на вегетативные клетки.

Помимо этого, бактерии имеют следующие **приспособления** для развития в относительно неблагоприятных условиях окружающей среды:

- *низкие температуры (психрофилы)* – ферменты с низкой температурой активации, повышенное содержание ненасыщенных ЖК в мембранах, синтез глицерола;
- *высокие температуры (термофилы)* – термостабильность структурных белков и ферментов, повышенное содержание длинноцепочечных насыщенных ЖК;
- *экстремальные значения рН (ацидо- и алкафилы)* – поддержание нормального внутриклеточного рН благодаря устройству КС и метаболическим процессам;
- *высокие концентрации солей (галофилы)* – синтез осмопротекторов – низкомолекулярных веществ, уравнивающих внешнее давление;
- *излучение* – пигментообразование (световое, ультрафиолетовое), относительная простота генетического аппарата и механизмы репарации (радиационное).

34.5. Персистенция микроорганизмов

Персистенция микроорганизмов может развиваться в том случае, если иммунные реакции лишают возбудителя возможности реализовывать патогенные свойства, но не могут удалить его из организма (*бактерионосительство*), или как составная часть патогенеза (сифилис, туберкулез, бруцеллез).

Персистенция может быть обусловлена следующими **механизмами**:

- внутриклеточной локализацией возбудителя (хламидии);
- нахождением возбудителя в локальных очагах и забарьерных органах (например, в головном мозге);
- стадийностью развития возбудителя (хламидии);
- способностью образовывать покоящиеся формы (L-формы бактерий, малые формы риккетсий);
- антигенной мимикрией (стрептококки);
- способностью противостоять защитным реакциям макроорганизма (капсульные бактерии) и слабой индукцией иммунного ответа;
- интеграцией генома с хромосомой клетки-мишени (ДНК-вирусы и ретровирусы).

35. Классификации и примеры инфекционных заболеваний: по природе возбудителя; степени выраженности клинических проявлений; длительности течения; кратности заражения; числу видов возбудителей

I. По природе возбудителя:

- 1) **бактериальные** (бактериозы);
- 2) **вирусные** (вирусозы);
- 3) **грибковые** (микозы);
- 4) **инвазии** (протоозы и гельминтозы);
- 5) вызванные **членистоногими эктопаразитами**
- 6) **прионные**;
- 7) **пищевые интоксикации** – отравления накопившимися в пищевых продуктах экзотоксинами бактерий или грибов.

II. По степени выраженности клинических проявлений:

- 1) **манифестная** – выраженная (*типичная* форма) или слабовыраженная (*атипичная* форма) симптоматика, стадийное течение;
- 2) **инаппарантная** (бессимптомная, субклиническая) – развитие патологических изменений внутренних органов (обычно невыраженных) при отсутствии внешней симптоматики;
- 3) **латентная** – хроническая инаппарантная инфекция, при которой возбудитель паразитирует внутриклеточно и не выделяется в окружающую среду; возможна *реверсия* обычных свойств возбудителя и переход в манифестную инфекцию (герпес);
- 4) **микробоносительство** – выделение возбудителя при отсутствии клинических проявлений болезни, может быть острым, хроническим (более 3 месяцев) и транзиторным;
- 5) **абортивная** – возбудитель после проникновения в макроорганизм элиминируется благодаря высокой резистентности организма.

