Министерство образования и науки Российской Федерации

Сибирский федеральный университет

**ИЗБРАННЫЕ ГЛАВЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Методические указания к лабораторным занятиям

Красноярск

СФУ

2013

УДК

ББК

И

Рецензенты:

Составитель Н.И.Сарматова

И Избранные главы медицинской микробиологии: Методические указания к семинарским занятиям [Текст] / сост. Н.И. Сарматова. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2011. – 21 с.

ISBN

Методические указания составлены в соответствии с учебным планом и программой по дисциплине «Избранные главы медицинской микробиологии». Пособие содержит тематический план лабораторных занятий, контрольные вопросы для подготовки к занятиям; представлены источники литературы в соответствии с темами дисциплины. Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по направлению «Биология», магистерская программа «Микробиология и биотехнология».

© Н.И. Сарматова

© ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный

университет», 2013

**СОДЕРЖАНИЕ**

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ 4

СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ 5

Лабораторная работа 1. Методы оценки антимикробного действия химических и физических факторов 5

Лабораторная работа 2. Методы оценки эффективности действия антимикробных препаратов. 10

Лабораторная работа 3. Микрофлора тела здорового человека. 12

Лабораторная работа 4. Возбудители гнойно-воспалительных заболеваний: стафилококки, стрептококки. 14

Лабораторная работа 5. Гнойно-воспалительные заболевания, вызванные грамотрицательными микроорганизмами: клебсиеллами, псевдомонадами 17

Лабораторная работа 6. Возбудители анаэробной инфекции: клостридии газовой гангрены, столбняка, ботулизма 18

Лабораторная работа 7. Вирусологическое исследование. Работа с клеточными культурами. Взятие и подготовка материала для вирусологической диагностики. Выявление (индикация) и идентификация вирусов. 20

Лабораторная работа 8. Микробиологическая диагностика микозов 24

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 30

# ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Лабораторные занятия направлены на расширение и детализацию теоретических знаний, на выработку и закрепление практических навыков профессиональной деятельности, являются средством развития культуры научного мышления. Они позволяют расширять теоретического знания, углубленно изучать разделы микробиологии и биотехнологии, связанные с актуальными направлениями исследований.

Целью освоения дисциплины «Избранные главы медицинской микробиологии» является формирование у магистров-биологов глубоких базовых теоретических и практических знаний в области медицинской микробиологии, учитывая, что многие инфекционные заболевания в свете последних научных данных получили экологическое обоснование.

Задачами дисциплины являются:

1. Осознание необходимости изучения причин проникновения в популяцию человека казалось бы уже побежденных опасных возбудителей болезней, и неизвестных ранее.

2. Изучение механизмов формирования факторов патогенности у видов и штаммов из числа нормальной микрофлоры человека в период снижения уровня иммунитета.

3. Изучение природных резервуаров паразитических микроорганизмов, причин и механизмов их «выхода» из природных резервуаров.

В результате изучения дисциплины магистры должны знать, что и в XXI проблема инфекционных болезней остается не решенной. Это и появление и быстрое распространение по всему миру вирусов ВИЧ, гепатитов В, С, D, Е и др., лекарственно-устойчивых штаммов бактерий, вирусов, грибов, а также частота вспышек новых инфекций человека. Для решения приоритетных задач: идентификации инфекционного агента, разработки методов его обнаружения, оценки эффективности методов лечения, определения ключевых эпидемиологических параметров, определяющих распространенность инфекции необходимы знания биологии и экологии. Знания медицинской микробиологии необходимы биотехнологам, т. к. в биотехнологических процессах для получения медицинских диагностических препаратов и вакцин, используют патогенные микроорганизмы (брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка). Многие микроорганизмы используются в качестве реципиентов чужеродного генетического материала с целью получения рекомбинантных штаммов-продуцентов биотехнологической продукции.

Уметь: использовать стандартные микробиологические методы для выделения микроорганизмов из патологического материала; создавать оптимальные условия культивирования для микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней; проводить сероидентификацию и серодиагностику инфекционных заболеваний.

Владеть: современными методами микробиологических исследований; информационными технологиями.

Для успешного освоения дисциплины «Избранные главы медицинской микробиологии» магистр должен иметь знания в области общей микробиологии, вирусологии, микологии, биохимии микроорганизмов.

# СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Темы лабораторных работ:

*Модуль 1. Общие вопросы медицинской микробиологии*

*Работа 1.* Методы оценки антимикробного действия химических и физических факторов (2 часа)

*Работа 2.* Методы оценки эффективности действия антимикробных препаратов (2 часа)

*Работа 3.* Микрофлора тела здорового человека (2 часа)

*Модуль 2. Частные вопросы медицинской микробиологии*

*Работа 4.* Возбудители гнойно-воспалительных заболеваний: стафилококки, стрептококки (2 часа)

*Работа 5.* Гнойно-воспалительные заболевания, вызванные грамотрицательными микроорганизмами: клебсиеллами, псевдомонадами (2 часа)

*Работа 6.* Возбудители анаэробной инфекции: клостридии газовой гангрены, столбняка, ботулизма (2 часа)

*Работа 7.* Вирусологическое исследование. Выявление (индикация) и идентификация вирусов (2 часа)

*Работа 8.* Микробиологическая диагностика микозов (2 часа)

**Модуль 1. Общие вопросы медицинской микробиологии**

**Раздел 1.1 Значение медицинской микробиологии в создании нормативно-правовой основы системы биологической безопасности**

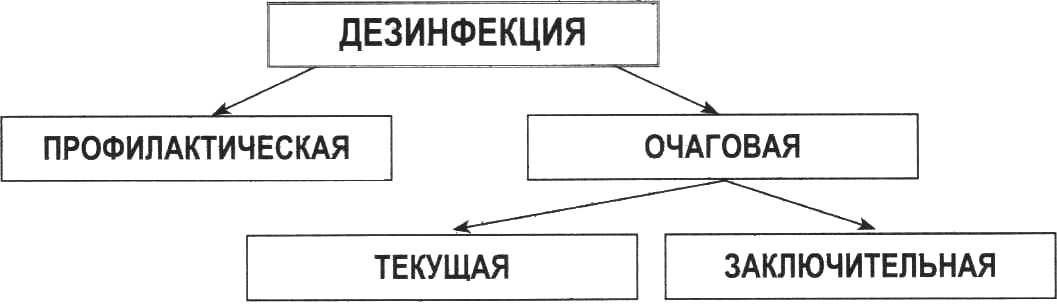
## Лабораторная работа 1. Методы оценки антимикробного действия химических и физических факторов

*Дезинфекция –* мероприятия направленные на уничтожение микроорганизмов на объектах внешней среды (в том числе изделиях медицинского назначения), способные вызывать инфекционные заболевания у человека. Дезинфекция как в профилактических целях, так и по эпидемическим показаниям, проводится с целью создания безопасных условий деятельности медицинского персонала и населения, снижения уровня инфекционной заболеваемости и предотвращения групповой и вспышечной заболеваемости среди различных категорий последнего во исполнение Федерального закона от 30.03.99 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

Задачей дезинфекции является предупреждение или ликвидация процесса накопления, размножения и распространения возбудителей заболеваний путем их уничтожения или удаления с объектов и предметов, что обеспечивает прерывание путей передачи заразного начала от больного к здоровому.

В клинико-диагностических и микробиологических лабораториях, где медицинскому персоналу по роду своей деятельности приходится постоянно контактировать с инфицированным материалом, выделять чистые культуры возбудителей инфекционных заболеваний, определять их видовую принадлежность, дезинфекция приобретает особое значение. Она предупреждает заражение, возникновение внутрибольничных инфекций и вынос возбудителей инфекционных заболеваний за пределы лаборатории.

Дезинфекцию подразделяют на профилактическую и очаговую, а последнюю — на текущую и заключительную. Профилактическая дезинфекция проводится с целью профилактики возникновения инфекционных заболеваний, а очаговая — в очагах инфекционных заболеваний.



