

# Микробиология.

## БЛОК 1

1. Бактериоскопический метод диагностики. Достоинства метода.
2. Бактериоскопический метод диагностики. Недостатки метода.
3. Жгутики. Строение, функции, методы выявления.
4. Заслуги отечественных ученых в развитии микробиологии.
5. Иммерсионный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения.
6. Капсула. Строение, функции, методы выявления.
7. Кислотоустойчивые бактерии: особенности строения и методы выявления.
8. Клеточная стенка, особенности строения и методы выявления.
9. Люминесцентный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения.
10. Морфологические и тинкториальные свойства бактерий. Методы изучения.
11. Окраска по Граму. Техника и принцип метода. КОН-тест. Принцип метода и его практическое значение.
12. Основные группы микроорганизмов. Значение в патологии человека.
13. Предмет и задачи медицинской микробиологии.
14. Принципы классификации микроорганизмов. Понятие о виде и штамме.
15. Световой микроскоп. Показатели качества: разрешающая способность, увеличение.
16. Спора. Строение, функция, методы выявления.
17. Темнопольный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения.
18. Фазово-контрастный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения.
19. Этапы развития микробиологии. Работы основоположников микробиологии.

## БЛОК 2

1. Бактериологический метод диагностики. Достоинства и недостатки.
2. Бактериологический метод диагностики. Основные этапы.
3. Биохимические свойства бактерий. Механизмы изучения.
4. Влияние физических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов.
5. Влияние химических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов.
6. Классификация питательных сред. Особенности состава и применения.
7. Культивирование. Рост и размножение бактерий на жидких питательных средах.
8. Культуральные свойства. Колония и ее характеристики.
9. Метаболизм бактерий. Катаболизм, анаболизм.
10. Методы контроля режима стерилизации. Контроль стерильности.
11. Методы культивирования бактерий. Непрерывное и периодическое
12. Методы культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов.
13. Основные группы дезинфектантов. Механизмы действия.
14. Паровой и воздушный методы стерилизации. Режимы, области применения.
15. Питательные среды. Классификация.
16. Способы получения энергии бактериями. Мембранное и субстратное фосфорилирование.
17. Стерилизация. Методы стерилизации, используемые в медицине и
18. Чистая культура. Методы выделения чистой культуры бактерий
19. Экзо- и эндоферменты, адаптивные и конститутивные ферменты.

## БЛОК 3

1. Антибиотики. Механизм действия на бактериальную клетку.
2. Антимикробные препараты. Классификация. Требования, предъявляемые к препаратам.
3. Бактериофаги. Строение. Этапы и исходы взаимодействия вирулентных фагов с клеткой.
4. Бактериофаги. Этапы и исходы взаимодействия умеренных фагов с клеткой.
5. Генетические рекомбинации.
6. ПЦР. Достоинства и недостатки метода.
7. Геном бактерии. Особенности организации и функционирования нуклеотида.
8. Плазмиды бактерий. Строение. Функции.
9. Изменчивость микроорганизмов, ее формы и практическое значение.
10. Лекарственная устойчивость бактерий. Предупреждение формирования и преодоление резистентности. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Биохимические механизмы резистентности.
12. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Генетические механизмы резистентности
13. Методы внутривидового типирования и его значение.
14. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Их достоинства и недостатки.
15. Мутации. Классификация. Роль в изменчивости бактерий.
16. Осложнения и побочные эффекты антибиотикотерапии.
17. Применение бактериофагов в медицине и микробиологии.
18. Формы, биологическое значение, выявление антагонизма у микробов.
19. Биопленки. Строение. Роль в медицине.

## **Практические навыки**

1. Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам.
2. Желточно-солевой агар.
3. Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.
4. Метод серийных разведений в плотной питательной среде.
5. Молоко по Тукаеву.
6. Сахарно-кровяной агар Цейслера.
7. Селенитовый бульон.
8. Солевой агар.
9. Солевой бульон.
10. Среда Вильсона-Блер.
11. Среда Китт-Тароцци.
12. Среда Плоскирева.
13. Среда Эндо.
14. Среды «пестрого ряда»
15. Тиогликолевая среда (СКС).
16. Фаготипирование.

# 1. Бактериоскопический метод диагностики. Достоинства метода

**Бактериоскопический метод** – метод диагностики инфекционных заболеваний.

## **Основан на:**

- выявлении в исследуемом материале возбудителя
- идентификации возбудителя по морфологическим и тинкториальным свойствам.