III. По длительности течения:

- 1) **молниеносные** (фульминантные) – летальный исход в течение суток от начала болезни (молниеносно-токсический грипп, молниеносный менингококковый сепсис);
- 2) **острые** – протекают не более 3 месяцев, заканчиваются выздоровлением (ангина), переходом в хроническую форму (хронический тонзиллит) или смертью (тонзиллярный сепсис);
- 3) **подострые** (затяжные) – протекают от 3 до 6 месяцев (подострый инфекционный эндокардит);
- 4) **первично-хронические** – изначально имеют хроническое течение, инкубационный период длительный, протекают более 6 месяцев, зачастую с периодами ремиссий и рецидивов; иммунный ответ выражен слабо (туберкулез, оспа);
- 5) **медленные** – очень длительный инкубационный период (до 20 лет), неуклонное прогрессирование, поражение ЦНС и неминуемый летальный исход (ВИЧ-инфекция, подострый склерозирующий панэнцефалит, прионные болезни);
- 6) **вторично-хронические** – развиваются как исход острой инфекции, возбудитель персистирует в организме в течение нескольких месяцев, лет или десятилетий; возможно полное выздоровление (хронический тонзиллит, гастрит).

IV. По кратности заражения:

- 1) **однократное**;
- 2) **суперинфекция** – заражение тем же видом до полного выздоровления;
- 3) **реинфекция** – заражение тем же видом после полного выздоровления (либо при невыработке иммунитета, либо другим сероваром (гонококки, вирус гриппа));
- 4) **рецидив** – возврат клинических симптомов без повторного заражения, а в результате реактивации оставшихся в макроорганизме возбудителей (герпес, возвратный тиф, болезнь Брилля-Цинссера после сыпного тифа);

5) **вторичная инфекция** – заражение другим видом до полного выздоровления (стафилококковая постгриппозная пневмония).

V. По числу видов возбудителей:

1) **моноинфекции** – вызваны одним видом микроорганизмов;

2) **смешанные** (микст-инфекции) – вызваны одновременно несколькими видами микроорганизмов, обычно протекают тяжелее, хуже диагностируются и поддаются лечению (*микроорганизмы-синергисты*, например вирус гриппа и стафилококк); в редких случаях возбудители подавляют патогенность друг друга (*микроорганизмы-антагонисты*, например патогенная *E. coli* и патогенные сальмонеллы).

36. Классификации и примеры инфекционных заболеваний: по пути инфицирования; месту заражения; степени распространения в организме хозяина; распространению и охвату территории; степени контагиозности

VI. По пути инфицирования:

- 1) *экзогенная* – проникновение патогенного микроорганизма извне: от больных и носителей, из окружающей среды с водой, пищей, воздухом, почвой;
- 2) *эндогенная* (оппортунистическая) – активация условно-патогенных представителей нормальной микрофлоры в результате ослабления резистентности (иммунодефициты, переохлаждение, операции и т.п.);
- 3) *аутоинфекция* – перенос м/о в нехарактерный для него биотоп в пределах одного макроорганизма (гонококковый конъюнктивит при занесении гонококка с половых органов).

VII. По месту заражения:

- 1) *внебольничная*;
- 2) *внутрибольничная* (нозокомиальная) – инфекционное заболевание, связанное с обращением человека за медицинской помощью с учетом ориентировочных сроков заражения; наиболее часто их вызывают условно-патогенные микроорганизмы с высоким спектром резистентности к антибиотикам;

VIII. По степени распространения в организме хозяина:

- 1) *очаговая* (местная, локальная) – м/о размножается только в месте внедрения, не распространяется по организму из ворот инфекции, выраженная общая реакция не наблюдается;
- 2) *системная* – инфекция с преобладающей локализацией процесса в определенных органах и системах, но с выраженными общими реакциями;
- 3) *генерализованная* – микроорганизм распространяется (диссеминирует) из ворот инфекции лимфогенным, гематогенным путем или по отросткам нейронов:
 - *вирусемия* – циркуляция вирусов в крови как стадия патогенеза;
 - *бактериемия* – циркуляция бактерий в крови без признаков токсемии;
 - *токсинемия* – циркуляция в крови бактериальных токсинов (коринебактерии, клостридии);
 - *сепсис* – поражение бактериями крови как органа-мишени (*септицемия*) с возможным возникновением гнойных очагов во внутренних органах (*септикопиемия*).