Профилактическая дезинфекция осуществляется многократно независимо от наличия инфекционных заболеваний (при отсутствии выявленного источника инфекции) и имеет целью предупредить их возникновение и распространение, накопление возбудителей этих заболеваний или, их переносчиков на объектах окружающей среды, т. е. защитить человека от возможного заражения; Профилактическая дезинфекция проводится там, где источник инфекции не выявлен, но есть условия для распространения инфекции:

Текущая дезинфекция проводится непосредственно в окружении больного или бацилловыделителя в течение всего периода выделения заразного начала с целью Предупреждения распространения возбудителей инфекционных заболеваний в окружающей среде, могущего повлечь, за собой заболевания других лиц. Этот вид дезинфекции проводит медперсонал учреждения или члены семьи до момента госпитализации больного.

Заключительная дезинфекция направлена на уничтожение возбудителя инфекционного начала в очаге после госпитализации, выздоровления, смерти больного или в других случаях его убытия. Проводится, как правило; однократно и должна начинаться немедленно после эвакуации инфекционного больного.

При организации дезинфекционных мероприятий в лабораториях необходимо учитывать специфику и виды деятельности, знать объекты, наиболее часто и массивно обсеменяемые патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, их устойчивость и длительность выживания во внешней среде, механизм передачи, устойчивость к лечебным и дезинфицирующим средствам.

Ответственность за организацию и проведение дезинфекционных мероприятий в лабораториях несет руководитель учреждения (организаций), который должен ориентироваться на действующие нормативные, распорядительные и методические документы.

*Стерилизация –* это уничтожение на объектах внешней среды всех форм микроорганизмов, включая споровые. Стерилизацию изделий медицинского назначения (ИМН) проводят с целью умерщвления на них всех патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизации подлежат все изделия, соприкасающиеся с раневой поверхностью, контактирующие с кровью, а также изделия которые в процессе эксплуатации контактируют со слизистой оболочкой и могут вызвать ее повреждение. ИМН многократного применения, подлежащие стерилизации, перед стерилизацией подвергают стерилизационной очистке.

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1. Перечислить методы дезинфекции. Дать краткую характеристику каждому методу.

2. Перечислить способы дезинфекции. Дать краткую характеристику каждому способу.

3. Перечислить группы дезинфицирующих средств, в зависимости от входящих в их состав активнодействующих веществ (ДВ). Дать краткую характеристику каждой группе.

4. Указать методы стерилизации и стерилизуемые ими агенты.

5. Перечислить режимы воздушной стерилизации и стерилизации паровым методом

Одной из задач медицинской микробиологии является обеспечение микробиологического контроля противоэпидемического режима как в лечебных организациях, так в микробиологических лабораториях. Такой контроль включает:

* Исследование микробной обсеменённости поверхностей;
* Контроль микробной обсемененности воздуха;
* Эффективность обеззараживания и стерилизации;
* Оценку эффективности ультрафиолетового облучения.

1. **Исследование микробной обсеменённости поверхностей**

Контроль качества дезинфекции рабочих поверхностей и оборудования проводят методом смывов. Контролю подлежат поверхности рабочих столов, внутренние поверхности термостатов, холодильников для хранения культур, емкости для дезинфицирующих растворов, лабораторная посуда. Смывы берутся после дезинфекции, по окончании экспозиции.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| С поверхности рабочих столов, инвентаря, наружных деталей приборов, стен бокса, дверных ручек | БКГП | 1 раз в месяц |
| Синегнойная палочка |
| S. aureus |
| Патогенные м/о | По эпид. показаниям |
| Яйца гельминтов | 1 раз в месяц (для лабораторий, выполняющих исследования с материалом, подозрительным на зараженность гельминтами) |
| Нуклеиновые кислоты | 1 раз в квартал (для лабораторий, выполняющих ПЦР исследования) |

**2. Контроль микробной обсемененности воздуха**

Контроль проводят в посевных комнатах, боксах или в ламинарных укрытиях перед началом проведения работ. Посев проводят на плотную полноценную неселективную среду (питательный агар, ГРМ-агар и др.) седиментационным или аспирационным методом. При седиментационном методе вдвух точках посевной комнаты, бокса и (или) ламинарного шкафа ставят открытые чашки Петри с питательным агаром на 15 мин**.** Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±2) часов. Допускается пророст не более 3 колоний на чашке. При аспирационном методе отбор воздуха проводится пробоотборным прибором в количестве 100л согласно инструкции к пробоотборнику. Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24±2) часов. Допускается не выше 500 КОЕ/м3.Использование аспирационного метода не допускается для контроля воздуха укрытий с ламинарным потоком

**3. Эффективность обеззараживания и стерилизации**

Контролю подвергаются все виды лабораторной посуды, используемые для исследований: стеклянные, многоразового использования после стерилизации и пластиковые одноразового использования, поступающие стерильными от производителя. Целью проведения данного вида контроля является выборочный контроль качества подготовки посуды. В случае получения результата, свидетельствующего о нестерильности хотя бы одной емкости, все партии посуды, прошедшие обработку в данном стерилизаторе, бракуют. Забракованные партии посуды подлежат повторной стерилизации. Выясняют возможные причины нарушения стерильности. Проводят комплексную проверку стерилизатора с одновременным использованием химического, термического (в 5 точках) и биологического контроля.

Определение стерильности готовой питательной среды проводят визуально путем просмотра 3-5 % каждой партии после инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 2-14 суток в зависимости от типа среды. Обнаружение после инкубации помутнения жидкой (полужидкой) среды или появление на чашках (пробирках) колоний свидетельствует о нестерильности среды, и вся исследуемая среда подлежит повторному контролю на удвоенном количестве образцов. При повторном подтверждении результата среда подлежит уничтожению.

*Контроль эффективности обеззараживания и стерилизации*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Каждая единица стерилизационной техники | Химический контроль с использованием химических индикаторов | Постоянно при каждом цикле |
| Термический контроль с использованием термометров, термопар | 2 раза в месяц |
| Биологический контроль с использованием биотестов, имеющих дозированное количество спор тест-культуры. | 2 раза в год |
| Биологический контроль автоклавов для стерилизации питательных сред | 1 раз в квартал |

Итак, контроль эффективности работы стерилизационного оборудования осуществляется физическими, химическими и биологическим (бактериологическим) методами. Надежность этих методов неодинакова. Физические и химические методы предназначены для оперативного контроля и позволяют контролировать соблюдение параметров режимов паровой, газовой, воздушной стерилизации, температуру, давление, экспозицию. Недостаток этих методов заключается в том, что они не могут служить доказательством эффективной стерилизации. Достоверным для определения эффективности является только бактериологический метод. Для проведения бактериологического контроля используются биотесты, имеющие дозированное количество спор тест-культуры.

В настоящее время Европейским Союзом принят стандарт по биологическим индикаторам EN ISO 11138 (у нас в стране аналог – ГОСТ Р ИСО 11138-2000 «Стерилизация медицинской продукции. Биологические индикаторы»), где под биологическим индикатором понимается «тестовая система, содержащая жизнеспособные микроорганизмы, которые обеспечивают определенную устойчивость к заданному процессу стерилизации».

**4. Оценка эффективности ультрафиолетового облучения**

Ультрафиолетовое излучение с длинной волны 260-300 мкм обладает достаточно выраженным микробицидным действием, однако некоторые виды микробов и споры резистентны к УФ. Обработку УФ обычно используют для дезинфекции крупных объектов и воздуха помещений. Бактерицидная эффективность ультрафиолетового облучения определяется подсчетом числа микроорганизмов, содержащихся в воздухе до и после облучения, и затем оценивается в процентах по формуле:

**БЭ = (Nо - Nв/Nо) х100%,**

где **БЭ** – бактерицидная эффективность облучения;

**Nо** – число микроорганизмов до облучения;

**Nв** – число микроорганизмов после облучения.

Эффективное бактерицидное излучение – БЭ не менее 99%.

Задания

1. Провести контроль эффективности мероприятий по обеззараживанию объектов внешней среды микробиологических лабораторий: воздуха помещений, поверхностей лабораторного оборудования.

2. Указать режимы и аппаратуру, используемую для стерилизации растворов питательных сред.

3. Провести контроль эффективности стерилизации.