## **Достоинства бактериоскопического метода**

- простота исполнения
- быстрое получение результатов
- техническая и экономическая доступность.

## **Техника выполнения**

- Материал от больного визуально изучается, выбирается порция, в которой с наибольшей долей вероятности может быть обнаружен возбудитель заболевания (комочки слизи, гнойные пробки).
- Он наносится на предметное стекло (иногда материал предварительно эмульгируется в физиологическом растворе, реже подвергается центрифугированию).
- Капля распределяется по стеклу, высушивается и фиксируется.
- После этого мазок окрашивается, и препарат просматривается под микроскопом. Обычно мазок окрашивается по Грамму.
- Иногда, как наиболее щадящий, применяется один из простых методов окраски, тогда препарат красится одним красителем (например, при диагностике менингококковой инфекции, холеры).

## **2. Бактериоскопический метод диагностики. Недостатки метода**

### ***Бактериоскопический метод*** –

метод диагностики инфекционных заболеваний.

### ***Основан на:***

- выявлении в исследуемом материале возбудителя
- идентификации возбудителя по морфологическим и тинкториальным свойствам.

### ***Недостатки метода***

- Малая информативность
- Морфологических и тинкториальных свойств недостаточно для идентификации подавляющего большинства возбудителей
- Нет возможности определить чувствительность возбудителя к антимикробным препаратам
- Нет возможности выявить источник инфекции, пути и факторы передачи возбудителя
- Низкая чувствительность
- Возбудителя в исследуемом материале должно быть много. Если возбудитель не обнаружен - это не значит, что его нет
- Субъективность

***Результат зависит от уровня подготовки врача-микроскописта.***

### ***Техника выполнения***

- Материал от больного визуально изучается, выбирается порция, в которой с наибольшей долей вероятности может быть обнаружен возбудитель заболевания (комочки слизи, гнойные пробки).
- Он наносится на предметное стекло (иногда материал предварительно эмульгируется в физиологическом растворе, реже подвергается центрифугированию).
- Капля распределяется по стеклу, высушивается и фиксируется.
- После этого мазок окрашивается, и препарат просматривается под микроскопом. Обычно мазок окрашивается по Грамму.
- Иногда, как наиболее щадящий, применяется один из простых методов окраски, тогда препарат красится одним красителем (например, при диагностике менингококковой инфекции, холеры).

### 3. Жгутики. Строение, функции, методы выявления.

**Жгуттик состоит из трех основных частей:**

- Ось с дисками в клеточной стенке и цитоплазматической мембране
- Крюк
- Длинный гибкий жгуттик, состоящий из белка-**флагеллина**

Жгутики обладают вращательным типом движения.

**По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.**

- *Монотрихи* - имеют один полярный жгуттик.
- *Лофотрихи* - имеют полярно расположенный пучок жгутиков.
- *Амфитрихи* - имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.
- *Перитрихи* - имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Бактерии, лишённые жгутиков, называются **атрихами**.

**Функция жгутиков:**

- движение бактериальной клетки
- может служить органом адгезии

**Методы выявления жгутиков**

- Косвенные
- Прямые.

**Косвенно жгутики можно выявить по факту подвижности бактериальных клеток**

**При прямом обнаружении жгутиков их непосредственно наблюдают в микроскоп.**

- метод Морозова основан на обволакивании жгутика тонким слоем солей серебра или ртути. При этом жгуттик, не меняя своей формы, становится чуть толще. Этого достаточно, чтобы структура стала видимой.
- Хорошо жгутики видны при использовании электронного микроскопа.

## 4. Заслуги отечественных ученых в развитии микробиологии

О существовании живых микроорганизмов человечество узнало лишь, после того, как были изобретены оптические приборы.

В XVIII в. русский врач **Д. С. Самойлович (1744—1805)**, работая в районах чумных эпидемий в России, высказал мысль о существовании мельчайшего живого возбудителя этой страшной болезни.

Лишь в XIX в. было установлено, что микроорганизмы являются возбудителями заразных болезней животных и человека. Этот период связан с именами И. И. Мечникова, Л. Пастера, Р. Коха и других ученых.

**И. И. Мечников (1845—1915)**—крупнейший русский ученый, один из основоположников мировой и отечественной микробиологии. И. И. Мечников создал учение о фагоцитозе и его роли в иммунитете и одним из первых разработал учение об антагонизме микробов, которое явилось теоретической основой для получения таких средств, как антибиотики. Он развил учение о причинах старения организма и указал путь к долголетию.

