

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДАГЕСТАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
И ВОПРОСЫ САМОПОДГОТОВКИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ
ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ**

Методические разработки и вопросы самоконтроля для студентов по общей
микробиологии и вирусологии

Составитель: д.б.н. С.М. Омарова

І часть

Махачкала - 2013

Рецензент: проф. М.М.Меджидов

Составители:

Д.б.н., Омарова С.М.

Методические разработки к практическим занятиям и вопросы самоподготовки для студентов по общей микробиологии и вирусологии.

Методические разработки и вопросы для самостоятельной работы и самоконтроля студентов по общей микробиологии и вирусологии.

- Махачкала: ДМСИ, 2013. - 38с. Ч.1

Рекомендовано Учёным советом ДМСИ к применению в учебном процессе.

Протокол № 9 от.27 мая 2013г.

ИНСТРУКЦИЯ

по технике безопасности и производственной санитарии
для студентов, работающих в учебных заведениях.

Проводится работа с инфицированным материалом, чистыми культурами микробов, попадание которых в большой дозе на кожу и слизистые может привести к заражению.

Использование при работе красителей, растворов кислот и щелочей, горящих спиртовок при неаккуратных действиях может привести к порче имущества, одежды, ожогам кожи и слизистых.

В связи с этим основными требованиями к работе в лабораториях являются:
ВНИМАТЕЛЬНОСТЬ, АККУРАТНОСТЬ, ОСТОРОЖНОСТЬ.

1. Перед входом в лабораторию студент должен надеть халат и шапочку, личные вещи убрать в стол. Нельзя ставить на стол сумки, рюкзаки и т.п.
2. **КАТЕГОРИЧЕСКИ ЗАПРЕЩАЕТСЯ:** в лаборатории находиться без спецодежды, принимать пищу, пить и курить. Курение на кафедре повсеместно запрещено.
3. На лабораторном столе студента должен быть минимум необходимых вещей, чтобы они не мешали работе. Студент обязан поддерживать порядок на столе во время работы, аккуратно и экономно обращаться с вверенным ему лабораторным имуществом и материалом.
4. **В случае попадания инфицированного материала или реактивов на руки, халат, стол, необходимо сообщить о случившемся преподавателю.**
5. При работе со спиртовками **КАТЕГОРИЧЕСКИ ЗАПРЕЩАЕТСЯ** перемещать горящие спиртовки или зажигать одну от другой.
6. По окончании работы студент обязан, навести порядок на своем рабочем месте: вылить содержимое лотка в специальное ведро, вымыть лоток от красителей, сдать на стол преподавателя обработанный материал, демонстрационные препараты, протереть от иммерсионного масла объектив микроскопа.
7. Нельзя оставлять препарат на предметном столике микроскопа.
8. После окончания работы необходимо выключить свет на столе и тщательно вымыть руки с мылом.

ТЕМА: Значение микробиологии для врача-стоматолога. Оборудование и правила работы в бактериологической лаборатории. Микроскопический метод исследования. Световая микроскопия. Иммерсионная система микроскопа. Морфология микробов. Техника приготовления бактериологического препарата. Простые методы окраски препаратов.

ЦЕЛЬ: Ознакомить с режимом работы в баклаборатории и иммерсионной системой микроскопа. Изучить морфологию бактерий. Приготовить мазок-препарат из культур бактерий и окрасить его простым методом.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Отличие эукариотов от прокариотов.
2. Кто открыл впервые микроорганизмы?
3. Заслуги работ Л. Пастера, Р. Коха, И.И. Мечникова.
4. Назовите типы современных микроскопов.
5. Какой режим работы в бактериологической лаборатории?
6. Как устроена бактериологическая лаборатория?
7. Какие микроскопы применяют для изучения микробов и принцип их устройства?
8. Какова систематика микробов?
9. Как пользоваться иммерсионной системой микроскопа?
10. От чего зависит разрешающая способность микроскопа?
11. Какие формы имеют бактерии?
12. Назвать шаровидные формы бактерий. Привести примеры.
13. Назвать палочковидные, извитые формы бактерий. Привести примеры.
14. Какие красители применяют в бактериологической практике?
15. Как приготовить препарат из бульонной и агаровой культур?
16. Этапы приготовления бактериального препарата.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Ознакомиться с оборудованием, режимом и с правилами работы в бактериологической лаборатории.
2. Ознакомиться с иммерсионной системой микроскопа.
3. Промикроскопировать готовые препараты из чистых культур стафилококка, стрептококка, гонококка, кишечной палочки, зарисовать в тетради основные формы бактерий.
4. Оформление протокола исследования.
5. Из бульонной культуры стафилококка и стрептококка приготовить мазок, высушить, зафиксировать. Окрасить простым методом. Промикроскопировать, зарисовать.
6. Из агаровой культуры кишечной палочки приготовить мазок. Высушить, зафиксировать, окрасить простым методом. Промикроскопировать, зарисовать.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Техника микроскопирования

В связи с очень малыми размерами бактерий изучение их морфологии возможно только при большом увеличении, достигаемом при помощи иммерсионного масла, которое позволяет создать единую систему между предметным стеклом и особым, х90-кратным (с черной полоской) объективом.

При микроскопировании окрашенных объектов необходимо создать яркое освещение с помощью вогнутого зеркала, поднятого конденсора и полностью открытой диафрагмы.

Каплю иммерсионного масла наносят на готовый препарат на стекле. Затем стекло переносят на столик микроскопа. Иммерсионный объектив погружают в масло

осторожно, под контролем глаза до явного контакта объектива с маслом. Затем объектив поднимают, не выводя из капли масла и глядя в окуляр для нахождения объекта исследования («поля зрения»). Четкое изображение препарата достигается регулировкой сначала макровинтом (для обнаружения объекта), а затем микровинтом для регулировки резкости изображения.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования – мазки-препараты

Цель – изучение иммерсионной микроскопии, знакомство с морфологией бактерий.

№	Исследуемый материал	Результаты исследования	Графическое изображение
1.	Мазок из чистой культуры стафилококка. Окраска	В поле зрения видны шаровидные клетки – коки, синего цвета расположенные в виде «виноградных гроздей».	
2.	Мазок из чистой культуры стрептококка. Окраска		
3.	Мазок из исследуемого материала гонококка. Окраска.....		
4.	Мазок из чистой культуры кишечной палочки. Окраска		

Заключение: Освоена техника иммерсионной микроскопии. Изучены шаровидные и палочковидные формы бактерий.

1. Техника приготовления бактериального препарата

Мазки готовят на обезжиренных предметных стеклах, предварительно обрисовав карандашом место будущего мазка с противоположной стороны предметного стекла. При приготовлении мазка из жидкой питательной среды, материал берут стерильной бактериальной петлей, наносят на стекло и растирают над очерченной площадкой. В случае приготовления мазка из плотной питательной среды, на предметное стекло предварительно наносят каплю воды, и материал растирают, постепенно готовя однородную взвесь.

Бактериальную петлю перед использованием и с оставшейся культурой стерилизуют в пламени горелки. Приготовленный мазок высушивают на воздухе или держа высоко над пламенем спиртовки.

После этого препарат фиксируют, для чего мазок стороной, где нет материала, троекратно проводят через середину пламени горелки.

Фиксация позволяет убить микробы, прикрепить их к стеклу и, наконец, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.

2. Техника простого метода окраски

Окраска бактерий преследует цель сделать их резко отличными от фона, что позволяет изучить под микроскопом их морфологию и структуру. В микробиологии используют простые и сложные методы окраски препаратов.

При ПРОСТОМ МЕТОДЕ окраски, мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным фуксином (1-2 мин.) или метиленовой синью (3-5 мин.), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Занятие № 2

ТЕМА: Структура бактериальной клетки. Особенности структуры эу- и прокариотических клеток. Сложные методы окраски. Окраска по Граму. Окраска кислотоустойчивых бактерий и спор.