## Лабораторная работа 2. Методы оценки эффективности действия антимикробных препаратов.

Для выбора средств эффективной антимикробной терапии и профилактики важно определять чувствительность выделенных культур возбудителей к антимикробным препаратам. С этой целью применяют несколько методов исследования: диско-диффузионный, метод серийных разведений, метод Е-тестов, пограничных концентраций и другие. Нередко в качестве эпидемического маркера используют резистограмму штаммов — данные по их устойчивости/чувствительности к химиопрепаратам, что позволяет оценивать идентичность штаммов, выделенных из разных источников.

При использовании антибиотиков на практике важно определять чувствительность к ним клинически значимых штаммов микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам (ХТП) необходимо определять в каждом случае инфекции и периодически — в ходе лечения. Главным показателем чувствительности является минимальная ингибирующая концентрация — МИК (мкг/мл), т. е. минимальная концентрация антибиотика, задерживающая рост микроба-возбудителя в стандартном опыте.

Значение величины МИК определяют методом серийных разведений или методом диффузии в агар (дисками или Е-тестами). В любом случае критерием чувствительности является значение величины терапевтического индекса

Т = МИК/К,

где К — концентрация данного антибиотика (мкг/мл) в очаге инфекции (или в крови) при введении терапевтических доз препарата.

Микроб чувствителен, а антибиотик обычно клинически эффективен при Т < 0,3. Значения К можно найти в специальных таблицах.

На практике величина МИК позволяет отнести испытуемый штамм микроорганизма к одной из 3 категорий: чувствительный, умеренно устойчивый, устойчивый.

Микроорганизм считают чувствительным, если у него нет механизмов резистентности к данному антимикробному средству и при лечении стандартными дозами инфекции, вызванной данным микроорганизмом, отмечается хорошая терапевтическая эффективность.

Устойчивым к антимикробному средству считают микроорганизм, если он имеет механизмы резистентности к данному препарату и при лечении инфекций, вызванных этим микроорганизмом, нет клинического эффекта даже при использовании максимальных терапевтических доз этого препарата.

Микроорганизм относят к умеренно устойчивым, если по своей чувствительности он занимает промежуточное значение между чувствительными и устойчивыми штаммами. При воздействии ряда антибиотиков на чувствительные к ним микроорганизмы нередко возникают формы, устойчивые к их действию.

Глобальный характер проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам приобрела в конце 80-х — начале 90-х гг. XX столетия. Многие развитые страны начали разрабатывать и осуществлять на практике национальные программы по сдерживанию возникновения и распространения резистентных форм микроорганизмов.

Теоретический смысл изучения факторов приспособления микроорганизмов к антибиотикам определяется необходимостью выявления механизма этого явления, вскрытия причин адаптации микроорганизмов к новым условиям существования.

Практическое значение проблемы адаптации микробов к действию антибиотиков обусловлено тем, что появление резистентных форм in vivo при применении антибиотиков в лечебной практике или в борьбе с фитопатогенными организмами может привести и приводит к существенному снижению лечебных свойств антибиотиков. Поэтому применение антибиотиков в клинике и особенно выбор того или иного препарата для назначения больному должны учитывать его эффективность в отношении возбудителя заболевания и индивидуальные особенности больного.

*Задания*

1. Поставить опыт по определению чувствительности грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом.

2. Определить минимальную ингибирующую концентрацию пенициллина для бактериальных культур методом серийных разведений.

3. Определить чувствительность дрожжевых грибов к антимикотикам методом пограничных концентраций.

**Раздел 1.2. Учение об инфекции**

## Лабораторная работа 3. Микрофлора тела здорового человека.

В современной микробной экологии человека целесообразно выделить две субдисциплины: экзомикроэкологию и эндомикроэкологию.

Экзомикроэкологияисследует взаимоотношения человека (как индивидуума, так и популяции людей) с микроорганизмами окружающей среды. В определенной мере часть этих задач решает санитарная микробиология, которая находится на стыке микробиологии, экологии, эпидемиологии и гигиены. При этом исходят из посылки, что человек и микроорганизмы окружающей среды совместно обитают в определенном участке биосферы (биотопе) с относительно стабильными абиогенными и биогенными характеристиками. Таким образом, в том или ином конкретном биотопе нашей планеты сформировалось и существует подвижное симбиотическое сообщество сравнительно однородной популяции людей и чрезвычайно гетерогенного комплекса микробных популяций. Эндомикробиология (медицинская микроэкология) исследует симбиотические взаимоотношения между аутомикрофлорой и макроорганизмом, а также между сочленами микробного населения организма в норме и при патологии.На основе новых знаний разрабатываются методы и средства гармонизации этих взаимоотношений в интересах здоровья не только отдельного человека, но и сообщества в целом.

Понятно, что условия обитания микробов в человеческом организме не одинаковы. Микрофлора располагается только на коже и слизистых оболочках полостей, сообщающихся с внешней средой (кроме матки и мочевого пузыря). Все ткани организма в норме совершенно свободны от микробов. Микробиотопы организма существенно различаются по газовому составу воздушной среды, спектру ферментов и иммунных факторов, продуктов метаболизма и других биологически активных веществ, рН среды, набору экзогенных веществ — эти и другие параметры различны в ротовой полости, пищеводе, желудке, тонком и толстом кишечнике, влагалище, носу, верхних и нижних дыхательных путях, на коже.

Необходимо учесть разнообразие клеточного состава этих поверхностей, ведь колонизация, т.е. процесс заселения эпителия микробами, невозможен без предварительной адгезии. Адгезия(прикрепление, фиксация микроорганизмов) обусловлена лигандно-рецепторным сродством поверхностных структур эпителиальных клеток и микробов. Каждый биотоп вместе с соответствующим микробоценозом составляет небольшую экосистему. Естественная аутомикрофлора тела – единый природный комплекс, состоящий из совокупности гетерогенных микробоценозов в различных участках человеческого организма. Подобная интеграция целесообразна и необходима, она универсальна для живого мира и могла сформироваться только в результате отбора в процессе биологической эволюции. Учитывая важнейшую роль в поддержании здоровья человека, симбиотическую аутомикрофлору тела иногда квалифицируют как своеобразный экстракорпоральный орган эукариотического макроорганизма. Собственных клеток тела существенно меньше числа населяющих его микробных клеток (более 1014 клеток, свыше 500 микробных видов).

Конечно, наши знания о составе естественной микрофлоры организма пока весьма приблизительны, ибо современная лабораторная техника еще не позволяет выявлять и идентифицировать полный спектр бактерий и грибов в микробоценозах (не говоря уже о вирусах). Совокупность микроорганизмов, обитающих на различных участках тела у здоровых людей, называют нормальной микрофлорой тела человека. Нормальная микрофлора выполняет следующие функции:

* защитную (антагонизм к другим, в том числе патогенным микробам);
* иммуностимулирующую (антигены микроорганизмов стимулируют развитие лимфоидной ткани);
* пищеварительную (прежде всего обмен холестерина и желчных кислот);
* метаболическую (синтез витаминов группы В (В1, B2, B6, B12), К, никотиновой, пантотеновой, фолиевой кислот).

На слизистых оболочках, особенно желудочно-кишечного тракта, представители нормальной микрофлоры обитают в виде двух форм – часть из них располагается в просвете (просветная), другая заключена в мукозный пристеночный матрикс, образующий биопленку (пристеночная микрофлора). С ней связана *колонизационная резистентность* кишечника – естественный барьер защиты кишечника (и организма в целом) от инфекционных агентов.

Представители нормальной микрофлоры не всегда приносят только пользу. При определенных условиях, в частности, при воздействии факторов, снижающих естественную резистентность, практически все представители нормальной микрофлоры, за исключением бифидобактерий, могут стать виновниками различных эндогенных инфекций, чаще всего гнойно-воспалительных заболеваний с различной локализацией: ангины, менингиты, циститы, отиты, и т. д.

Возникающие микроэкологические изменения в организме человека получили название дисбактериоз или дисбиоз. Это клинико-лабораторный синдром, возникающий при целом ряде заболеваний и клинических ситуаций, который характеризуется изменением качественного и/или количественного состава нормофлоры, а также метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися у части пациентов поражением кишечника, транслокацией бактерий в несвойственные биотопы и их избыточным ростом.

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1. Описать типы экологических взаимоотношений партнеров в биоценозах.

2. Значение постоянной (облигатной и факультативной) и случайной микрофлоры биотопов организма человека.