Особую роль в истории отечественной и мировой микробиологии сыграл **Д. И. Ивановский (1864—1920)**. Изучая так называемую мозаичную болезнь листьев табака, он обнаружил микроорганизмы, которые получили название фильтрующихся вирусов. Д. И. Ивановский доказал, что эти микробы невидимы под микроскопом и не растут на обычных питательных средах. Это замечательное открытие явилось началом новой науки — вирусологии.

Большой вклад в развитие микробиологии внес **Л. С. Ценковский (1822—1887)**. Особенно известны его работы «О низших водорослях и инфузориях» и о борьбе с сибирской язвой. Л. С. Ценковский разработал метод изготовления вакцины против сибирской язвы. Эта вакцина с успехом применяется в России в ветеринарной практике до настоящего времени.

Большие заслуги в развитии отечественной микробиологии принадлежат академику **Н. Ф. Гамалея (1859—1949)**. Им была организована в 1886 г. вторая в мире пастеровская станция. Н. Ф. Гамалея выполнил ценные работы по эпидемиологии чумы и некоторым вопросам бактериологии туберкулеза. В советский период Н. Ф. Гамалея подготовил целую плеяду микробиологов. Особенно велики его заслуги в области ликвидации оспы в нашей стране.

**Характерной чертой русских ученых была их готовность к самопожертвованию во имя науки.**

## **5. Иммерсионный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения.**

**Микроскоп** - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения

**В микроскопе выделяют две части:**

1. Оптическую
2. Механическую

**К оптической части относят:**

- **Объектив** - система неравнозначных линз, главная из которых - передняя фронтальная линза, которая увеличивает в 90 раз, но дает искажение - абберации. Поэтому в объективе находится корригирующие линзы.
- **Окуляр** - система увеличивающих линз, которая увеличивает изображение данное объективом. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: x7, x10, x15
- **Конденсер Аббе** - система собирающих линз которые находятся под предметным столиком и служат для концентрации светового потока от зеркала.
- **Зеркало** - служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект.

**Абберации бывают:**

- сферические
- хроматические

**Сферические абберации** возникают за счет того что лучи не пересекаются в одной точке.

**Хроматические абберации** возникают за счет разложения белого света на составные части.

**Механическая часть микроскопа состоит:**

- **Подставка** - это основание микроскопа.
- **Коробка с микрометрическим механизмом**, построенном на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно
- **Тубус** - цилиндр, в который сверху вставляют окуляры
- **Предметный столик** предназначен для расположения на нем препарата.
- **Кронштейн конденсора** подвижно присоединен к коробке микрометрического механизма.

**Иммерсионная система** - оптическая система, в которой пространство между объективом и стеклом заполнено жидкостью.

Применяемая таким образом жидкость называется **иммерсионной**.

**Иммерсионное масло создает оптическую однородную среду между объективом и стеклом.**

**Принцип работы. Сфера применения**

Иммерсионная система применяется для исследования микроорганизмов.

**Преимущество по сравнению с сухой системой:**

- устанавливается однородная среда с одинаковым показателем преломления между объективом и стеклом
- падающие лучи, не подвергаясь преломлению и изменению направления, попадают в объектив
- достигается наилучшее освещение.

## 6. Капсула. Строение, функции, методы выявления.

**Капсула** – диффузный, однородный, слизистый слой, расположенный с наружной стороны клеточной стенки бактерии

### **Состоит из:**

- полисахаридов или
- полипептидов

### **Функции:**

- защитная
- антигенная
- запас веществ
- адгезия

### **Методы выявления:**

#### **Метод окраски по Бурри-Гинсу**

- **Используется для окраски капсульных бактерий.**
- Основан на том, что капсула не воспринимает красители.
- Капсулу выявляют негативным контрастированием фона по Бурри.
- Для этого **черную тушь** смешивают в культуре и высушивают.
- После этого проводят фиксацию в пламени горелки
- Окрашивают тела микробных клеток по Гинсу - **водным фуксином** в течение 1 минуты
- Промывают водой 5-10 секунд.
- **NB!** В результате на темном фоне хорошо видна бесцветная капсула и красные тела микробов

## **7. Кислотоустойчивые бактерии: особенности строения и методы выявления.**

**КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ** — группа бактерий, не теряющих жизнеспособность после воздействия на них разведёнными кислотами и щелочами.