ЦЕЛЬ: Освоить сложный метод окраски по Граму. Методы выявления спор. Метод Ожешко. Особенности кислотоустойчивых бактерий и их окраска по методу Циля - Нильсена.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Назовите основные структуры бактериальной клетки.
2. Каково строение и функции клеточной стенки и цитоплазматической мембраны?
3. Химический состав, организация и функция бактериального ядра.
4. Принципиальные отличия простых способов окраски от сложных.
5. Перечислите этапы окраски по Граму, приведите примеры грамположительных и грамотрицательных бактерий. Механизм окраски по Граму.
6. Что такое протопласты, сферопласты, их отличие от микоплазм.
7. Назовите кислотоустойчивые микроорганизмы полости рта и чем обусловлены его свойства?
8. Назовите этапы окраски бактерий по Цилю-Нильсену.
9. Для каких бактерий и почему применяется метод окраски по Цилю-Нильсену?
10. Дайте характеристику спор бактерий (их форма, расположение, ультраструктура, значение).
11. Перечислите стадии спорообразования. Как происходит прорастание спор в вегетативные клетки?
12. Назовите этапы окраски спор по методу Ожешко.
13. При какой температуре погибают споры и где надо стерилизовать споросодержащий материал.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Освоение сложных методов окраски:
 - а) Приготовить мазок из смеси чистых культур стафилококка и кишечной палочки. Окраска по Граму.
 - б) Приготовить мазок из мокроты (БЦЖ). Окраска по Цилю –Нильсену.
 - в) Приготовить мазок из взвеси спорообразующих бактерий (почвенная болтушка). Окраска по Ожешко.
 - г) Промикроскопировать с использованием иммерсионной системы микроскопа.
2. Оформление протокола исследования.
3. Внести в латино-русский словарь все названия микробов к данному занятию.
4. Оформление протокола исследования.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ окраски включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет предварительно дифференцировать микробы и выявить определенные структуры клеток.

Метод окраски по Граму

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком идентификации бактерий. В результате окраски по Граму все бактерии делятся на две группы: грамположительные (фиолетового) и грамотрицательные (красного цвета).

Техника окраски по Граму

1. Фиксированный мазок кладут на бактериологический мостик и покрывают полоской фильтровальной бумаги, пропитанной раствором генцианвиолета; на бумажную полоску наносят воду. Через 2 минуты полоску удаляют.
2. Не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя на 1 минуту. Затем раствор Люголя сливают.
3. Препарат обесцвечивают спиртом 20-30 секунд (до отхождения фиолетовых струек краски).
4. Препарат промывают водой.
5. Окрашивают водным фуксином 2 минуты.
6. Препарат промывают водой.
7. Высушивают фильтровальной бумагой.

Метод окраски по Цилю-Нильсену

Для обнаружения некоторых микробов, богатых липидами (например, возбудителей туберкулеза, лепры и др.), применяют метод окраски по Цилю-Нильсену.

1. Для окрашивания используют концентрированный раствор карболового фуксина Циля. С целью улучшения проникновения красителя в клетку препарат с наложенной на него полоской фильтровальной бумаги и красителем подогревают над пламенем горелки трехкратно до появления пара.
2. Затем препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислоты, предварительно удалив фильтровальную бумагу.
3. Промывают водой.
4. Докрашивают метиленовой синей в течение 3-5 минут
5. Препарат промывают водой.
6. Высушивают фильтровальной бумагой.

Обесцвечивание кислотой приводит к потере красителя кислотоподатливыми микробами, и они окрашиваются в синий цвет. Кислотоустойчивые микробы остаются красными.

Метод окраски по Ожешко

1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор соляной кислоты и подогревают на пламени горелки в течение 2 минут, до появления паров.
2. Препарат промывают водой, высушивают и фиксируют.
3. Фиксированный препарат окрашивают по методу Циля-Нильсена.

Споры бактерий после данной окраски приобретают красный цвет, а тело бактерий – синий.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования – мазки-препараты

Цель – изучение сложных методов окраски по Граму

№	Исследуемый материал	Результаты исследования	Графическое изображение
---	----------------------	-------------------------	-------------------------

1.	Смешанный мазок из чистых культур кишечной палочки и стафилококка. Окраска по	В поле зрения видны	
2.	Мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий. Окраска по	В поле зрения видны	
3.	Мазок из мокроты. Окраска по ...	В поле зрения видны	

Заключение: Изучены сложные методы окраски по

Занятие № 3

ТЕМА: Понятие о стерилизации, дезинфекции, асептике и антисептике. Способы стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды и лечебного инструментария. Особенности стерилизации и предстерилизационной обработки стоматологических инструментов, боров, наконечников турбин и т.п. Бактериологический метод исследования. Физиология бактерий. Культивирование бактерий. Питательные среды. Культивирование аэробов - 1 день исследования.

ЦЕЛЬ: Изучить различные методы стерилизации и дезинфекции. Ознакомиться с различными питательными средами, способами приготовления основных питательных сред, методами и техникой культивирования бактерий.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Требования, предъявляемые к питательным средам.
2. Принципы классификации питательных сред и их применение в микробиологической практике.
3. Как проводят стерилизацию простых питательных сред? Как стерилизуют сахаросодержащие питательные среды?
4. Какие вещества используют для приготовления плотных питательных сред.
5. Какие среды называются элективными? Приведите примеры.
6. Какие известны дифференциально-диагностические среды? Их целевое назначение.
7. Способы и типы питания бактерий.
8. Что такое культура бактерий? Чистая культура бактерий? Почему надо работать с чистой культурой?
8. Способы посева на жидкие и плотные питательные среды.
9. В чем заключается бактериоскопический и бактериологический методы диагностики инфекционных заболеваний?
10. Какие значения рН являются оптимальными для выращивания бактерий на средах?
11. Какой аппарат используют для культивирования бактерий? Оптимальная температура культивирования бактерий.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Ознакомление с различными питательными средами, способами их приготовления. Демонстрация готовых питательных сред (СПБ, СПА, желчный бульон, сахарный агар, щелочной агар, молочно-солевой агар, кровяной агар).
2. Характеристика методов стерилизации (шаблон домашнего задания).
3. Демонстрация мазка, приготовленного из исследуемого материала. Окраска по Граму. Результаты микроскопирования зарисовать.
4. 1-й этап бактериологического метода исследования. Посев исследуемого материала на чашку с СПА с помощью бактериальной петли.
5. Оформление протокола исследования.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Стерилизация – один из важнейших участков работы микробиологической лаборатории, представляет собой полное обеспложивание (обеззараживание) объекта. В микробиологической лаборатории стерилизации подлежат питательные среды, используемые растворы, посуда, инструменты и иной рабочий, а также отработанный заразный материал.

Различают физические, механические и химические и биологические методы стерилизации.

Физические методы основаны на различных способах нагревания (прокаливании в пламени газовой горелки, сухим «жаром» в печи Пастера, текучим паром и паром под давлением в автоклаве), а также на разных видах радиационного воздействия (УФ- и γ -облучение).

К механическим методам относится фильтрование (бактериальные фильтры), *к химическим* – использование дезинфицирующих средств (растворов перекиси водорода, глутарового альдегида и газов – окиси этилена, паров формальдегида в этиловом спирте), а биологический метод стерилизации основан на применении антибиотиков и бактериофагов.