3. Знать основные физиологические функции естественной микрофлоры тела на примере кишечного тракта.

*Задания*

1. Определить состав микрофлоры зубного налета на основании данных микроскопии нативного и окрашенного по Граму мазков.

2. Определить состав микрофлоры кишечника на основания учета посевов фекалий на дифференциально-диагностические среды: Эндо, ЖСА, Сабуро, Блаурокка, лактобакагар, Вильсона-Блера.

3. Сделать смывы с кожи рук для установления имеющихся бактерий.

**Модуль 2. Частные вопросы медицинской микробиологии, вирусологии, микологии**

**Раздел 2.1. Медицинская бактериология**

## Лабораторная работа 4. Возбудители гнойно-воспалительных заболеваний: стафилококки, стрептококки.

Стафилококки могут вызывать оппортунистические, в том числе внутрибольничные инфекции. Наибольшее клиническое значение наряду с «традиционными» видами – Staphylococcus aureus (золотистым), Staphylococcus epidermidis (эпидермальным) и Staphylococcus saprophytics (сапрофитическим) – имеют так называемые коагулазоотрицательные стафилококки (S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. schleiferi, S. warneri). Внутрибольничные инфекции часто обусловлены метициллинрезистентными S. aureus (MRSА), имеющими повышенную вирулентность и устойчивость ко многим антимикробным препаратам.

При заболеваниях, вызванных стафилококками, исследуют гной, раневое отделяемое, пунктаты из полостей и абсцессов, материал со слизистых оболочек, кровь, мокроту, мочу, спинномозговую жидкость; в случае пищевых отравлений – рвотные массы, испражнения больных, остатки пищи; при профилактических исследованиях – смывы с инструментов и оборудования, стерилизованные материалы медицинского назначения, воздух.

При открытых гнойных поражениях материал берут ватным тампоном после удаления верхнего слоя гноя, в котором могут находиться непатогенные стафилококки и другие микроорганизмы, попавшие с кожи или из воздуха. При наличии закрытых гнойных очагов делают пункцию и выливают гной из шприца в стерильную пробирку. Отделяемое слизистой оболочки снимают сухим тампоном. Мочу, мокроту собирают в стерильные пробирки и банки. Кровь (5-20 мл), взятую шприцем из локтевой вены, и спинномозговую жидкость с соблюдением правил асептики сеют у постели больного во флакон, содержащий 100-200 мл сахарного бульона (рН 7,2-7,4), или на среду для контроля стерильности. Стафилококки хорошо размножаются и на простых средах, однако лучше использовать обогащенные среды, так как септицемия может быть вызвана не только стафилококками, но и прихотливыми микроорганизмами (стрептококками, анаэробами и др.).

Хотя многочисленные представители рода Streptococcus в норме составляют значительную долю нормальной микрофлоры пищеварительного, дыхательного и генитального тракта, некоторые из них могут вызывать оппортунистические инфекции разной локализации и тяжести: фарингиты, ангины, отиты, пневмонии, скарлатину и другие заболевания дыхательного тракта и JIOP-opганов; рожистое воспаление, флегмоны, нагноения ран и другие заболевания кожи и подкожной клетчатки; послеродовые гнойно-воспалительные осложнения, менингит, сепсис. Тяжелыми осложнениями стрептококковой инфекции являются ревматизм и гломерулонефрит. Наибольшее клиническое значение имеют Streptococcus pyogenes (пиогенный стрептококк, группа А по Лэнсфилд), Streptococcus pneumoniae (пневмококк), Streptococcus agalactiae (β-гемолитические стрептококки группы В), β-гемолитические стрептококки групп С и G. В последнее время доказана этиологическая роль стрептококков группы D (эндокардиты, менингиты), а также ряда «зеленящих» стрептококков, постоянно обитающих на слизистых оболочках (бактериемии, эндокардиты, глубокие абсцессы печени и мозга).

При заболеваниях, вызванных стрептококками, материалом для исследования, в зависимости от локализации и формы инфекции, являются гной, кровь, отделяемое слизистой оболочки, моча, мокрота, спинномозговая жидкость, раневое отделяемое. Берут его так же, как при заболеваниях, вызванных стафилококками. При взятии материала из полости рта ополаскивание не проводят, а интервал после приема пищи должен быть не менее 2 ч. Если материал невозможно доставить в лабораторию в течение 2 ч, его помещают в транспортные среды или среду накопления (сахарный бульон, тиогликолевая среда).

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1.Указать систематическое положение стафилококков, стрептококков.

2. Дать морфолого-биологическую характеристику указанных выше возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

3. Знать факторы патогенности этих возбудителей и особенности патогенеза вызываемых ими заболеваний.

4. Знать особенности формирование иммунитета, особенности профилактики при данных инфекциях.

5. Уметь провести лабораторную диагностику инфекций, вызванных этими возбудителями.

6. Знать особенности экологии и эпидемиологии.

*Задания*

1.Провести бактериоскопическое исследование демонстрационных мазков, приготовленных из патологического материала окрашенных по Граму. Сделать заключение и наметить план дальнейшего анализа.

2. Учесть результаты готовых посевов патологического материала на питательные среды: 5% кровяной агар, селективный кровяной агар с добавлением триметоприм-сульфаметоксазола, сахарный бульон, тиогликолевую среду. Описать колонии и отметить наличие или отсутствие гемолиза вокруг них.

3. Приготовить мазки из выросших колоний и окрасить по Граму.

4. Учесть результаты готовых посевов чистых культур. В случае выделения стафилококка:

а) отметить характер роста культуры на среде ЖСА.

б) определить способность продуцировать плазмокоагулазу

в) оценить рост на средах «пестрого ряда» с глюкозой и маннитом в аэробных и анаэробных условиях.

г) учесть и оценить результаты антибиотикограммы с выделенной культурой.

5.Учесть результаты готовых посевов чистых культур. В случае выделения стрептококков.

а) отметить характер роста культуры при 100С,

б) при 450С,

в) при рН 9,6,

г) на средах, содержащих метиленовый синий (0,1%),

д) хлорид натрия (6,5%),

е) желчь (40%),

ж) термоустойчивость при 600С в течение 30 мин.

з) учесть и оценить результаты антибиотикограммы с выделенной культурой.

## Лабораторная работа 5. Гнойно-воспалительные заболевания, вызванные грамотрицательными микроорганизмами: клебсиеллами, псевдомонадами

Условно-патогенные представителя семейства Enterobacteriaceae могут вызывать разнообразные клинические синдромы, воспалительные процессы различной локализации и сепсис.

Представители семейства Enterobacteriaceae наиболее часто встречаются при анализе разнообразного клинического материала. Из всех клинически значимых бактерий энтеробактерии составляют около 50%, из грамотрицательных – примерно 80%. На долю энтеробактерий приходится около 50 % всех возбудителей септицемий, до 70 % гастроэнтеритов и более 70 % возбудителей инфекций мочевого тракта. Если принимать во внимание иммунодефицита, предрасположенных лиц и распространение внутрибольничных инфекций, можно сказать, что энтеробактерии могут быть выделены из любого материала, доставленного в лабораторию.

Кроме представителей рода Shigella, многие энтеробактерии вызывают внекишечные инфекции (мочевые, особенно циститы, респираторные, раневые, кровяные, инфекции ЦНС). Их чаще вызывают представители семи видов: Е. coli, К. pneumoniae, К. oxytoca, P. mirabilis, Е. aerogenes, Е. cloacae и S. marcescens. Поскольку такие инфекции нередко угрожают жизни больного, существует необходимость в быстром выделении, идентификации соответствующих возбудителей и определении их чувствительности к антимикробным воздействиям.

Ввиду сходства морфологических и тинкториальных свойств патогенных и условно-патогенных эшерихий с другими энтеробактериями микроскопический метод неинформативен и в диагностике практически не используется. В основе диагностики заболеваний, вызванных эшерихиями, лежит выделение возбудителя и определение его принадлежности к той или иной патогенной группе (на основании антигенной структуры и выявления факторов патогенности и/или патогенных свойств – токсинов, адгезинов, инвазинов, а также их генетических детерминант).

В основе диагностики лежит бактериологический метод исследования.