**Стенка кислотоустойчивых бактерий состоит из 3 слоев:**

- Липиды
- Белки
- Полисахариды

**Особенности:**

- Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов.
- Кислотоустойчивые бактерии с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой.
- Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

**Методы выявления:**

**Метод Циля-Нильсена**

- **для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза) от некислотоустойчивых.**
- Мазок окрашивают **карболовым фуксином Циля** (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.
- Обесцвечивают **раствором серной кислоты** (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.
- Промывают водой.
- Докрашивают 3-5 мин **метиленовым синим** (дополнительный краситель).
- **NB!** Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в красный цвет, некислотоустойчивые в синий.

## **8. Клеточная стенка, особенности строения и методы выявления.**

**Клеточная стенка** является обязательным структурным элементом бактериальной клетки

### **Особенности строения:**

- Опорный каркас клеточной стенки бактерий — **пептидогликан (муреин)**
- Остов молекулы пептидогликана — дисахарид
- Его образуют N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота, соединённые через n-гликозидные связи.
- К молекуле N-ацетилмурамовой кислоты присоединяются олигопептиды, образующие боковые цепочки
- Клеточная стенка способна по-разному воспринимать красители; на этом основаны тинкториальные свойства бактерий.
- На поверхности располагаются рецепторы для бактериофагов, бактериоцинов и различных химических веществ.
- Нарушение синтеза компонентов клеточной стенки приводит к гибели бактерии.

### **Функции клеточной стенки:**

- защищает бактерии от внешних воздействий
- придаёт им характерную форму
- поддерживает постоянство внутренней среды
- участвует в делении
- осуществляет транспорт питательных веществ
- выделение метаболитов

В 1884 г. датский биолог Кристиан Грам разработал метод окрашивания, с помощью которого было установлено, что бактерии подразделяются на две естественные группы, что обусловлено различиями в строении их клеточной стенки.

- **Грамположительные бактерии**
  1. бактерии с толстым слоем пептидогликана в клеточной стенке
  2. при окраске по Граму окрашиваются в синий цвет.
- **Грамотрицательные бактерии**
  1. бактерии с тонким слоем пептидогликана в клеточной стенке
  2. при окраске по Граму окрашиваются в красный цвет.

## **Методы выявления:**

### **Метод Грама**

- **для дифференциации бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки.**
- На фиксированный мазок положить кусочек фильтровальной бумаги и нанести с избытком **генцианвиолет** (основной краситель) (1-2 мин)
- Слить краситель
- Промыть препарат водой
- Нанести **раствор Люголя (KI)** (1-2 мин), затем слить его
- Воздействовать на препарат **спиртом** (30-60 сек)
- Промыть препарат водой дистиллированной водой.
- Докрасить **красным фуксином** (дополнительный краситель (1-2 мин)
- Промыть и подсушить препарат

## 9. Люминесцентный микроскоп. Принцип работы. Сфера применения

**Люминесцентный микроскоп** - обычный биологический микроскоп, снабженный двумя светофильтрами.

- один пропускает только возбуждающие сине- или ультрафиолетовые лучи (его помещают перед источником света)
- второй поглощает эти лучи и пропускает только более длинноволновый свет люминесценции препарата (его устанавливают в тубусе или на окуляре микроскопа).

**Источниками света служат** ртутно-кварцевые лампы. Яркое цветное свечение объектов на темном фоне обеспечивает высокий контраст.

### **Принцип работы:**

Основано на способности некоторых клеток и красителей светиться при попадании на них ультрафиолетовых и других коротковолновых лучей света.

Для люминесцентной микроскопии применяются специальные оптические устройства и микроскопы, основной частью которых является источник ультрафиолетовых лучей и система фильтров к нему.

### **Сфера применения:**

- диагностика туберкулеза

### **Достоинства:**

- высокая контрастность
- дает цветное изображение
- позволяет обнаружить живые и погибшие микроорганизмы
- прозрачные и непрозрачные объекты
- установить локализацию бактерий, вирусов и их антигенов в пораженных клетках организма.

### **Недостатки**

- высокая стоимость

### **Различают**

- собственную (первичную) флюоресценцию
- наведенную (вторичную) флюоресценцию

Так как большая часть микроорганизмов не обладает собственной флюоресценцией, они обрабатываются красителями, способными флюоресцировать (вторичная люминесценция).