Качество стерилизации в соответствии с нормативными документами постоянно контролируется, для чего используют температурные индикаторы (вещества с известной температурой плавления, изменения окраски) и (или) проводят бактериологическое (вирусологическое) исследование материала, прошедшего стерилизацию. Работа стерилизационных установок и контроль за качеством стерилизации подлежат строгому учету.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ В СТОМАТОЛОГИИ

№	метод	аппарат	режим	надежность и показания	объекты стерилизации
1.	Паром под давлением				
2.	Газовая стерилизация				
3.	Химическая стерилизация				
4.	Ультразвуком				
5.	УФ и гамма-лучами				
6.	Плазмой				

Методы и режимы стерилизации различных материалов

№	Метод стерилизации	аппаратура	Время (мин.)	Температура °С	Материалы
1.	прокаливание	спиртовка, газовая горелка	-	до покраснения	бактериальная петля, препаровальная игла
2.	автоклавирование (паром под давлением)	автоклав	20-30	120° давл. 1 атм.	Питательные среды
3.	текучим паром	Аппарат Коха, автоклав	30-60 3 дня ежедневно	80-100°	Среды с углеводами
4.	Сухим жаром	Печь Пастера	90-60	160-180°	Стеклоянная лабораторная посуда
5.	пастеризация	пастеризатор	60	65-70°	Молоко, вино, пиво, соки
6.	тиндализация		По 1 часу 5 дней	56-58°	Сыворотки, витамины
7.	Фильтрование (механическая)	Фильтры: Зейтца, свеча Шамберлана, свеча Беркефельда	-	-	Сыворотки лекарственные препараты
8.	Уф-лучами	Бактерицидные лампы БУВ-15 БУВ-30	-	-	Воздух в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях, боксах.

Бактериологический метод исследования

1. Из исследуемого материала приготовить мазок, окрасить по Граму. Результаты ориентировочной микроскопии зарисовать в протоколе и на основании микроскопической картины сделать предварительный вывод о наличии микробов в исследуемом материале.

2. Бактериальной петлей провести посев исследуемого материала на плотную питательную среду (чашку с СПА) следующим способом:

Взять пробирку с исследуемым материалом в левую руку. В правой руке находится стерильная петля, которую следует держать как писчее перо. Правым мизинцем прижать пробку к мякоти ладони, вынуть ее из пробирки и держать в руке. Ввести петлю в пробирку, охладить ее о внутреннюю стенку пробирки, взять исследуемый материал петлей и, не дотрагиваясь до стенок пробирки, вынуть бактериальную петлю. Пробирку и край ее провести через огонь, закрыть пробирку и поставить в штатив. Провести посев материала на питательную среду.

При посеве необходимо строго соблюдать определенные правила.

Посев производить только вблизи пламени горелки. **Чашку с агаром раскрыть только тогда, когда материал находится на петле!** Чашка с питательной средой должна лежать на столе крышкой вверх. Кончиками пальцев левой руки нужно взяться за крышку чашки и легким движением опрокинуть чашку, прижав ее указательным и средним пальцами к ладонной мякоти большого пальца. Крышка кладется на стол, а открытая чашка остается в руке. Открытую чашку можно держать вертикально или

слегка наклонно. Во время посева нельзя разговаривать. Петлю с материалом осторожно приложить к поверхности агара вблизи от края чашки, удаляя тем самым излишки взятого материала. Затем петлю приложить к другому участку агара и распределить материал петлей параллельными штрихами на расстоянии 0,5 см в двух взаимоперпендикулярных направлениях в виде сетки.

Посев петлей проводить осторожно, чтобы не повредить поверхность среды. Для этого петля должна быть всегда параллельна плоскости агара. Это достигается наклоном чашки, находящейся в левой руке. По окончании посева чашку кладут в открытую крышку, петлю прокалывают и ставят в штатив. Надписи делают только на дне чашке и посеvy помещают в термостат (37°C) на необходимое для роста бактерий время (чаще всего – на 20-24 часа).

Для культивирования бактерий используют питательные среды. К ним предъявляется ряд требований:

- питательность – среды должны содержать все необходимые для питания бактерий вещества;
- изотоничность – они должны содержать набор солей для поддержания осмотического давления;
- оптимальный pH (для большинства бактерий 7,2 – 7,6);
- прозрачность, чтобы был виден рост бактерий;
- стерильность, чтобы не было других бактерий.

По консистенции питательные среды делятся на: жидкие, плотные и полужидкие.

По составу питательные среды делят на:

- простые: 1% пептонная вода, сухой питательный бульон (СПБ), сухой питательный агар (СПА);
- сложные: сахарный бульон, сывороточный агар, кровяной агар, желчный бульон, желточно-солевой агар);
- синтетические (среды известного состава).

По назначению питательные среды классифицируют на:

- дифференциально-диагностические на которых различные виды бактерий дают различный рост; например, среды эндо, Левина, Плоскирева
- селективные или избирательные среды, на которых одни виды бактерий растут, а другие не растут или их рост подавляется. Например, 10% желчный бульон для сальмонелл брюшного тифа, желточно-солевой агар для стафилококков др.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Универсальные питательные среды	Специальные питательные среды	
	Элективные (селективные) накопительные	Дифференциально-диагностические

ПРОТОКОЛ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования – взвесь микроорганизмов (х-смесь)

Цель – выделение чистой культуры бактерий из исследуемого материала

день	Ход исследования	Результаты исследования
1.		
2.	Пересев на скошенный агар (СПА)	

3.	Проверка чистоты выделенной культуры. Приготовление мазка и окраска по Граму.	
4.	Идентификация культуры по биохимическим свойствам. Посев выделенной культуры на МТС (микротестсистемы).	
5.	Учет биохимических свойств.	

Заключение:

Занятие № 4

ТЕМА: Питание, рост и размножение микробов. Техника посевов материала на питательные среды. Культивирование аэробов - 2 день исследования.

ЦЕЛЬ: Изучить способы питания, рост и размножение бактерий, их культуральные свойства, общие принципы идентификации чистых культур аэробных бактерий.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Что такое культуральные свойства микробов?
2. Что такое «культура», «колония», «штамм».
3. Как изучаются культуральные свойства бактерий на плотной и жидкой средах.
4. Что такое «чистая культура»?
5. Как вы понимаете термины: «рост» и «размножение» бактерий.
6. Зарисуйте и укажите фазы бактерий на жидкой питательной среде.
7. Что такое ростовые факторы бактерий.
8. Какие свойства бактерий изучаются при бактериологическом исследовании для установления вида микробов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Просмотреть чашки с посевами предыдущего занятия. Изучить культуральные признаки (описать выросшие колонии, пользуясь руководством для лабораторных занятий). Сделать запись в протоколе.

2. Из разных колоний приготовить мазки, окрасить по Граму, промикроскопировать. Результат зафиксировать в протоколе.
3. Произвести посев изученных колоний в пробирки со скошенным агаром для выделения (накопления) чистых культур.
4. Заполнить протокол - второй день бактериологического исследования.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Второй день работы включает изучение колоний, выросших на чашке с СПА, и пересев намеченных колоний на скошенный агар для получения чистых аэробных культур.

На столе у студента имеется чашка с СПА с выросшими на поверхности агара колониями. Изолированные колонии, отличающиеся по внешнему виду, отмечают стеклоглафом на наружной поверхности стекла чашки, нумеруют: 1,2,3 и т.д.

Каждую отмеченную колонию охарактеризовывают макроскопически: форма, цвет, характер краев, поверхности, прозрачность, размер. Заносят характеристики разных колоний в протокол.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЙ КОЛОНИЙ

1. Размер колоний _____
 2. Форма колоний _____
 3. Поверхность колоний _____
 4. Края колоний _____
 5. Прозрачность колоний _____
 6. Пигмент _____
 7. Консистенция _____
2. Из колоний грамтрицательных палочек сделать отсев на скошенный агар для получения чистой культуры.

Для этого надо прокалить бактериальную петлю и подождать, пока она остынет (10-15 сек.). Кончиком петли едва коснуться отмеченной колонии, не захватывая агар. После этого взять в левую руку пробирку со скошенным агаром так, чтобы поверхность скошенного агара была перед глазами. Открывать пробирку нужно так, чтобы пробка осталась в правой руке, прижатой мизинцем к ладони. **Нельзя класть пробку на стол!** Петлю с материалом внести в пробирку не касаясь внутренних стенок, до дна пробирки, где находится большее количество конденсационной жидкости. Поверхностью петли прикоснуться к поверхности агара и сделать посев штрихом, продвигаясь снизу вверх.

Обжечь на пламени края пробирки и пробку, закрыть пробирку, поставить ее в штатив. Бактериальную петлю прокалить и также поставить в штатив. Пробирку поместить в термостат при 37°C.