IX. По распространению и охвату территории:

- 1) *спорадические* – отдельные случаи, не связанные между собой эпидемиологически;
- 2) *эндемические* – встречаются только в определенной местности (клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка, малярия);
- 3) *эпидемические* – множественные случаи, связанные между собой эпидемиологически:
 - *вспышки* – кратковременный подъем заболеваемости в ограниченном коллективе или популяции (пищевые токсикоинфекции, вирус Коксаки);
 - *эпидемии* – прогрессирующее во времени и пространстве распространение инфекционного заболевания среди людей, значительно превышающее обычно регистрируемый на данной территории уровень заболеваемости (грипп, корь, чума);
 - *пандемии* – эпидемии, распространяющиеся на территории нескольких стран, регионов или континентов (грипп, холера).
- 4) *экзотические* – совершенно несвойственные для данной местности, зачастую «завозные» (малярия для Беларуси).

X. По степени контагиозности (заразности):

- 1) *неконтагиозные* – ботулизм, псевдотуберкулез, стафилококковая пищевая инфекция;
- 2) *малоконтагиозные* – инфекционный мононуклеоз, бруцеллез, орнитоз;
- 3) *контагиозные* – грипп, дизентерия, брюшной тиф;
- 4) *высококонтагиозные* – натуральная и ветряная оспа, холера, коклюш.

37. Понятие об источнике и механизмах передачи инфекции. Примеры зоонозов, антропонозов, сапронозов. Микробиологические методы выявления источников инфекции и факторов её передачи

37.1. Источник и механизмы передачи инфекции

Механизм передачи инфекции – способ перемещения возбудителя инфекционной или паразитарной болезни из зараженного организма в восприимчивый. Механизмы передачи описаны в 30.3.

Источники инфекции – это люди, животные, растения или неживые объекты, от которых возбудители инфекций тем или иным путем передаются другим особям популяции этого же или других видов. В источнике инфекции возбудитель накапливается и выделяется из него в больших количествах.

В зависимости от источника инфекции болезни человека разделяются на пять **групп**:

1) **антропонозы** – источником является только человек, в том числе бактерионоситель (полиомиелит, холера, вирусные гепатиты, корь, коклюш, дифтерия, сифилис, гонорея, хламидиоз, ВИЧ-инфекция);

2) **зоонозы** – источником являются почти исключительно животные, от которых человек заражается при прямом контакте, употреблении зараженных продуктов либо через укусы переносчиков (бешенство, орнитоз, бруцеллез, сибирская язва, вирусные геморрагические лихорадки);

3) **антропозоонозы** – источником инфекции чаще является человек, реже – животное (туберкулез);

4) **зооантропонозы** – источником инфекции чаще является животное, реже – человек (чума);

5) **сапронозы** – резервуаром возбудителя являются объекты внешней среды, сами возбудители или их продукты попадают в организм, как правило, случайно (столбняк, ботулизм, газовая гангрена, легионеллез).

37.2. Микробиологические методы выявления источников инфекции

Микробиологические исследования способствуют постановке как клинического диагноза у больных, так и эпидемиологического диагноза ситуации в очаге. В зависимости от особенностей клинической картины болезни и механизма передачи возбудителя исследованию подлежат различные материалы от больных (кровь, моча, мокрота, фекалии, гной, цереброспинальная жидкость, слизь из зева, носа, волосы, ногти, желчь, промывные воды желудка и др.).

При уточнении факторов передачи возбудителя инфекции могут подвергнуться исследованию **вода** (водопроводная, из колодцев, из открытых водоемов, сточные воды), **пищевые продукты, объекты животного происхождения** (шкуры, шерсть, кости), **смывы** (с рук, посуды, предметов обихода), **почва, членистоногие**, способные служить переносчиками возбудителей инфекции (мухи, комары, блохи, клещи и др.), и т.п.