## 10. Морфологические и тинкториальные свойства бактерий. Методы изучения

### **Морфологические свойства:**

- форма (определяется клеточной стенкой)
- размер
- взаимное расположение клеток (связано с плоскостью их деления)

**Тинкториальные свойства** – восприимчивость микроорганизмов к различным красителям.

### **Для бактерий характерны четыре основные формы:**

- шаровидная
- палочковидная
- извитая
- нитевидная

### **Шаровидные бактерии, или кокки:**

- **Микрококки** (отдельно расположенные клетки)
- **Диплококки** (располагаются парами)
- **Стрептококки** (клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку)
- **Сарцины** (располагаются в виде «пакетов» из 8 и более кокков)
- **Стафилококки** (расположенные в виде грозди винограда в результате деления в разных плоскостях)

### **Палочковидные бактерии:**

- **Монобактерии** (расположены отдельными клетками)
- **Диплобактерии** (расположены по две клетки)
- **Стрептобактерии** (после деления образуют цепочки клеток)

### **Палочковидные бактерии могут образовывать споры:**

- Бациллы
- клостридии.

### **Извитые бактерии:**

- **Вибрионы** (изогнутость тела не превышает одного оборота)
- **Спирохеты** (изгибы тела в один или несколько оборотов)

### **Нитевидные бактерии:**

- **Актиномицеты** (ветвящиеся бактерии)

**Методы изучения:**

- Простые (1 краситель, фуксин)
- Сложные (2 красителя, дифференцирующие вещества, фиксаторы, протравы)

**Методы окраски**

- по Граму (толстая или тонкая стенка)
- Цилю-Нильсену (кислотоуст стенка)
- Ожешко (споры)
- Бурри-Гинсу (капсула)
- Нейссеру (зерна волютина)
- Морозову (жгутики)

**Размер бактерий**

Микроорганизмы измеряются в *микрометрах* и *нанометрах*.  
Средние размеры бактерий – 2 – 3 x 0,3 – 0,8 мкм.

**Форма и размер - важный диагностический признак.**

Способность бактерий изменять свою форму и величину называется **полиморфизм**.

## 11. Окраска по Граму. Техника и принцип метода. КОН-тест. Принцип метода и его практическое значение.

**Метод Грама** — метод окраски микроорганизмов для исследования, позволяющий дифференцировать бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки. Предложен в 1884 году датским врачом Г. К. Грамом.

По Граму бактерии окрашивают анилиновыми красителями — генциановым или метиловым фиолетовым и др., затем краситель фиксируют раствором иода. При последующем промывании окрашенного препарата спиртом те виды бактерий, которые оказываются прочно окрашенными в синий цвет, называют грамположительными бактериями (обозначаются Грам (+)), — в отличие от грамотрицательных (Грамм (-)), которые при промывке обесцвечиваются.

После промывания растворителем при окрашивании по Граму добавляется контрастный красный краситель, который окрашивает все грамотрицательные бактерии в красный или розовый цвет. Это происходит из-за наличия внешней мембраны, препятствующей проникновению красителя внутрь клетки. Тест классифицирует бактерии, разделяя их на две группы относительно строения их клеточной стенки

### **Методика окраски**

- На фиксированный мазок положить кусочек фильтровальной бумаги и нанести с избытком основной краситель (1-2 мин)
- Слить краситель, промыть препарат водой, нанести раствор Люголя. (1-2 мин)
- Слить раствор Люголя, препарат поместить в спирт (или налить спирт на препарат). (30-60 сек)
- Тщательно промыть дистиллированной водой.
- Докрасить одним из дополнительных красителей. (1-2 мин)
- Промыть и подсушить препарат

### **КОН-тест**

с помощью КОН-теста грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода с КОН лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроокиси калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

### **Методика выполнения работы.**

На предметное стекло наносят каплю 3 %-ного водного раствора КОН. Петлей вносят суточную агаровую культуру исследуемых бактерий и тщательно эмульгируют. При положительной реакции, если суспензия в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петлей на 0,5 – 2,0 см и даже дальше, это - грамотрицательные бактерии, если нет – грамположительные бактерии. Учет этой пробы более удобен на черном фоне.