ТЕМА: Ферменты и пигменты бактерий. Способы выделения и идентификации чистых культур аэробных бактерий – 3-4 день исследования. Изучение ферментативной активности, факторов вирулентности и чувствительности к антибиотикам выделенных культур.

ЦЕЛЬ: Изучить ферментативные свойства, факторы вирулентности и чувствительность к антибиотикам выделенной культуры.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Что такое экзоферменты бактерий? Укажите их роль в жизнедеятельности бактериальной клетки. Приведите пример.
2. Что такое конститутивные и индуктивные ферменты? Когда происходит синтез индуктивных ферментов?
3. Перечислите ферменты бактерий, имеющие значение для их идентификации и дифференциации.
4. Опишите и объясните способ изучения сахаролитических ферментов на МТС-5У, средах Гисса.
5. Укажите способы изучения протеолитических ферментов микроорганизмов.
6. Какое значение для микробов имеет пигментообразование.
7. Перечислите факторы роста и укажите их роль в метаболических процессах бактериальной клетки.
8. Что собой представляет микротестсистемы? С какой целью их используют в бактериологии?
9. Что такое патогенность и вирулентность? Единицы измерения вирулентности.
10. Факторы патогенности (вирулентности) бактерий,
11. Назовите методы повышения и понижения вирулентности микробов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Изучить характер роста на скошенном СПА.
2. Определить чистоту культуры, приготовить мазки, окрасить по Граму, промикроскопировать.
3. Определить протеолитические ферменты:
 - а) произвести посев культуры уколом в столбик желатины, зарисовать в тетрадь различные формы размножения желатины;
 - б) произвести посев выделенной культуры в СПБ с индикаторными бумажками (определение наличия сероводорода и индола).
4. Определить сахаролитические свойства культуры:
 - а) произвести посев на среды Гисса, микротестсистему-5У (МТС-5У);
 - б) зарегистрировать результаты посева на «пестром» ряду;
 - в) результаты записать в протокол.
5. Дать заключение по проведенному бактериологическому исследованию (заполнить протокол).

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Термин «чистая культура» подразумевает, что на питательной среде растет микроб одного вида. Проверка этого положения достигается двумя путями. Макроскопически оценивается однородность роста культуры на скошенном агаре. Более надежной является микроскопическая оценка. Для этого из разных мест выросшей на агаре культуры берут материал, готовят мазок (или мазки) и окрашивают по Граму. Если в полях зрения однородные по форме, расположению и окраске клетки, то это дает основание для заключения, что выделена «чистая культура».

2. Если выделенная культура «чистая», то можно приступить к ее идентификации, т.е. установлению биологического вида микроба.

Установление вида микроба может складываться из различного рода признаков: микроскопических - особенности формы, окраски и расположения клеток в мазке; макроскопических – форма, цвет и другие черты колоний на плотной среде. Наиболее основательными являются биохимические признаки идентификации, характеризующие набор ферментов у данной культуры. Этот признак является наиболее стабильной и индивидуальной характеристикой микроба. Наличие ферментов у микроба чаще всего определяют путем посева «чистой культуры» на среды «пестрого ряда» или микротестсистемы (МТС), в каждой ячейке которого содержится только один углевод. Протеолитические ферменты также определяются путем посева культуры в соответствующие ячейки МТС, где определяют образование индола, аммиака и сероводорода.

Комплекс выявленных свойств микроба позволяет, чаще всего, установить его вид.

Занятие № 6

ТЕМА: Дыхание бактерий. Особенности транспортировки материала и выделения чистых культур анаэробных бактерий. Культуральные и патогенные свойства грибов.

ЦЕЛЬ: Изучить способы выделения чистой культуры анаэробных бактерий.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Приведите классификацию бактерий по типу дыхания.
2. Объясните, почему кислород губителен для анаэробов.
1. Перечислите методы создания анаэробных условий, необходимых для выращивания анаэробных бактерий.
2. Назовите питательные среды, применяемые для культивирования анаэробов.
3. Какие специальные методы посева используют для выделения чистой культуры анаэробов.
4. Укажите принципы идентификации, выделенной культуры анаэробов.
3. Характеристика неспорогенных (бактероидов) анаэробов.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Бактериологическое исследование почвы с целью выделения анаэробов. Произвести посев почвы на среды Китта-Тароци, Вильсона-Блера. Поместить в термостат.
2. Учет посева предыдущего дня. Приготовить мазок, окрасить по Граму, промикроскопировать. Зарисовать.
3. Произвести посев по способу Вейнберга-Перетца. Поместить в термостат при температуре 37°C на 24 часа.
4. Изучить морфологию выросших колоний на среде Вильсон-Блера.
5. Заполнить протокол выделения чистой культуры анаэробов. Дать заключение.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Питательные среды для культивирования анаэробов:

- Среда Китта-Тароци
- Среда Вильсон-Блера
- Сахарный агар
- Молоко по Тукаеву

Методы создания анаэробных условий:

- Физический - механическое удаление O_2 воздуха с помощью аппарата – анаэростата, замена O_2 индифферентным газом – водородом;
- Химический - поглощение O_2 (использование щелочного раствора пиригалола с содой)
- Биологический метод Фортнера (одновременное выращивание аэробов и анаэробов)

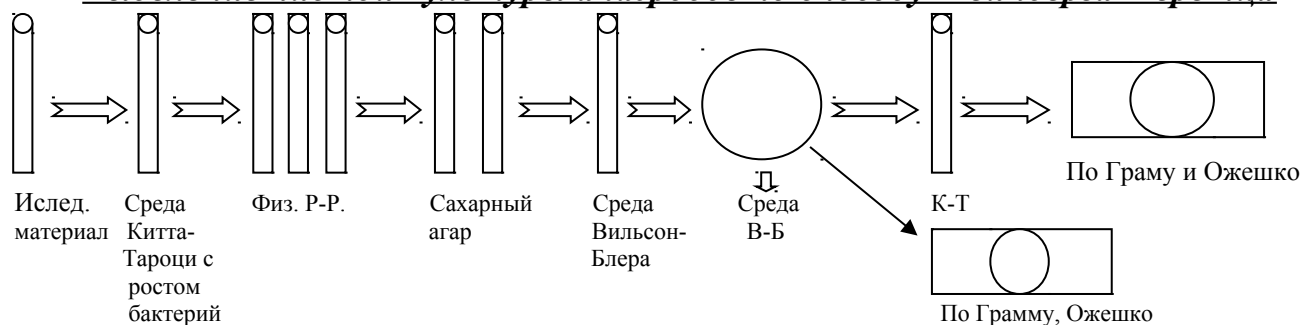
Методы выделения чистой культуры анаэробов

- Метод Вейнберга-Перетца
- Метод Цейслера
- Метод Вейнберга

Отличия анаэробов от аэробов

- У анаэробов нет системы цитохромов
- У анаэробов нет флавиновых ферментов
- У анаэробов нет фермента каталазы

Выделение чистой культуры анаэробов по способу Вейнберга-Перетца



ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования – «почвенная болтушка»

Цель – выделение чистой культуры анаэробов по методу Вейнберга-Перетца

день	Ход исследования	Результаты исследования	Графическое изображение
1.	«Почвенную болтушку» посеять на среды Китта-Тароци, Вильсон-Блера и молоко по Тукаеву. Посевы поместить в термостат на 24 часа при $t = 37^{\circ}$.		
2.	Учет роста на средах.		

3.			
4.			

Заключение:

Итоговое занятие по темам: «Морфология и физиология микроорганизмов»

Занятие № 7

ТЕМА: Симбиоз и антибиоз. Микрофлора воздуха, воды, почвы. Нормальная микрофлора тела человека. Микрофлора полости рта.