Материалом для исследования могут быть испражнения, рвотные массы, гной, раневое отделяемое, мокрота, желчь, ликвор, кровь, секционный и другой материал (в зависимости от формы инфекции). При озене исследуют отделяемое слизистой оболочки носа, при риносклероме – ткань инфильтратов.

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1.Указать систематическое положение энтеробактерий и псевдомонад.

2. Дать морфолого-биологическую характеристику указанных выше возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

3. Знать факторы патогенности этих возбудителей и особенности патогенеза вызываемых ими заболеваний.

4. Знать особенности формирование иммунитета, особенности профилактики при данных инфекциях.

5. Уметь провести лабораторную диагностику инфекций, вызванных этими возбудителями.

6. Знать особенности экологии и эпидемиологии.

*Задания*

1.Провести бактериоскопическое исследование демонстрационных мазков, приготовленных из патологического материала окрашенных по Граму. Сделать заключение и наметить план дальнейшего анализа.

2. Учесть результаты готовых посевов патологического материала на питательную среду 5% кровяной агар.

3. Приготовить мазки из выросших колоний и окрасить по Граму.

4. При наличие в мазках грамотрицательных палочек. Учесть результаты готовых посевов чистых культур на среду Клиглера.

а) отметить характер роста культуры на этой среде.

б) оценить рост на средах «пестрого ряда».

г) учесть и оценить результаты антибиотикограммы с выделенной культурой.

## Лабораторная работа 6. Возбудители анаэробной инфекции: клостридии газовой гангрены, столбняка, ботулизма

Газовая гангрена (травматический клостридиоз). Газовая гангрена – заболевание, возникающее после обширных глубоко проникающих ранений мышц и других тканей, после криминальных абортов, при условии загрязнения тканей гистотоксическими клостридиями (чаще из внешней среды, особенно почвы). По гистотоксичности и частоте выделения возбудители этого заболевания убывают в ряду: Clostridium perfringens (80 %), Clostridium novyi, Clostridium septicum, Clostridium histolyticum, Clostridium bifermentans. Эти микроорганизмы входят в состав нормальной микрофлоры тела человека и животных.

Исследуемый материал – кусочки пораженных и некротизированных тканей, взятые на границе со здоровыми, экссудат, гной, отделяемое ран, кровь. От трупов берут отделяемое ран, кусочки измененных мышц, кровь из сердца, кусочки селезенки и печени.

Кусочки тканей и взятый тампоном материал из глубины раны сразу погружают в транспортную питательную среду (например, тиогликолевую). Гной можно пересылать в пробирке или шприце. Для приготовления и микроскопии мазков используют отдельные тампоны, которые помещают в стерильные сухие пробирки (если нет возможности сразу приготовить мазки). Кровь (5-10 мл) берут из локтевой вены при строгом соблюдении правил асептики и сразу вносят в 50-100 мл среды накопления. Отобранный материал доставляют в лабораторию в течение 1 ч.

Ботулизм. Ботулизм – острая пищевая интоксикация, протекающая с преимущественным поражением центральной и вегетативной нервной системы. Реже встречается ботулизм, связанный с вегетацией возбудителя – Clostridium botulinum – в ране или кишечнике детей и взрослых. Ботулинический токсин относят к самым сильным биологическим ядам (особо опасный патогенный биологический агент).

Исследование материала ведут одновременно в двух направлениях – обнаружение ботулинического токсина (2/3 пробы) и выделение возбудителя (1/3 пробы). Кровь исследуют только на наличие токсина, кал – только на наличие возбудителя.

Обнаружение токсина и определение его типа с помощью реакции нейтрализации имеет особое значение для выбора антитоксической сыворотки – единственного средства специфической терапии и экстренной профилактики ботулизма.

Важную роль в диагностике ботулизма играют эпидемиологические данные и характерные клинические проявления (паралитический синдром). Отрицательные результаты лабораторных исследований не исключают диагноз ботулизма.

Столбняк – острая инфекционная болезнь, вызываемая Clostridium tetani (бактериями 3-й группы патогенности) и сопровождающаяся интоксикацией, тоническими и клоническими сокращениями мышц. Клиническая картина столбняка настолько типична, что, как правило, бактериологическое исследование с целью диагностики заболевания является излишним. Для обнаружения возбудителя столбняка обычно исследуют перевязочный и шовный хирургический материал, а также различные препараты, предназначенные для парентерального введения, чтобы проверить правильность стерилизации; иногда исследуют воздух, пыль и другие объекты внешней среды.

В случаях неясного течения болезни исследуют гной, кровь, кусочки ткани, вырезанные из раны, после родов или аборта – выделения из матки, при аутопсии – кусочки печени, селезенки, кровь. Из тканей, густого гноя готовят взвеси в физиологическом растворе. Вату, марлю, шовный материал разрезают ножницами и помещают в питательные среды.

Обнаружение в мазках из материала, взятого от больного или трупа, тонких длинных грамположительных палочек с круглыми терминально расположенными спорами, вызывает подозрение на наличие С. tetani. Однако на основании бактериоскопии нельзя делать заключение о присутствии столбнячных клостридий, так как в материале споры могут отсутствовать и могут находиться морфологически сходные с С. tetani микроорганизмы. Исследуемый материал засевают на среды накопления выдерживают в анаэробных условиях в термостате.

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1.Указать систематическое положение клостридии газовой гангрены, столбняка, ботулизма

2. Дать морфолого-биологическую характеристику указанных выше возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

3. Знать факторы патогенности этих возбудителей и особенности патогенеза вызываемых ими заболеваний.

4. Знать особенности формирование иммунитета, особенности профилактики при данных инфекциях.

5. Уметь провести лабораторную диагностику инфекций, вызванных этими возбудителями.

6. Знать особенности экологии и эпидемиологии.

*Задания*

1.Провести бактериоскопическое исследование демонстрационных мазков, приготовленных из патологического материала окрашенных по Граму. Сделать заключение и наметить план дальнейшего анализа.

2. Учесть результаты готовых посевов патологического материала на питательные среды: тиогликолевую, Китта-Тороцци, железосульфитный агар (среда Вильсона-Блера) и молоко.

3. Учесть результаты готовых посевов патологического материала на питательные среды, культивируемых в анаэробоксах: 5% кровяной агар и среду Цейсслера.

4. Приготовить мазки из посевов на средах: тиогликолевой, Китта-Тароцци, Цейсслера, кровяном агаре. Окрасить по Граму.

4. При наличии в мазках грамположительных спорообразующих палочек сделать предварительное заключение и наметить ход дальнейшего анализа.

5. Учесть результаты готовых посевов чистых культур на основании дифференциальных признаков.

**Раздел 3.1. Медицинская вирусология.**

## Лабораторная работа 7. Вирусологическое исследование. Работа с клеточными культурами. Взятие и подготовка материала для вирусологической диагностики. Выявление (индикация) и идентификация вирусов.

Как известно, вирусы являются генетическими внутриклеточными паразитами, способными к размножению только в живых системах. Следовательно, первым этапом вирусологической диагностики является получение и подготовка одной из живых систем: культур клеток, куриных эмбрионов или чувствительных лабораторных животных. Наиболее трудоемкой является работа с клеточными культурами. На практике используют первичные, полуперевиваемые (диплоидные) и перевиваемые клеточные культуры.

Первичные клеточные культуры. Эти культуры получают непосредственно из ткани животного или человека путем разрушения протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа, проназа) межклеточного вещества. Разобщенные (диспергированные) клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя так называемый монослой –слой толщиной в одну клетку.

В большинстве случаев перед обнаружением вируса в живой системе его следует освободить от компонентов клеток хозяина. Для этого предусмотрены следующие процедуры.

1. Для разрушения клеток в материале используют трехкратное замораживание с последующим оттаиванием или растирание материала в гомогенизаторе со стерильным песком или стеклянными бусами.
2. Для очистки от клеточного детрита и посторонних примесей полученный таким образом материал подвергают центрифугированию с последующим исследованием надосадочной жидкости или пропускают через бактериальные фильтры. При этом вирус ввиду малых размеров не осаждается при центрифугировании и не задерживается бактериальными фильтрами, оставаясь в жидкости.
3. Полученный материал обрабатывают антибиотиками (500-1000 ЕД/мл пенициллина и 200 ЕД/мл стрептомицина) для деконтаминации и предотвращения бактериального загрязнения.