Образование слизистой консистенции после обработки грамотрицательных бактерий КОН обусловлено выходом из их клеток ДНК, являющейся вязким компонентом

## 12. Основные группы микроорганизмов. Значение в патологии человека.

**Микроорганизмы относятся к трем царствам:**

- **Vira** - к ним относятся вирусы;
- **Eucariotae** - к ним относятся простейшие и грибы;
- **Procariotae** - к ним относятся истинные бактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы, спирохеты, актиномицеты.

**Основные отличия прокариот от эукариот состоят в том, что прокариоты не имеют:**

- морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является нуклеоид, или генофор, представляющий собой замкнутую кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране; по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомной бактерией;
- сетчатого аппарата Гольджи;
- эндоплазматической сети;
- митохондрий.

**1. Прокариоты** - организмы, не обладающие оформленным ядром и внутриклеточными мембранными структурами

**1.1 Собственно бактерии** – наиболее обширная группа паразитических и свободно живущих прокариота, обладающих жесткой клеточной стенкой (брюшной тиф; сибирская язва; газовая гангрена)

**1.2 Актиномицеты** – бактерии способные к образованию длинных септированных или несептированных нитей (нитчатые бактерии) (актиномикоз)  
Значение в патологии человека - многие актиномицеты используются в качестве штаммов-продуцентов при производстве антибиотиков и ферментных препаратов)

**1.3 Микоплазмы** – бактерии, не имеющие клеточной стенки (атипичная пневмония; урогенитальный микоплазмоз)

**1.4 Риккетсии** – бактерии, облигатные внутриклеточные паразиты (эпидемический сыпной тиф; клещевой риккетсиоз; пятнистая лихорадка скалистых гор; лихорадка цуцугамуши)

**1.5 Хламидии** – бактерии, облигатные внутриклеточные паразиты. Отличаются от риккетсий сложным циклом внутриклеточного размножения (трахома; хламидийная пневмония)

**1.6 Спирохеты** – спирально извитые микроорганизмы. Отличаются наличием внутриклеточных фибриллярных структур (сифилис ;лептоспироз; боррелиоз Лайма)

**1.7 Цианобактерии** -значительная группа крупных грамотрицательных бактерий, способных к фотосинтезу, сопровождающемуся выделением кислорода

**2. Эукариоты** – организмы, обладающие оформленным ядром и внутриклеточными мембранными структурами

**2.1 Простейшие** – одноклеточные эукариотические животные

**2.2 Низшие грибы** – гетеротрофные одноклеточные и многоклеточные микроорганизмы

**3. Вирусы** – неклеточная форма жизни

### **Значение в патологии человека**

Если бактериальное равновесие нарушается, человеку приходится столкнуться с отрицательными сторонами микробного соседства. Нарушенное равновесие предполагает, что положительные микроорганизмы либо перестали преобладать в сообществе, либо изменились условия их жизни, в результате чего микробы стали опасны.

### **Вредные микробы в кишечнике**

В природе это происходит часто. Изменение температурного режима, появление дополнительных физических или химических факторов – любое из этих событий играет большую роль и может изменить бактериальную картину экосистемы.

Человек – достаточно стабильная экосистема с постоянным температурным режимом, физическими процессами и химической средой. Любое изменение в бактериальном равновесии имеет значение. Это серьезная угроза здоровью человека.

Опасными для человека являются бактерии, провоцирующие и поддерживающие процессы гниения (разложения белков). Три основных вида этих условно болезнетворных микроорганизмов:

- кишечная палочка;
- стафилококки;
- шигеллы.

Эти микробы гниения являются постоянными участниками бактериальных сообществ, населяющих человека, но благодаря преобладанию в этих сообществах полезных молочнокислых бактерий, процессы гниения дезактивируются. Плюс в том, что деятельность условно патогенной микрофлоры в значительной степени тормозится.

Но как только в природе этих взаимоотношений что-то меняется, микробы гниения начинают активную деятельность.

## **13. Предмет и задачи медицинской микробиологии.**

**Микробиология** (греч. micro – малый, bios – жизнь и logos – учение) – наука о мельчайших организмах.

***Среди микроорганизмов различают:***

- эукариоты – грибы и простейшие;
- прокариоты – бактерии, риккетсии, микоплазмы и др.
- вирусы

***Предмет: изучает***

- морфологию
- физиологию (питание, рост, размножение)
- иммунологию
- генетику
- экологию микроорганизмов, имеющих мед. значение.