ЦЕЛЬ: Изучить санитарно-бактериологические методы исследования воды, воздуха, почвы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Укажите микрофлору воздуха, воды, почвы.
1. Какие микробы являются санитарно-показательными для воздуха.
2. Какой микроб является санитарно-показательным для воды? Почему?
3. Назовите методы санитарно-бактериологического исследования воды.
4. Укажите, что такое микробное число воды, коли-титр, коли-индекс воды.
5. Какие микроорганизмы относятся к типичным почвенным бактериям.
6. Какие спорообразующие бактерии длительно (десятилетиями) сохраняются в почве?
7. Какая наука изучает взаимоотношение микроорганизмов со средой их обитания?
8. Назовите микроорганизмы, характерные для нормальной микрофлоры человека.
9. Основные представители резидентной микрофлоры полости рта, их свойства.
10. Что такое дисбиоз?
11. Какое значение имеет нормальная микрофлора для макроорганизма?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Определить количество микробов в 1 куб.м. воздуха учебной комнаты, произвести посев воздуха на чашку с МПА и кровяным агаром по методу Коха и с помощью аппарата Кротова (1 день исследования).
2. Определить микробное число воды. Произвести посев 1 мл водопроводной воды в чашку Петри с расплавленным агаром. Поместить в термостат при температуре 37 °С на 24

ч.

3. Произвести посев водопроводной воды для определения коли-титра и коли-индекса методом мембранных фильтров. Посевы поместить в термостат при температуре 37 °С на 24 ч. (1 день исследования).

3. Заполнить протоколы исследования.

4. Подсчитать микробное число воздуха. Дать заключение о чистоте воздуха по микробному числу и по содержанию санитарно-показательных микробов.

6. Дать заключение по санитарно-бактериологическому состоянию водопроводной воды (2 день исследования).

7. Заполнить протоколы бактериологического исследования воздуха и воды.

8. Произвести бактериологическое исследование микрофлоры пальцев рук методом отпечатков на СПА и на среде Эндо.

9. Приготовить препарат-мазок из зубного налета, окрасить, промикроскопировать и зарисовать в тетрадь.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Загрязненность воды микробами контролируют по 4 основным показателям:

- Микробное число воды
- Коли-титр и коли-индекс
- Обнаружение патогенных бактерий кишечной флоры
- Количество термофилов в почве

Коли-титр определяется тем количеством воды или твердого вещества, в котором содержится одна кишечная палочка.

Коли-индекс количество особей кишечной палочки, которое содержится в 1 л воды или в одном кг твердого вещества.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят путем определения ее фекального загрязнения по коли-титру, титру-энтерококка и перфрингенс-титру. Одновременно определяют микробное число почвы.

Микрофлора воздуха: определение микробного числа воздуха и наличие патогенных стафилококков.

Санитарно – показательными микроорганизмами почвы являются - E. coli, Cl. perphringens.

Санитарно – показательными микроорганизмами воды являются - E. coli которая обладает большой устойчивостью во внешней среде.

Санитарно – показательными микроорганизмами воздуха являются гемолитический стрептококк, гемолитический стафилококк.

Седиментационный метод

Формула Омелянского для определения микробного числа воздуха по методу Коха:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times 5}{V \times 10 \times t}$$

X – количество микробов 1 м³ воздуха

A – количество колоний в чашке

V – площадь чашки Петри (Пг²)

t – время, в течение которого чашка была открыта

5 – время по расчету Омелянского

10 – объем воздуха в литрах, из которого происходит оседание микробов за 5 минут

100 – площадь в см², на которую происходило оседание

1000 – искомый объем воздуха в литрах

Аспирационный метод (аппарат Кротова)

Метод Кротова является более точным количественным методом определения микробного числа воздуха помощью специального прибора.

Расчет микробного числа производят по формуле:

$$X = \frac{A \times 1000}{V}$$

A – количество микробных колоний, выросших на чашке Петри

V – объем пропущенного через прибор воздуха в литрах

1000 – искомый объем воздуха

Биоценоз - Совокупность популяций разных видов, связанных единой средой обитания (биотопом). Микробиоценоз (синоним – микробиоциноз) – совокупность разных видов микробов, обитающих в одном биотопе, например ротовой полости.

Гнотобиология - новая отрасль биологии, изучающая безмикробную жизнь макроорганизмов. Выращенные в специальных камерах путем вскармливания стерильной пищей безмикробные цыплята, крысы, мыши, морские свинки, поросята и другие животные.

НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

<i>Биотоп</i>	<i>Микрофлора</i>
<i>Кожа</i>	
<i>Слизистые оболочки глаз</i>	
<i>Полость рта</i>	
<i>Дыхательные пути</i>	
<i>Желудок</i>	
<i>Кишечник</i>	

Резидентная микрофлора полости рта

Аэробы, факультативные анаэробы	Облигатные анаэробы
Грамположительные	грамположительные
1.	1.
2.	2.
3.	3.
4.	4.
5.	5.
Грамотрицательные	граммотрицательные
1.	1.
2.	2.
3.	3.
4.	4.
5.	5.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования – микрофлора пальцев рук, слизь из носоглотки, зубной налет

Цель – определение нормальной микрофлоры организма человека

день	Ход исследования	Результаты исследования	Графическое изображение
1.			
2.			
3.			
4.			

5.			
----	--	--	--

Заключение:

Занятие № 8

ТЕМА: Понятие о строение вирусов, вирионов и прионов. Методы культивирования вирусов. Бактериофаг. Строение и репродукция бактериофагов. Их медицинское значение.

ЦЕЛЬ: Изучить методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Изучить методы определения фаголизательности микробов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Какие методы используются для культивирования вирусов.
2. Как заражают новорожденных мышей?
3. Что собой представляют тельца Бабеша -Негри и какими методами их окрашивают?
4. Что такое культура ткани?
5. Ткани каких органов используются для получения культур клеток?
6. Какие среды и солевые растворы применяют для выращивания и обработки культур ткани?
7. Какого возраста эмбрионы используются для заражения?
8. Зачем делают пересев клеток при поддержании штамма культуры клеток в лабораторных условиях.
9. Какого возраста эмбрионы используются для заражения?
10. Как определяют место расположения при овоскопии?
11. Как обрабатывается эмбрион перед заражением?
12. Какие существуют методы заражения куриного эмбриона?
13. Как обнаруживают наличия вируса в культуре клеток?
14. С какой целью может быть использован метод цветных проб?
15. Как ставят реакцию гемадсорбции? Как выглядит положительная реакция гемадсорбции?
16. Что собой представляет метод бляшек?
17. Как обнаруживают вирус в курином эмбрионе?
18. Как вскрывают зараженный эмбрион?
19. Как обнаруживают вирус гриппа в курином эмбрионе?
20. Как вскрывают зараженный эмбрион?
21. Почему происходит реакция агглютинации эритроцитов в присутствии вируса гриппа? Каков механизм этой реакции?
22. Что такое реакция торможения (нейтрализация) гемагглютинации? Для чего она используется?
23. Как обнаруживают изменения в хорионаллантоисной оболочке, вызванные вирусом?
24. Структура, типы бактериофага
25. Фаги вирулентные, умеренные (профаги), дефектные
26. Что такое лизогения, лизогенная (фаговая) конверсия?
27. Практическое применение бактериофага в медицине. Что такое фаголизательность, фаготипирование, титр фага?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Определить чувствительность культуры стафилококка к специфическому бактериофагу, (демонстрация опыта). Демонстрационную чашку зарисовать в тетради.
2. Определение титра бактериофага (демонстрация).
3. Записать методику заражения куриного эмбриона.
4. Перечислить ингредиенты для постановки РГА.
5. Перечислить ингредиенты для постановки РТГА.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Методы лабораторных исследований при вирусных заболеваниях:

1. Вирусоскопический: микроскопия мазков с внутриклеточными включениями (Тельца Бабеша - Негри, Морозова – Пашена, Гварниери, мазок - отпечаток со слизистой носа, РИФ).
2. Вирусологический:
 - а) выделение вирусов из инфекционного материала (культура клеток, куриный эмбрион, животные);
 - б) определение вируса в материале (ЦПД, реакция гемагглютинации, гемадсорбции);
 - в) идентификация выделенного вируса (РСК, преципитация, РИФ, РТГА, РГА, цветная проба, реакция нейтрализации вируса и др.);
 - г) учет РГА, РТГА, определение титра взвеси вируса (антигена) на культуре клеток (цветная проба).
3. Биологический: методы заражения животных, определение вирусного инфицирования. Реакция нейтрализации вируса на животных.
4. Серологический:
 - а) реакции иммунитета, РТГА, РН, РСК, РИФ, ИФА, РНГА, преципитации, задержки ЦПД и др.
 - б) учет реакции нейтрализации для обнаружения титра антител (цветная проба, РН).