Полученный таким образом материал принято называть вируссодержащим материалом.

Выявление (индикацию) вирусов проводят, исследуя воздействие их на живые системы. Например, по цитопатическому действию (ЦПД). ЦПД представляет собой дегенеративные изменения в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов. Одни вирусы проявляют ЦПД в первые дни после заражения культур клеток (вирус оспы, полиомиелита и др.), другие — значительно позже, иногда спустя 1-2 недели после заражения (аденовирусы, вирусы парагриппа и др.). Характер ЦПД зависит в основном от вида вируса. Различают полную и частичную дегенерацию клеток монослоя.

По реакции гемадсорбции (РГадс*).* Эта реакция позволяет выявить вирусы до развития ЦПД благодаря адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, инфицированных гемадсорбирующими вирусами. Эти сложные вирусы имеют в составе суперкапсида специфические гликопротеиды – гемагглютинины (например, орто- и парамиксовирусы).

По цветной пробе. Принцип данного теста заключается в следующем. В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты. В результате цвет входящего в состав среды индикатора (фенолового красного) становится оранжевым. При заражении культуры клеток такими цитопатогенными вирусами, как энтеровирусы или реовирусы, метаболизм клеток подавляется, рН среды и ее цвет не изменяются (она остается красной).

По внутриклеточным включениям. Внутриклеточные включения образуются при репродукции некоторых вирусов в цитоплазме и ядре клеток (оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др.). Они представляют собой участки локализации вирусов и их компонентов в клетках. Включения обнаруживают при микроскопии после окраски монослоя по Романовскому-Гимзе или другими сложными методами, а также при люминесцентной микроскопии после обработки акридиновым оранжевым.

Электронно-микроскопическое выявление (ЭМВ).Это исследование дает возможность в зависимости от вида вируса выявить в клетках отдельные вирионы и их кристаллоподобные скопления в ядре или цитоплазме. ЭМВ, как правило, используется для обнаружения возбудителей вирусных инфекций с типичной морфологией (оспенные вирусы), особенно в тех случаях, когда их не удается культивировать обычными методами (вирусы гепатитов А и В, ротавирусы). Использование специфических антител положено в основу метода иммунной электронной микроскопии (ИЭМ).

По образованию бляшек. Бляшки вирусов представляют собой очаги разрушенных вирусом клеток монослоя под агаровым или бентонитовымпокрытием. Вирусные бляшки подсчитывают для количественного анализа инфекционной активности вирусов.

Очаги клеточной дегенерации (бляшки) выявляют путем окрашивания культуры нейтральным красным, который либо включают в состав агарового покрытия, либо добавляют непосредственно перед учетом результатов. Бляшки состоят из погибших клеток, не окрашиваются нейтральным красным и поэтому выглядят в виде светлых пятен на фоне розово-красного монослоя.

Идентификацию вирусов проводят по следующим признакам:

1.Вирусиндуцированным патологическим изменениям в чувствительных живых системах

2.Антигенным свойствам вирусов в серологических реакциях с противовирусными видовыми и типовыми сыворотками (является основной и достаточно точной идентификацией).

3.Выявлению вирусной НК.

4.Результатам электронно-микроскопического изучения морфологии вирусов.

Идентификация по антигенной структуре. Реакция нейтрализации. Наиболее чувствительным вариантом реакции нейтрализации (РН) является подавление вирусного бляшкообразования под действием вирусспецифической антисыворотки (реакция редукции вирусных бляшек). Соответствие вируса антителам сыворотки проявляется подавлением бляшкообразования (в сравнении с контролем). РН позволяет определить видовую и типовую (вариантную) принадлежность вируса.

Одним из вариантов РН является цветная проба (колориметрическая реакция нейтрализации). При положительном результате противовирусные антитела блокируют размножение вируса в культуре клеток, и под действием кислых метаболитов последних в среде меняется цвет индикатора. Результаты реакции учитывают колориметрически: рН 7,4 и выше указывает на репродукцию вируса, 7,2 и ниже – на нейтрализацию вируса антителами.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)*.* Эта реакция основана на блокировании вирусных гемагглютининов специфическими антителами. Ее можно рассматривать как частный случай реакции нейтрализации. РТГА может быть использована как для серологической диагностики, так и для идентификации гемагглютинирующих вирусов. Феномен РТГА проявляется в образовании компактного осадка эритроцитов вместо «зонтика» гемагглютинации. Реакцию проводят на полистироловых пластинах и оценивают по отсутствию склеивания эритроцитов, добавленных к смеси вируса и специфической сыворотки. Титром сыворотки считают ее наибольшее разведение, которое «тормозит» гемагтлютинацию. Для РТГА широко применяется также микрометод с использованием микропланшетов и делютеров Такачи (для разведения материала).

Реакция торможения гемадсорбции (РТГадс)*.* Данная реакция основана на нейтрализации эффекта адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, инфицированных вирусами. РТГадс используется для идентификации гемадсорбирующих вирусов. О видовой принадлежности вируса судят по отсутствию адсорбции эритроцитов в опыте при типичной гемадсорбции в контрольных пробирках.

Для антигенной идентификации вирусов в клеточных культурах используют серологические реакции со специфическими иммунными противовирусными сыворотками или моноклональными антителами.

*Опрос по теме занятия.*

1.Знать живые системы, которые используются для культивирования вирусов.

2. Объяснить с какой целью используются в вирусологии питательные среды.

3. Указать способы забора исследуемого материала и его подготовку к проведению вирусологической диагностики.

4. Знать методы индикации вирусов.

5. Методы идентификации вирусов.

*Задания*

1.Провести вирусоскопическое исследование демонстрационных мазков, приготовленных из патологического материала для обнаружения цитопатического действия, гемадсорбции, внутриклеточных включений. Сделать заключение.

2. Учесть результаты готовой цветной пробы. Сделать заключение.

3. Учесть результаты готовых реакций нейтрализации, торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа (ИФА). Сделать заключение.

**Раздел 2.3. Дрожжевые и мицелиальные грибы – возбудители микозов человека**

## Лабораторная работа 8. Микробиологическая диагностика микозов

В последние годы грибы, как возбудители заболеваний, приобретают все больший удельный вес в структуре болезней. Оппортунистические микозы стали одной из актуальных проблем здравоохранения, т.к. являются частыми осложнениями многих заболеваний, входящих в компетенцию врачей различных специальностей: онкологов, инфекционистов, терапевтов, педиатров, фтизиатров, пульмонологов, гинекологов, урологов, хирургов, дерматологов, эндокринологов и т.д.

В настоящее время изучено более 100 000 видов грибов, представленных шляпочными грибами, трутовиками, так и микроскопическими формами, которые составляют преобладающее большинство. Около 400 видов грибов обладают способностью инфицировать человека и животных. Однако статус постоянных возбудителей заболеваний имеют около 100 видов. Лишь немногие из них особо опасны: Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis. Эти виды, эндемичные для стран Северной и Южной Америки, могут поражать практически здоровых людей, вызывая тяжелейшие формы заболеваний.

Основная масса грибов относится к условно патогенным (оппортунистическим) возбудителям. Являясь составной частью окружающей среды, обитая в почве, воде, воздухе, помещениях, на растениях, продуктах питания, либо на коже и слизистых оболочках человека, некоторые безвредные сапрофиты, контактируя с организмом в условиях сниженного иммунитета и/или при наличии других отягощающих факторов, приобретают патогенные свойства, становясь паразитами.

Возрастание случаев грибковых инфекций среди населения связано с несколькими причинами. Ухудшение экологических условий снижает антиинфекционную резистентность человека, что приводит к нарушению баланса между нормальной флорой и иммунным ответом организма и как следствие, к резкой активации условно-патогенных грибов. Кроме того, при этом расширяется спектр возбудителей, вызывающих поражение кожи и внутренних органов. Нерациональное использование антибиотиков, цитостатиков, гормональных препаратов, лучевой и химиотерапии в борьбе с основным заболеванием также приводит к снижению иммунитета, селекции устойчивых штаммов микроорганизмов и развитию грибковых осложнений. Частая внутривенная и внутриартериальная катетеризация, парентеральное питание, проведение искусственной вентиляции легких, гемодиализ, трансплантация органов, кандиданосительство медперсонала и т.д. увеличивают риск инфицирования внутрибольничными штаммами грибов. Учащающиеся случаи самолечения, антисанитарные условия жизни, тяжелые хронические заболевания являются предрасполагающими факторами к развитию поверхностных и глубоких микозов.