***Задачи медицинской микробиологии***

- Установление этиологической роли различных микроорганизмов в патологии человека. На этом строится диагностика инфекционных заболеваний.
- Разработка методов диагностики и профилактики инфекционных заболеваний.
- Изучение болезнетворных свойств патогенных микроорганизмов с целью определения клинической и эпидемиологической значимости того или иного микроорганизма.
- Контроль за эффективностью лечебных и профилактических мероприятий.
- Изучение асептики, антисептики, дезинфекции, стерилизации.
- Изучение механизмов распространения микроорганизмов во внешней среде, в основном в питьевой воде, пище, воздухе.
- Изучение вопросов охраны внешней среды.

***Главная задача медицинской микробиологии – ликвидация инфекционных болезней.***

## **14. Принципы классификации микроорганизмов. Понятие о виде и штамме.**

***Микроорганизмы*** систематизированы по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой. Этим занимается специальная наука — систематика микроорганизмов.

***Систематика включает три части:***

- Таксономию
- Классификацию
- Идентификацию.

**В основу таксономии микроорганизмов положены их**

- Морфологические свойства.
- Физиологические свойства.
- Биохимические свойства.
- Молекулярно-биологические свойства.

**Различают следующие таксономические категории:**

- Царство
- Подцарство
- Отдел
- Класс
- Порядок
- Семейство
- Род
- Вид
- Подвид

В рамках той или иной таксономической категории выделяют **таксоны** — группы организмов, объединенные по определенным однородным свойствам.

**Микроорганизмы представлены**

- доклеточными формами (вирусы — царство *Vira*)
- клеточными формами (бактерии, архебактерии, грибы и простейшие).

**Различают 3 домена:**

- **домен «Bacteria»** — прокариоты, представленные настоящими бактериями (зубактериями);
- **домен «Archaea»** — прокариоты, представленные архебактериями;
- **домен «Eukarya»** — эукариоты, клетки которых имеют ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, а цитоплазма состоит из высокоорганизованных органелл — митохондрий, аппарата Гольджи и др. Домен «Eukarya» включает: грибы и простейшие.

**Морфологическая классификация**

**Для бактерий характерны четыре основные формы:**

- сферическая (шаровидная),
- цилиндрическая (палочковидная),
- извитая
- нитевидная

**Шаровидные бактерии, или кокки:**

**Микрококки** – отдельно расположенные клетки.

**Диплококки** – располагаются парами.

**Стрептококки** – клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку.

**Сарцины** – располагаются в виде «пакетов» из 8 и более кокков.

**Стафилококки** – кокки, расположенные в виде грозди винограда в результате деления в разных плоскостях.

#### **Палочковидные бактерии**

**Монобактерии** – расположены отдельными клетками.

**Диплобактерии** – расположены по две клетки.

**Стрептобактерии** – после деления образуют цепочки клеток.

Палочковидные бактерии могут образовывать споры: бациллы и клостридии.

#### **Извитые бактерии**

**Вибрионы** – изогнутость тела не превышает одного оборота

**Спирохеты** – изгибы тела в один или несколько оборотов.

#### **Нитевидные бактерии**

**Актиномицеты** - это ветвящиеся бактерии

Одной из основных таксономических категорий является - **вид**.

**Вид** — это совокупность особей, объединенных по близким свойствам, но отличающихся от других представителей рода.

**Чистая культура** - масса клеток, состоящая из микроорганизмов, принадлежащих одному виду и полученных как потомство одной клетки

**Штамм** – это чистая культура одного вида бактерий, выделенных из разных источников или из одного источника в разное время.

Штаммы могут различаться по некоторым признакам, не выходящим за пределы характеристики вида.

**Клон** - это совокупность бактерий, являющихся потомством одной клетки

## **15. Световой микроскоп. Показатели качества: разрешающая способность, увеличение.**

**Световой микроскоп** - это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения

**В микроскопе выделяют две части:**

1. Оптическую
2. Механическую

**К оптической части относят:**

- **Объектив** - система неравнозначных линз, главная из которых - передняя фронтальная линза, которая увеличивает в 90 раз, но дает искажение - аберрации. Поэтому в объективе находится корректирующие линзы.
- **Окуляр** - система увеличивающих линз, которая увеличивает изображение данное объективом. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: x7, x10, x15
- **Конденсер Аббе** - система собирающих линз которые находятся под предметным столиком и служат для концентрации светового потока от зеркала.
- **Зеркало** - служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект.