Выявление и идентификация возбудителя **бактериологическим, вирусологическим, серологическим** или **молекулярно-генетическим** методами служит бесспорным основанием для выявления его источника и лиц, заразившихся в окружении источника, а также имеет большое значение для проведения соответствующих противоэпидемических мероприятий.

Нередко результаты микробиологического исследования оказываются незаменимыми для выявления факторов передачи возбудителя (например, воды, почвы, пищи, переносчиков) и установления степени зараженности их патогенными микроорганизмами.

38. Биологический (экспериментальный) метод исследования: определение, цели, этапы, оценка

38.1. Биологический метод исследования: определение, цели, оценка

Биологический (экспериментальный) метод исследования – совокупность способов искусственного воспроизведения клинической картины инфекционных болезней или их синдромов на лабораторных животных.

Цели биологического метода:

- 1) выделение и идентификация чистой культуры микроорганизмов, если её невозможно получить на питательных средах:
 - из-за большого количества в материале посторонней микрофлоры,
 - для выделения микроорганизмов, которые на питательных средах не растут (риккетсии, вирусы).
- 2) определение степени вирулентности и патогенности микроорганизмов.
- 3) индикация и идентификация экзотоксинов.
- 4) изучение патогенеза инфекционных болезней.
- 5) производство биологических препаратов (профилактических, диагностических и лечебных сывороток, вакцин, культур тканей).
- 6) проверка безвредности и эффективности лечебных препаратов.

Достоинства	Недостатки
+ достаточно высокая чувствительность;	– длительность;
+ высокая специфичность;	– высокая стоимость;
+ ранний метод исследования;	– опасность инфицирования;
+ представляет большую научную ценность	– подходит не для всех инфекций;
	– морально-этические аспекты

38.2. Биологический метод исследования: этапы

I. Забор и обработка материала – без особенностей; материал должен использоваться для заражения как можно быстрее.

II. Выбор и заражение лабораторного животного:

а) **выбор животного:**

- обуславливается целями исследования, но главным образом – чувствительностью вида к данной инфекции;
- наиболее часто используются белые мыши (4/6), белые крысы (1/6), морские свинки и кролики;
- помимо нелинейных животных, постоянно разводимых в лабораториях, могут использоваться линейные животные определенных линий, которые являются генетически однородными, проявляют одинаковые реакции на патогенные факторы, а также обладают повышенной или пониженной чувствительностью к определенным возбудителям или опухолевым заболеваниям;

б) **заражение животного:**

- проводится с соблюдением правил асептики и, если вмешательство болезненное, с анестезией;
- накожный метод – нанесение материала на царапину от скарификационной иглы;
- внутрикожный метод – введение под кожу тонкой иглой под острым углом с образованием вздутия в виде «лимонной корочки»;
- подкожный метод – введение в основание кожной складки;
- внутримышечный метод – введение в верхнюю треть задней лапы животного;
- внутривенный метод – введение в краевую вену уха кроликов, яремную вену морских свинок, хвостовую вену крыс или мышей;

- *пероральный метод* – введение с помощью зонда;
- *интраназальный метод* – введение нос после наркотизирования животного;
- *внутрибрюшинный метод* – введение притупленной иглой через брюшную стенку;
- *внутримозговой метод* – введение интракраниально, используется для возбуждения, тропных к нервной ткани.