Поверхностные микозы приобретают чрезвычайную актуальность в связи с высокой заболеваемостью (от 5 до 20%) населения земного шара. Поражения кожи, ногтей и волос обусловлены дерматофитами, плесневыми и дрожжеподобными грибами. Дерматофиты включают три рода кератинофильных возбудителей: Microsporum, Trichophyton и Epidermophyton. Около 28 видов вызывают поражения кожи, волос и ногтей, 14 из которых встречаются наиболее часто. Местообитанием зоофильных дерматофитов (T.mentagrophytes, T.verrucosum, M.canis и др.) являются животные, а антропофильных дерматофитов (T.rubrum, T.interdigitale, M.audouinii, E.floccosum и др.) – человек; геофильные виды, например Microsporum gypseum, обитают в почве. Дерматофиты могут передаваться человеку от человека, животных или из почвы, вызывая заболевание.

Плесневые и дрожжеподобные грибы считались сапрофитами или контаминантами и не включались в число возбудителей грибковых инфекций кожи и ногтей. В настоящее время не существует единого мнения о недерматофитной этиологии онихомикозов или дерматомикозов, однако, в литературе публикуется все больше данных о том, что недерматофиты могут быть основной или даже единственной причиной грибкового поражения ногтей и кожи. Наиболее часто этиологическими агентами поверхностных микозов являются виды родов Candida, Rhodotorula, Scopulariopsis, Aspergillus, Penicillium, Acremonium, Cladosporium и др.

Системные микозы (кандидоз, аспергиллез, геотрихоз, зигомикоз, криптококкоз и др.), как правило, встречаются в группах риска: у больных с эндокринными нарушениями, туберкулезом, бронхиальной астмой, хроническими процессами в легких, онкологическими и гематологическими заболеваниями, СПИДом и т.д. В 90% случаев у пациентов диагностируется кандидоз. На второе место по частоте встречаемости выходят различные формы аспергиллеза. Наиболее распространенными возбудителями заболевания являются A.fumigatus, A. niger, A. flavus и A.terreus. Возрастают случаи выявления «редких» возбудителей, зигомицетов с характерным широким несептированным мицелием – Absidia, Mucor, Rhizopus и др., а также гифомицетов – Penicillium, Acremonium, Cladosporium и др.

Некоторые глубокие микозы возникают и у здоровых иммунокомпетентных людей, когда при травмах и повреждениях кожных покровов возбудители споротрихоза, хромомикоза и мицетомы из окружающей среды, почвы, предметов быта и др. проникают через кожу в подкожную клетчатку, лимфатическую систему и при отсутствии соответствующего лечения могут привести к инвалидизации больного.

Установление грибковой этиологии заболевания на ранних стадиях развития и адекватное этиопатогенетическое лечение помогут ускорить выздоровление, избежать инвалидизации, а иногда и смерти больного. При этом, за счет уменьшения длительности лечения значительно сокращаются затраты на лекарственные препараты и медицинское обслуживание в поликлинике и в стационаре, что важно в социальном и экономическом плане.

Для диагностики микозов применяются микроскопические (в том числе гистологические), микологические (культуральные), аллергические, серологические, экспериментальные, молекулярно-биологические и другие методы исследования. Ввиду морфологического многообразия грибов, а также их медленного роста ведущее значение в диагностике микозов имеют морфологические методы обнаружения и идентификации возбудителя. В зависимости от клинических проявлений болезни исследуемым материалом служат: пораженные волосы, чешуйки кожи, кусочки ногтей, кожные и ногтевые скарификаты, гной, мокрота, пунктаты лимфатических узлов, костного мозга, внутренних органов, кровь, спинномозговая жидкость, желудочный сок, желчь, испражнения, кусочки тканей, полученные при биопсии или аутопсии, и др. Материал берут по возможности из очага инфекции при соблюдении правил асептики эпиляционным пинцетом, скальпелем, препаровальной иглой, лезвием бритвы, ножницами, ложечкой Фолькмана, пастеровской пипеткой и др. Тампонами материал стараются не брать. Чтобы лучше рассмотреть пораженный участок, можно пользоваться лупой, у больных микроспорией – люминесцентной лампой, в лучах которой пораженные волосы имеют изумрудно-зеленое свечение. При подозрении на поражение дерматофитами ногти обрабатывают 70%-м этанолом для инактивации и удаления наружной (сопутствующей) микрофлоры, состригают и в сухом контейнере доставляют в лабораторию. Патологический материал следует брать в количестве, достаточном для микроскопического изучения в неокрашенном и окрашенном виде, для посева на питательные среды или заражения экспериментальных животных, а также проведения других исследований. Как правило, параллельно с микологическим проводится бактериологическое исследование патологического материала.

При необходимости транспортировки материала в лабораторию его помещают в стерильные пробирки, контейнеры, между предметными стеклами и др., указав в направлении паспортные данные больного, локализацию поражения, дату взятия материала, диагноз. Несмотря на то что многие возбудители микозов устойчивы во внешней среде, материал рекомендуется держать во влажной атмосфере в присутствии кислорода и доставлять в лабораторию в течение 2 ч, особенно в случае контаминации материала бактериями. С возбудителями гистоплазмоза, кокцидиоидоза и других особо опасных микозов работают в специально оборудованных лабораториях с соблюдением специальных правил, позволяющих предотвратить лабораторное заражение и распространение инфекции.

При микроскопическом исследовании изучают неокрашенный (нативный) и окрашенный материал. Как правило, параллельно с микологическим проводится бактериологическое исследование патологического материала.

При необходимости транспортировки материала в лабораторию его помещают в стерильные пробирки, контейнеры, между предметными стеклами и др., указав в направлении паспортные данные больного, локализацию поражения, дату взятия материала, диагноз. Несмотря на то, что многие возбудители микозов устойчивы во внешней среде, материал рекомендуется держать во влажной атмосфере в присутствии кислорода и доставлять в лабораторию в течение 2 ч, особенно в случае контаминации материала бактериями. С возбудителями гистоплазмоза, кокцидиоидоза и других особо опасных микозов работают в специально оборудованных лабораториях с соблюдением специальных правил, позволяющих предотвратить лабораторное заражение и распространение инфекции.

При микроскопии нативных препаратов можно определить характерное расположение спор гриба в пораженных волосах, мицелия в чешуйках кожи и соскобах с ногтей, что позволяет лаборатории дать предварительное заключение. Окончательное заключение о видовой принадлежности гриба дают только после микологического исследования материала.

Окрашенные препараты готовят, как правило, из материала, имеющего вязкую или жидкую консистенцию. В окрашенном материале легче выявить элементы гриба, чем в нативных препаратах. Чаще всего используют следующие методы окраски: по Граму, Романовскому-Гимзе, по Гомори (метенаминовым серебром), по Мак-Манусу (периодной кислотой и реактивом Шиффа), Цилю-Нильсену, Граму-Вельшу, Райту, Лейшману, лактофенолом, лактофуксином, по Аравийскому. Для окраски дерматофитов применяют методы Сабуро, Адамсона, Хоммершмидта, Берка и др.

Для экспресс-диагностики используют специальные методы окраски, так как окраска по Романовскому-Гимзе или по Граму не всегда позволяет выявить в материале клетки грибов. При необходимости применяют люминесцирующие иммунные сыворотки (РИФ).

Клетки грибов, как правило, грамположительны. Окраска по Граму помогает выявить сопутствующие бактериальные клетки и обнаружить капсулу у криптококков. Тушевая (негативная) окраска по Бурри позволяет выявить инкапсулированные клетки Cryptococcus neoformans в препаратах ликвора при криптококковом менингите. Окраска по Романовскому-Гимзе используется для обнаружения в мокроте трофозоитов Pneumocystis carinii, в крови или костном мозге (как и окраска по Райту) – дрожжевую форму возбудителя гистоплазмоза. Для выявления кислотоустойчивых грибов применяют метод окраски по Цилю-Нильсену или модифицированный метод Хенкса.