Занятие № 9

ТЕМА: Генетика бактерий. Молекулярно-генетический метод диагностики. Наследственность и изменчивость у бактерий. Основные формы изменчивости. Мутации и модификации. Полимеразная цепная реакция и ее применение.

ЦЕЛЬ: Изучить основные формы изменчивости бактерий-модификации, мутации. Изучить формы генетических рекомбинаций - трансдукция, трансформация, конъюгация.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Дайте определение понятиям «генотип» и «фенотип».
2. Фенотипическая и генотипическая изменчивость. Модификации, мутации.
3. Что такое гетероморфизм, диссоциация признака, R- и S-форма колоний
4. Какие мутации называются спонтанными и индуцированными, что такое мутагены.
5. Мутации генные, хромосомные, точковые, прямые, обратные, нейтральные и летальные.
6. Что такое «оперон», структура оперона?
7. Что такое генетические рекомбинации, какие формы генетических рекомбинаций известны у бактерий?
8. Объясните, что такое трансформация, трансдукция, конъюгация?
9. Какие клетки называют F-клетками и Hfr- клетками?
10. Что такое плазмиды (эписомы) бактерий. Назовите плазмиды, которые изучены в настоящее время.

ТЕМА: Инфекция. Инфекционный процесс. Резидентная и патогенная микрофлора. Синергизм и антагонизм у микробов. Антибиотики, механизм действия и методы определения чувствительности к антибиотикам.

ЦЕЛЬ: Определить вирулентность культуры стафилококка на белых мышях

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Дайте определение понятиям: «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь».
2. Перечислите стадии инфекционного заболевания.
3. Дайте определение понятиям: реинфекция, суперинфекция, рецидив, первичная и вторичная инфекция, бактериемия, сепсис, токсинемия, септикопиемия.
4. Назовите пути распространения и локализации патогенных микробов в организме.
5. Микробиологические методы обнаружения микробов в организме человека.
6. Антагонизм среди микробов. Что такое антибиотики, бактериоцины, фитонциды?
7. Приведите классификацию антибиотиков по их происхождению, химическому составу, механизму («мишени») действия.
8. Классификация антибиотиков по спектру действия. Как определяют спектр действия антибиотика?
9. Назовите методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Что такое «антибиотикограмма»?
10. Механизмы возникновения резистентности микробов к антибиотикам.
11. Что такое фитонциды, кто их открыл?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Приготовить взвесь *Staphylococcus aureus* штамм 209, содержащей 50, 100, 200 млн. микробных клеток в 1 мл.
2. Заразить белых мышей путем:
 - внутрибрюшного введения культуры стафилококка, содержащей 50, 100, 200 млн. микробных клеток в 1 мл
 - учет _____ определения _____ вирулентности.
3. Вскрытие трупа белой мыши:
 - произвести вскрытие трупа белой мыши;
 - произвести посев крови из сердца на сахарный бульон;
 - приготовить мазки-отпечатки из печени, селезенки и почек;
 - мазки-отпечатки зафиксировать смесью Никифорова и окрасить по Граму.
4. Составить протокол вскрытия зараженной белой мыши.
5. По демонстрационному материалу изучить ферменты патогенности (гемолиз на кровяном агаре, лецитиназную активность на желточно-солевом агаре, плазмокоагулазную активность).
6. Методом бумажных дисков определить чувствительность к антибиотикам культуры, выделенной из зева.
7. Освоить методы определения чувствительности культуры *E.coli* к антибиотикам методом серийных разведений.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Инфекция – от лат. «infectio» заражение. Состояние зараженности макроорганизма, в котором происходят совокупные, биологические и физико-химические процессы в ответ на внедрение патогенных микробов.

Инфекционный процесс – это сложное явление связано с взаимоотношениями между патогенным микробом и макроорганизмом. *Инфекционный процесс* – это совокупность

биологических процессов, которые происходят в восприимчивом макроорганизме в ответ на проникновение патогенных микроорганизмов.

Инфекционная болезнь – особая форма проявления инфекционного процесса, который характеризуется определенным симптомокомплексом, отличающим эту болезнь от других.

Патогенность – это потенциальная способность микробов вызывать инфекционный процесс.

Вирулентность – мера, степень патогенности, связанная с индивидуальным свойством штамма, которое меняется в различных условиях среды.

Учет результатов определения чувствительности выделенных из исследуемого материала микроорганизмов к антибиотикам проводится следующим способом: на рабочем столе находится чашка Петри, на которой был высеян выделенный из исследуемого материала микроб и были нанесены на равном расстоянии друг от друга диски с антибиотиками (методика этой работы изложена в практическом руководстве).

Студенту необходимо сделать вывод о степени чувствительности выделенной культуры к антибиотикам. Смысл данного исследования сводится к следующему: поверхность питательной среды на чашке смачивают взвесью выделенной чистой культуры в физ. растворе и таким образом достигается равномерное распределение культуры по всей чашке. «Поверх» посева накладываются диски с антибиотиками и чашки инкубируют в термостате. С дисков, пропитанных каждый отдельным антибиотиком, происходит диффузия антибиотиков в толщу агара. Чем чувствительнее культура к антибиотику, тем меньше его эффективные концентрации и тем больше диаметр зоны задержки роста культуры вокруг определенного диска. При этом результат учитывается по следующей схеме:

Культура чувствительна	диаметр зоны угнетения роста бактерий 25 и более мм
Культура с промежуточной чувствительностью	диаметр зоны угнетения роста бактерий не менее 20 мм
Культура резистентна (устойчива)	Зона угнетения роста отсутствует

Занятие № 11

ТЕМА: Иммуитет. Неспецифические факторы защиты. Фагоцитоз, система комплемента, лизоцим и т.д. Гуморальные факторы неспецифической защиты.

ЦЕЛЬ: Ознакомиться с видами и формами иммунитета. Изучить методы определения неспецифических факторов защиты и фагоцитоза.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Дайте определение понятию «иммуитет».
2. Какие известны виды иммуитета?
3. Перечислите факторы неспецифической резистентности. Какие существуют гуморальные факторы неспецифического иммуитета?
5. Что такое лизоцим?
6. Перечислите неспецифические защитные факторы полости рта.
7. Какие клетки обладают фагоцитарной способностью?
8. Из каких фаз состоит фагоцитарный процесс?
9. Что такое незавершенный фагоцитоз?
10. Как определяют фагоцитарный показатель, опсоно-фагоцитарный индекс?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Определить фагоцитарное число и фагоцитарный показатель в опыте *in vitro*.

2. Изучить незавершенный фагоцитоз гонококков по готовому препарату, приготовленного из гнойного отделяемого больного гонореей.
3. Определить титр лизоцима в слюне по демонстративному материалу.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Иммунитет – совокупность процессов и механизмов, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма от заразного начала и других чужеродных агентов.

Виды иммунитета – *видовой и приобретенный*. Приобретенный делится на искусственный и естественный. Каждый из них на активный и пассивный.

Фагоцитоз – является одним из основных мощных факторов, обеспечивающих резистентность организма, защиту от чужеродных и инородных веществ, в том числе микробов.

НЕЗАВЕРШЕННЫЙ ФАГОЦИТОЗ (рисунок)

Занятие № 12

ТЕМА: Антигены. Антитела. Серологические методы диагностики инфекционных болезней. Серологические реакции: агглютинация, преципитация, лизис, гемолиз и связывания комплемента. Иммунофлюоресцентный, иммуноферментный и радиоиммунный анализ в диагностике инфекционных болезней.