III. Прижизненное наблюдение, умерщвление животного и вскрытие трупа:

а) *прижизненное наблюдение:*

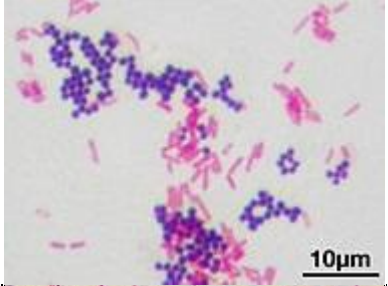
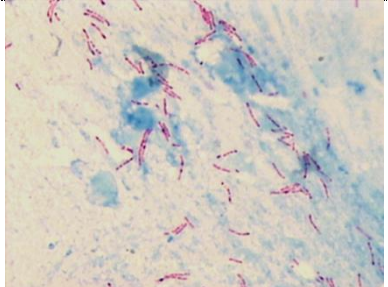
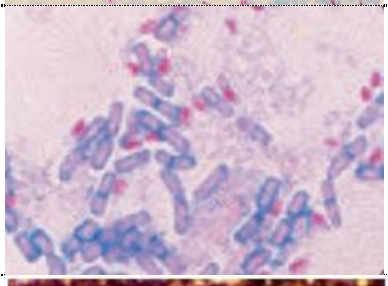
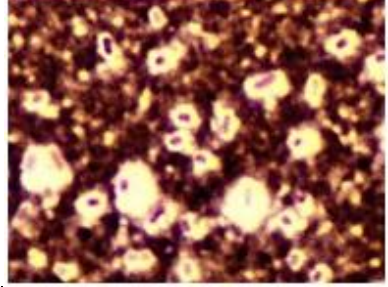
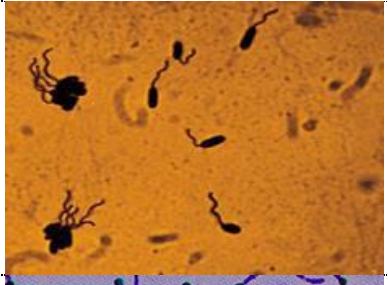
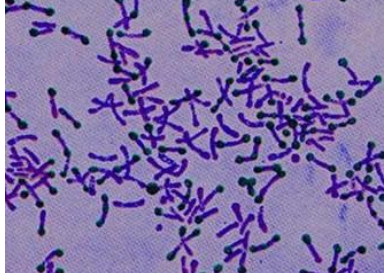
- учитывается появление характерной симптоматики, инфильтратов, гибель животного;
- у животного забирают материал для бактериологического и серологического исследования, ставят аллергические пробы;


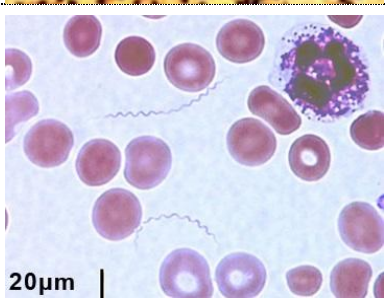
б) *умерщвление животного и вскрытие трупа:*

- животных, которые при эксперименте существенно утратили жизнеспособность или находятся в агонии, умерщвляют гуманным методом;
- при вскрытии изучают патоморфологическую картину, делают посев гомогенизированных органов, из внутренних органов готовят мазки-отпечатки;
- для посева также забирают кровь, обнаруженный экссудат и гной;
- после вскрытия труп животного сжигают или кипятят в растворе фенола.