Микологическое (культуральное) исследование направлено на выделение чистой культуры гриба и ее идентификацию. Посевы производят на плотные и жидкие, неселективные и селективные питательные среды: Сабуро, сусло-агар, Чапека, кукурузный, рисовый, картофельный агар, Френсиса, Полаччи и др. Грибы хорошо растут также на некоторых средах для бактерий – кровяном, шоколадном, сердечно-мозговом агаре, угольно-дрожжевой среде. Их, как и картофельный агар с глюкозой, используют для выделения грибов из «стерильных» материалов (крови, ликвора, биоптатов и т.п.) и инкубирование ведут более длительное время. Для приготовления селективных сред к неселективным добавляют антибиотики (левомицетин – 20-50, стрептомицин – 40, пенициллин – 20 мкг/мл и др.), а также красители (бенгальский розовый и др.) или дезинфектанты. Так, для выделения грибов из контаминированных бактериями материалов используют агар Сабуро с глюкозой, в который добавляют пенициллин и гентамицин или гентамицин и хлорамфеникол.

Для первичной дифференциации грибов используют хромогенный агар CHROM. В его составе имеются хромогенные субстраты, которые при действии на них того или иного фермента грибов расщепляются с образованием окрашенных соединений. В результате этого колонии различных грибов на агаре CHROM отличаются по цвету: белые, кремовые, желтые, коричневые, черные, розовые, красные и т.д.

Серологическое исследование. Реакции агглютинации, преципитации, связывания комплемента, непрямой гемагглютинации, ИФА, иммуноблотинг или иммунофлюоресценции проводят с антигенами из грибов.

Аллергологическое исследование. Аллергические пробы ставят путем внутрикожного введения соответствующих аллергенов (взвеси из убитых грибов, фильтратов культур, полисахаридных и белковых фракций из клеток или клеточных оболочек возбудителей). Результаты учитывают по пятибалльной системе через 20 мин (немедленные) и через 24-48 ч (замедленные реакции).

Кроме того, для выявления микотической сенсибилизации организма применяют иммунологические тесты in vitro: дегрануляции базофилов (крови и тканевых), другие тесты гиперчувствительности немедленного типа, а при гиперчувствительности замедленного типа – реакцию торможения миграции фагоцитов, бластной трансформации лимфоцитов.

Гистологическое исследование. Этот метод позволяет обнаружить гриб в тканях, изучить его морфологию и особенности патологического процесса, вызванного им в организме. Материалом для исследования служат ткани, полученные при биопсии и аутопсии.

ПЦР. Разработаны тест-системы для ПЦР, позволяющие выявлять до 40 видов грибов, включая все клинически важные виды. Например, тест-системы для выявления ДНК Candida albicans позволяют обнаружить 10-100 клеток возбудителя на 100 мкл биологического материала. С помощью геномной дактилоскопии ДНК в ПЦР проводят также типирование штаммов С. albicans.

Для выявления в клиническом материале Т. rubrum и С. neoformans предложены прямые ПЦР-зонды. Определенные сложности при использовании ПЦР в клинике связаны с ложноположительными реакциями, обусловленными временным присутствием плесневых грибов (чаще аспергиллов) в респираторном тракте. Значительно более надежные результаты при аспергиллезной инфекции получены в ПЦР с сывороткой или плазмой крови. Для быстрого выявления различных видов Aspergillus в крови и бронхиальном секрете предложен новый высокочувствительный вариант двухступенчатой ПЦР с двумя парами «гнездовых» праймеров. Его также применяют для идентификации и дифференциации штаммов возбудителей паракокцидиоидомикоза (Paracoccidioides brasiliensis) и гистоплазмоза (Histoplasma capsulatum).

*Опрос по теме занятия.*

*Контрольные вопросы.*

1.Указать микроскопические методы исследования при диагностике микозов.

2. Указать микробиологические методы исследования при диагностике микозов

3. Указать серологические методы исследования при диагностике микозов

*Задания*

1.Провести микроскопическое исследование демонстрационных мазков, приготовленных из патологического материала для подтверждения клинического диагноза «микоз». Сделать заключение.

2. Учесть результаты готовых посевов патологического материала на питательную среду Сабуро.

3. Приготовить мазки из выросших колоний и окрасить по Граму.

4. При наличие в мазках дрожжевых клеток составить план исследования.

5. Учесть результаты готовых посевов чистых культур на голодный агар.

6. Учесть результаты готовых посевов чистых культур на хромогенную среду. Отметить характер роста культуры на этой среде.

7. Оценить рост на средах «пестрого ряда».

8. Учесть и оценить результаты чувствительности к антимикотикам с выделенной культурой дрожжевых грибов.

# БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

**Основная литература**

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : в 2 томах : учебник. Том 1/ под ред.: В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 447 с. – 2 экз.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : в 2 томах : учебник. Том 2/ под ред.: В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 447 с. + Прилож.: 1 электрон. опт. диск (CD-ROM) – 2 экз.
3. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / О. К. Поздеев ; под ред. В. И. Покровский. - Изд. 4-е. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 765 с. – 10 экз.
4. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М. : БИНОМ, 2008. – 1080 с. – 1 экз. (на базовой кафедре биотехнологии)

**Дополнительная литература**

1. Алешукина, А. В. Медицинская микробиология: учебное пособие / А. В. Алешукина. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2003. - 473 с. – 10 экз.
2. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник для вузов / Л. Б. Борисов. - 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Медицинское информационное агентство, 2005. - 734 с. – 7 экз.
3. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков . – М. : Академия, 2003. - 462 с. – 3 экз.
4. Определение микроэкологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии. Струкова Е.Г., Ефремов А.А., Гонтова А.А., Осипов Г.А., Сарматова Н.И. // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2009. – 2 (4) <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/1657>
5. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебник для медицинских вузов / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского. – М. : Гэотар-Медиа, 2002 . - 765 с. – 5 экз.
6. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т. 1. / пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. – 656 с. – 1 экз. (на базовой кафедре биотехнологии)
7. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т. 2. / пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. – 496 с. – 1 экз. (на базовой кафедре биотехнологии)

**Электронные ресурсы**

1. [Данилова, Л. А.](http://www.biblioclub.ru/book/104898/) Биохимия полости рта. Учебное пособие. / Л. А. Данилова, Н. А. Чайка. - СПб: СпецЛит, 2012. - 67 с.
2. [Волина, Е. Г.](http://www.biblioclub.ru/book/115725/) Основы частной микробиологии. Учебное пособие. / Е. Г. Волина, Л. Е. Саруханова. - М.: Российский университет дружбы народов, 2011. - 191 с.
3. [Саруханова, Л. Е.](http://www.biblioclub.ru/book/115799/) Основы общей микробиологии и иммунологии. Конспект лекций. / Л. Е. Саруханова, Е. Г. Волина. - М.: Российский университет дружбы народов, 2009. - 100 с.
4. Журнал Вестник Российской Академии Медицинских Наук <http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7654>
5. Журнал Молекулярная генетика, микробиология и вирусология <http://elibrary.ru/title_about.asp?id=7904>
6. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии <http://www.jmicrobiol.com/>
7. Журнал Проблемы медицинской микологии <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/jornals.html>

Учебное издание

Сарматова Наталья Ивановна

**Избранные главы медицинской микробиологии.**

**Методические указания к лабораторным занятиям**

Редактор И.О. Фамилия

Корректор И.О.Фамилия

Компьютерная верстка: И.О.Фамилия

Подписано в печать (дата) 2011 г. Формат 60х84/16. (А5)

Бумага офсетная. Печать плоская.

Усл. печ. л. … (количество страниц/…). Уч.-изд. л. ? ?.

Тираж 100 экз. Заказ ????. (Дает РИО)

Редакционно-издательский отдел

Библиотечно-издательского комплекса

Сибирского федерального университета

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

Тел/факс (391) 244-82-31. E-mail rio@sfu-kras.ru

<http://rio.sfu-kras.ru>

Отпечатано Полиграфическим центром

Библиотечно-издательского комплекса

Сибирского федерального университета

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 82а