ЦЕЛЬ: Изучить серологические методы диагностики инфекционных заболеваний. Изучить различные методы постановки реакции агглютинации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Дайте определение понятиям «антиген» и «антитело».
2. Каковы основные свойства антигена?
3. Что такое гаптен и его отличие от полноценного антигена?
4. Что такое детерминантная группа и валентность антигена?
5. Гетероантигены, изоантигены, аутоантигены.
6. Какие известны виды микробных антигенов?
7. Химическая природа антител. Классы иммуноглобулинов и их характеристика.
8. Как получают иммунные диагностические сыворотки?
9. Какие ингредиенты участвуют в реакции агглютинации?
10. Для чего нужен контроль при постановке реакции агглютинации?
11. Практическое применение реакции агглютинации и других иммунных реакций
12. Отличие реакции преципитации от реакции агглютинации?
13. Методы постановки реакции преципитации.
14. Применение реакции преципитации в медицине.
15. Реакция Асколи. Почему эта реакция называется реакцией термокольцепреципитации?
16. Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини, практическое применение.
17. Каковы ингредиенты (компоненты) реакции нейтрализации токсина?
18. Анатоксин, свойства, получение, применение.
19. Получение и применение антитоксических сывороток.
20. Реакция Шика, реакция Дика, практическое применение.
21. Какие ингредиенты участвуют в реакциях лизиса (бактериолиз, гемолиз, лейколизис).
22. Феномен Исаева-Пфелфера.
23. Какие ингредиенты участвуют в РСК.
24. Какими компонентами представлена гемолитическая (индикаторная) система?
22. Если конечным результатом РСК является гемолиз в опытной пробирке – реакция

положительная или отрицательная?

25. Практическое применение РСК.

26. РИФ, ее варианты, прямой и непрямой методы.

27. Практическое применение РИФ.

28. Иммуноферментный метод, сущность, практическое применение.

29. Радиоиммунный метод (РИМ), практическое применение.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации на стекле для определения вида микроба.

2. Составить схему постановки развернутой реакции агглютинации.

3. Поставить развернутую реакцию агглютинации. Пробирки поместить в термостат на 2 часа (1 этап).

4. Составить схему и поставить реакцию кольцепреципитации (на примере реакции Асколи).

5. Изучить реакцию преципитации в геле (определение токсигенности дифтерийной культуры), зарисовать.

6. Составить схему реакции флоккуляции.

7. Учет результатов реакции флоккуляции, поставленной с целью титрования антитоксической сыворотки.

8. Поставить реакцию гемолиза.

9. Составить схему реакции бактериолиза «in vitro».

10. Поставить основной опыт РСК.

11. Учесть результаты готовых реакций гемолиза и РСК.

12. Составить схему иммуноферментного метода.

13. Поставить прямой метод РИФ для индикации возбудителя (демонстрация).

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Антиген – вещество, индуцирующее состояние чувствительности и/или резистентности к инфекциям или токсинам при контакте с иммунной системой после латентного периода; несет признаки генетически чужеродной информации и вызывает в организме развитие специфических иммунологических реакций – иммуноген.

Антитело – представляет собой иммуноглобулины, образующиеся в организме человека и животных, как ответная реакция на введение антигенов и выполняющие защитную функцию.

Классы иммуноглобулинов -

Ig A

Ig G

Ig M

Ig D

Ig E

Реакция агглютинации

По технике постановки существуют 2 основных метода проведения реакции:

- Ориентировочная – реакция агглютинации на стекле
- Развернутая - в пробирках

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОРИЕНТИРОВОЧНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ НА СТЕКЛЕ

Реакция преципитации – существует несколько методов постановки.

В практической медицине реакция кольцепреципитации применяется для обнаружения антигена. Реакция основана на том, что при наслаивании прозрачного экстракта, содержащего антиген (преципитиноген) на иммунную сыворотку (антитела – преципитины) на границе обеих жидкостей образуется преципитат – диск в виде кольца (в пробирке).

Реакция преципитации в геле позволяет определить токсигенность дифтерийной палочки.

Реакция связывания комплемента – применяется для обнаружения комплементсвязывающих антител в сыворотке крови при инфекционных заболеваниях (сифилис, гонорея, токсоплазмоз, вирусные инфекции и т.д.).

Реакция бактериолизиса используется для определения специфических бактериолизин в сыворотках больных (при холере, брюшном тифе, спирохетозных инфекциях).

Реакция иммунофлюоресценции – метод основан на способности некоторых флюорохромов (изотиоцианат флюоресцеина, родамин, акридиновый желтый и др.) вступать в химическую связь с сывороточными белками без нарушения их иммунологической специфичности. Существуют прямой и непрямой варианты РИФ.

Радиоиммунный метод – применяется как для выявления антигена, так и для выявления антител. Антигены, либо антитела, мечены радиоизотопом. РИМ используется для диагностики вирусного гепатита, ротавирусной и других вирусных и бактериальных инфекций

Иммуноферментный метод - дает возможность определить антигены или антитела, меченные ферментом (пероксидаза, щелочная фосфатаза и др.)

Используется метод для диагностики бактериальных и вирусных инфекций (вирусные гепатиты, ВИЧ).

Занятие № 13

ТЕМА: Микробиологическая диагностика бактериальных инфекций. Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций (бактериологический метод)

ЦЕЛЬ: Методы микробиологической диагностики стафилококковых инфекций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Перечислите патогенные и условно-патогенные кокки. Почему их называют пиогенными кокками?
2. Какие заболевания вызывают стафилококки? Какой материал берут на исследование при различных стафилококковых инфекциях?
3. Чем отличается морфология стафилококков, выращенных на плотных и жидких питательных средах?
4. Классификация стафилококков?
5. Перечислите факторы патогенности стафилококков.
6. С какой целью производят фаготипирование стафилококков?
7. Какие микробиологические методы используют для диагностики заболеваний, вызываемых стафилококками?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Зарисовать и разобрать схему бактериологической диагностики стафилококковых и стрептококковых инфекций.
2. Бактериологическое исследование гнойного отделяемого больного. Диагноз - фурункулез. 1 день исследования:

- а) приготовить мазок из исследуемого материала, окрасить его по Граму, промикроскопировать, зарисовать;
- б) произвести посев гноя на кровяной агар, желточно-солевой агар, сахарный бульон;
- в) определить чувствительность микрофлоры к антибиотикам.

ЗАДАЧИ

1. В клинику поступил больной с множественными фурункулами. Что будет служить материалом для лабораторного исследования? Напишите направление в лабораторию на бактериологическое исследование.
2. У больных хирургического отделения больницы после операции стали отмечаться осложнения в виде различных нагноительных процессов. При бактериологическом исследовании из гнойного содержимого выделяется стафилококк коагулазопозитивный, т.е. предполагается внутрибольничная стафилококковая инфекция. Что делать? Как выявить бактерионосителей? Как типировать стафилококки с эпидемиологической целью?
3. Больной страдает хроническим, рецидивирующим фурункулезом. Какие специфические препараты вы ему назначите? Целесообразно ли применение аутовакцины? Если да, то как ее приготовить?
4. Больному поставлен диагноз: сепсис. Откуда и в каком количестве возьмете кровь для выделения гемокультуры? На какие среды произведете посев крови?

Дифференциация видов стафилококков.

Признак	St. aureus	St. epidermidis	St. saprophyticus
1.Плазмокоагулаза	+	-	-
2.Лецитовителиза	+	-	-
3.Анаэробная ферментация			
а) глюкоза	+	+	+
б) маннит	+	-	-
4.Аэробное окисление			
а) маннит	+	-	+/-
б) трегалоза	+	-	+
в) манноза	+	+	-
г) галактоза	+	+	-
5.Устойчивость к новобиоцину	-	-	+

ПРОТОКОЛ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ КОККОВОЙ ФЛОРЫ

Материал исследования – гной

Цель – выделение чистой культуры и ее идентификация, антибиотикограмма.