IV. Идентификация выделенной культуры (при необходимости) и выдача заключения.

Приложение 1. Методы окраски микропрепаратов

Метод окраски	Применение и результат	Порядок выполнения	Пример
по Граму	Диагностическое разделение на фиолетовые Грам+ и красные Грам- микроорганизмы	<ul style="list-style-type: none"> • <i>генцианвиолет</i> через фильтровальную бумагу – 1-2 мин; • промывка; • <i>раствор Люголя</i> – 1-2 мин; • <i>этиловый спирт</i> – 30 сек; • промывка; • <i>водный фуксин</i> – 2-3 мин; • промывка и высушивание 	
по Цилю-Нильсену	Диагностическое разделение на рубиново-красные кислотоустойчивые (возбудители туберкулеза, лепры) и сине-голубые некислотоустойчивые бактерии	<ul style="list-style-type: none"> • <i>фуксин Циля</i> над пламенем спиртовки – 3-5 мин; • несколько погружений в стакан с 5% <i>серной кислотой</i>; • промывка; • <i>метиленовый синий</i> – 3-5 мин 	
по Ожешко	Выявление рубиново-красных эндоспор на фоне сине-голубой цитоплазмы	<ul style="list-style-type: none"> • мазок <u>не</u> фиксируют; • <i>соляная кислота</i> над пламенем спиртовки (разрыхление оболочки споры) – 1-2 мин; • промывка и фиксация; • окраска по Цилю-Нильсену 	
по Бурри-Гинсу	Выявление неокрашиваемых капсул вокруг красных бактерий на темно-коричневом фоне (смесь туши и фуксина)	<ul style="list-style-type: none"> • приготовление мазка по методу тонкого мазка крови с каплей <i>китайской туши</i>; • фиксация и высушивание; • <i>водный фуксин</i> – 3-5 мин 	
серебрение по Морозову	Выявление светло-коричневых жгутиков у темно-коричневых бактерий на желтоватом фоне	<ul style="list-style-type: none"> • фиксация ледяной <i>уксусной кислотой</i> – 1 мин; • промывка; • <i>танин</i> – 1 мин; • промывка; • <i>азотнокислый раствор серебра</i> – 1-2 мин 	
по Леффлеру	Выявление синих зерен волютина на фоне светло-голубой цитоплазмы	<p>(простой метод окраски)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>щелочной раствор метиленовой синьки</i> – 3-5 мин 	

по Нейсеру	Выявление черных зерен волютина на фоне желтой цитоплазмы	<ul style="list-style-type: none"> • <i>уксусно-кислая метиленовая синька</i> – 1-2 мин; • промывка; • <i>раствор Люголя</i> – 30 сек; • промывка; • <i>везувин</i> – 1-3 мин; 	
по Романовскому-Гимзе	Исследование простейших, риккетсий, хламидий, спирохет, форменных элементов крови: ацидофильные образования – оттенки красного , базофильные – оттенки синего и фиолетового	<ul style="list-style-type: none"> • окраска в течение 40-120 мин раствором красителя, содержащего: <ul style="list-style-type: none"> - азур; - эозин; - метиленовый синий; - спирт и глицерин (растворители) 	

ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ФИКСИРОВАННОГО МАЗКА

Для приготовления мазка необходимо иметь:

- чистое обезжиренное предметное стекло;
- бактериологическую петлю;
- культуру, выращенную на плотной (агаре) или жидкой (бульоне) питательной среде;
- спиртовку;
- набор красок.

1. Обезжиренное предметное стекло и бактериологическую петлю прожигают в пламени горелки. Пробирку с изучаемой культурой держат между указательным и большим пальцами левой руки. Петлю берут правой рукой, мизинцем правой руки прижимают пробку пробирки к ладони.

Если мазок готовится с жидкой питательной среды, то каплю культуры наносят петлей на предметное стекло.

Если мазок делают из культуры с агара, то петлю с культурой вносят на предметное стекло и добавляют каплю физиологического раствора, в котором эмульгируют внесенный материал.

Петлю обжигают в пламени горелки. Мазок должен быть тонким, равномерно растертым, округлой формы, размером 1,5-2 см.

2. Высушивание мазка – производится при комнатной температуре.

3. Фиксация мазка производится с целью:

- убить микробные клетки;
- обеспечить лучшее прилипание микробов к предметному стеклу;
- облегчить дальнейшее окрашивание.

Фиксация мазка в пламени горелки производится 3-кратно, действие пламени должно длиться 2 секунды. Для более нежной фиксации мазков крови, спирохет и простейших использующих химические фиксаторы:

- метиловый спирт — в течение 5 минут;
- ацетон — в течение 5 минут;
- этиловый спирт (96°) — в течение 10 минут;
- смесь Никифорова (этиловый спирт + серный эфир) — в течение 10 минут;
- пары формалина — в течение нескольких секунд.

4. Окраска препарата.