День	Ход исследования	Результаты исследования

1.		
2.		
3.		
4.		
5		

Заключение:

Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций

Занятие № 14

ТЕМА: Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций. Роль стрептококков в развитии заболеваний полости рта (бактериологический метод)

ЦЕЛЬ: диагностики стрептококковых инфекций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Какова морфология стрептококков?
2. Классификация стрептококков по характеру роста на кровяном агаре?
3. Какие существуют серологические классификации стрептококков? Как производят определение групп и типов стрептококков?
4. Какие заболевания вызывают стрептококки? Отметьте роль гемолитического стрептококка в возникновении скарлатины, рожи, ревматизма.
5. Какое значение имеет определение титров анти-О-стрептолизина и антигиалуронидазы?
6. Каковы отличительные признаки энтерококков?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Зарисовать и разобрать схему бактериологической диагностики стафилококковых и стрептококковых инфекций.
2. Бактериологическое исследование гнойного отделяемого больного. Диагноз - фурункулез. 1 день исследования:
 - а) приготовить мазок из исследуемого материала, окрасить его по Граму, промикроскопировать, зарисовать;
 - б) произвести посев гноя на кровяной агар, желточно-солевой агар, сахарный бульон;
 - в) определить чувствительность микрофлоры к антибиотикам.

ЗАДАЧИ

1. В клинику поступил больной ревматизмом. Какой серологический метод Вы будете рекомендовать для подтверждения этого диагноза?
2. Реакция Дика у ребенка отрицательная. О чем свидетельствует такой результат?

Занятие № 15

ТЕМА: Микробиологическая диагностика менингококковых и гонококковых инфекций. Роль нейссерий в развитии инфекционных патологий полости рта (микроскопический метод).

ЦЕЛЬ: Изучить методы микробиологической диагностики менингококковых и гонококковых инфекций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Каковы морфологические, тинкториальные и культуральные свойства менингококков и гонококков? В чем отличие их биохимических свойств?
2. Какие заболевания могут вызвать менингококки?
3. Какие микроорганизмы (кроме менингококков) могут вызвать воспаление спинномозговых оболочек?
4. Какова резистентность менингококков и гонококков к факторам внешней среды?
5. Назовите методы микробиологической диагностики острой и хронической гонореи.
6. Что такое бленорей? Могут ли болеть бленореей взрослые?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Составить направление в лабораторию к материалу, взятому у больных гонореей и менингитом.

2. Промикроскопировать мазки из отделяемого уретры больного гонореей, описать, дать заключение.
3. Разобрать схему реакции Борде – Жангу (РСК), учесть результаты (демонстрация) и дать заключение.

ЗАДАЧИ

1. На прием к врачу явился больной А. 25 лет, холост, с жалобами на обильное гнойное отделяемое из уретры.
 - а) какое заболевание Вы заподозрите? Какой анализ порекомендуете сделать?
 - б) в мазке из гнойного отделяемого уретры обнаружены грамотрицательные диплококки, расположенные внеклеточно и внутриклеточно. Какой диагноз поставите?
2. Больной жалуется на длительные выделения гноя из уретры, рези и боли при мочеиспускании. Вы предполагаете хроническую гонорею. Какими микробиологическими методами можно подтвердить этот диагноз?
3. Детей из детского сада нужно обследовать на носительство менингококка. Какой материал подлежит исследованию? На какие питательные среды необходимо засеять этот материал?
4. В больницу поступил больной с клинической картиной менингита. При пункции получена мутная спинномозговая жидкость:
 - а) какие меры предосторожности следует соблюдать при транспортировке ликвора в лабораторию в холодное время года.
 - б) в мазке из осадка спинномозговой жидкости обнаружены диплококки. Какой вы поставите диагноз? Как дальше продолжите исследование ликвора?

Дифференциальные признаки пневмококков и стрептококков

	Морфология	Ферментация инулина	Чувствительность к оптохину	Проба с желчью
<i>St. pneumoniae</i>	ланцетовидной формы	+	+	+
<i>St. pyogenes</i>	округлой формы	-	-	-

ПРОТОКОЛ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ (ДИАГНОЗ – СЕПСИС)

Материал исследования – кровь

Цель – выделение чистой культуры, и ее идентификация

День	Ход исследования	Результаты исследования
1.		

2.		
3.		
4.		
5		

Заключение:

Занятие № 16

ТЕМА: Микробиологическая диагностика анаэробных инфекций (микроскопический, бактериологический методы).

ЦЕЛЬ: Изучить методы микробиологической диагностики столбняка, газовой гангрены, ботулизма.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

1. Какие Вы знаете анаэробные инфекции? Почему их относят к токсинемическим? Укажите латинские названия этих инфекций.
2. Что является средой обитания анаэробных бактерий в естественных условиях?
3. Какие основные микробиологические методы используют для диагностики анаэробных инфекций?

4. Каков механизм заражения и каковы особенности патогенеза при газовой гангрене?
5. Какова природа токсина столбнячной палочки и на что он действует?
6. Чем отличается картина столбняка у человека и у мелких лабораторных животных?
7. Какие типы токсина продуцирует возбудитель ботулизма и что поражает токсин?
8. Какие условия способствуют размножению возбудителя ботулизма и накоплению токсина в пищевом продукте? Какие продукты чаще всего являются причиной отравления?
9. Какие специфические препараты применяют для лечения и профилактики газовой гангрены, столбняка, ботулизма?
10. Какие Вы знаете неспорогенные анаэробные бактерии?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Изучить (разобрать) схемы микробиологической диагностики газовой гангрены, столбняка, ботулизма.
2. Произвести посев исследуемого материала (раневого отделяемого) на среду Китта-Тароцци. Прогреть засеянные среды при температуре 80° С для уничтожения неспоровой микрофлоры.
3. Выделение чистой культуры по способу Вейнберга-Перетца.
4. Посев на пестрый ряд для биохимической идентификации выделенной культуры. Реакция нейтрализации экзотоксина противогангренозными антитоксическими сыворотками на белых мышах.
5. Заполнить протокол, дать заключение.
6. Ознакомиться по демонстрационному материалу с препаратами для диагностики, лечения и профилактики анаэробных инфекций (газовой гангрены, ботулизма, столбняка)

ЗАДАЧИ

1. В клинику поступил больной с обширным ранением нижних конечностей. Какой препарат следует применить с целью профилактики газовой гангрены?
2. Пробу почвы засеяли на среду Китта-Тароцци. Выросшую в бульоне культуру ввели мышке у корня хвоста. Через сутки хвост встал «трубой», развились контрактуры мышц и мышь погибла. От чего погибла мышь?
3. Работая в огороде, женщина поранила лопатой ногу. Какие профилактические препараты следует назначить больной после хирургической обработки раны?
4. Мальчик 12 лет, ученик школы №13, упал с дерева и глубоко поранил руку. Нужно ли вводить этому мальчику препараты для профилактики столбняка?
5. У больного подозревается ботулизм.
 - а) какой материал постараетесь взять на исследование? Какими методами будете проводить микробиологическую диагностику?
 - б) в чем будет заключаться специфическое лечение и профилактика этого заболевания?

ЛАТИНО - РУССКИЙ СЛОВАРЬ

<i>Латинское название микроорганизма</i>	<i>Русское название микроорганизма</i>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: – М.:МИА, 2001
2. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Учебное пособие. – М., Медицина, 1993
3. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П. Медицинская и санитарная микробиология М., «Академия», 2003.
4. Лебедева М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. –М.: «Медицина», 1973
5. Медицинская микробиология /Под редакцией В.И.Покровского. – М.:, ГЭОТАР-МЕД, 2001
6. Руководство к практическим занятиям по общей микробиологии. – Ярославль, Изд-во «Ремдер», 2003.

Под авторской редакцией

Тираж 100

Издано в ДМСИ, ул. Азиза Адиева, 25.