**Аберрации бывают:**

- сферические
- хроматические

**Сферические аберрации** возникают за счет того что лучи не пересекаются в одной точке.

**Хроматические аберрации** возникают за счет разложения белого света на составные части.

**Механическая часть микроскопа состоит:**

- **Подставка** - это основание микроскопа.
- **Коробка с микрометрическим механизмом**, построенном на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно
- **Тубус** - цилиндр, в который сверху вставляют окуляры
- **Предметный столик** предназначен для расположения на нем препарата.
- **Кронштейн конденсора** подвижно присоединен к коробке микрометрического механизма.

**Разрешающая способность микроскопа** — это способность выдавать чёткое раздельное изображение двух близко расположенных точек объекта.

$$Z = \frac{\lambda}{A} \rightarrow Z = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \frac{u}{2}}$$

Z - Разрешение

$\lambda$  - Длина волны света, используемого для освещения

A - Числовая апертура

u - Отверстный угол (угол между крайними лучами, попадающими в объектив)

n - Показатель преломления среды между объектом и фронтальной линзой объектива

**Увеличение микроскопа** - общее является произведением увеличений объектива и окуляра.

## 16. Спора. Строение, функция, методы выявления

**Споры бактерий** — особый тип клеток, характеризующихся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

**Бактериальная спора формируется** внутри материнской клетки и называется эндоспорой.

Способностью к образованию спор обладают преимущественно палочковидные грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, из шаровидных бактерий лишь единичные виды, например *Sporosarcina ureae*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

### Строение

**В зрелой споре различимы:**

- Спороплазма
- Двухслойная ЦПМ
  1. Внутренний слой
  2. Внешний слой
- Оболочка споры

**Спороплазма** (протопласт споры) включает:

- цитоплазму
- бактериальную хромосому
- системы белкового синтеза
- системы анаэробного энергообразования

### **Двухслойная ЦПМ**

- **Внутренний слой** (стенка споры) образован пептидогликанами.
- **Внешний слой** (собственно оболочка) образуют кератиноподобные белковые структуры с низкой проницаемостью.

У некоторых бактерий материнская клетка образует экзоспориум.

**Экзоспориум** - двух-трёхслойное желатинообразное покрытие образованное липопротеинами и углеводами и во многом аналогичное капсуле бактерий. При созревании споры экзоспориум может сохраняться в виде пустого и отстающего от споры «мешка».

**Оболочка споры** - двухслойная: пространство между слоями заполняют гликопептидные полимеры, сходные с пептидогликанами, образующие сетчатую структуру (кортекс), проявляющую высокую чувствительность к лизоциму.

**Функция спор** - сохранение генетического материала при неблагоприятных условиях (защитная).

### **Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при**

- истощении питательного субстрата
- недостатке углерода, азота, фосфора.
- изменениях pH

### **Методы выявления**

#### **Метод окраски по Ожешко**

**Метод Ожешко** сходен с методом Циля-Нильсена, но отличается использованием раствора **соляной кислоты** в качестве протравы, разрыхляющей оболочку споры, которая плохо воспринимает красители. После протравы соляной кислотой при нагревании в течение 2-3 мин мазок фиксируется и окрашивается по методу Циля-Нильсена.

**NB!** Цитоплазма клетки окрашивается в синий цвет, а споры в красный.

#### **Метод окраска по Цилю-Нильсену**

**Метод Циля-Нильсена** предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых.

1. Мазок окрашивают **карболовым фуксином Циля** (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.
2. Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.
3. Промывают водой.
4. Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).

Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов. Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой. Некислотоустойчивые бактерии легко

окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

**NB!** Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые - в сине-голубой.

## **17. Темнопольный микроскоп. Принцип работы.**

### **Сфера применения.**

Микроскоп построен по традиционной схеме. Отличительной особенностью является применение специального конденсора (кардиоид или параболоид) формирующего световой конус, использующийся для бокового освещения объекта. При использовании объективов с большой апертурой для устранения засветки поля в объектив вкладывается диафрагма.

#### **Достоинства**

- Возможность изучения живых микроорганизмов – изучение подвижности бактерий и простейших
- Нет искажений, связанных с фиксацией и окраской препаратов

#### **Недостатки**

- Сложная настройка освещения
- Высокие требования к качеству предметных и покровных стекол

#### **Сфера применения:**

ультрамикроскоп для изучения подвижности живых неокрашенных микроорганизмов. Диагностика сифилиса (трепонема) и лептоспироза.

#### **Принцип работы:**

В объектив не попадают прямые лучи, в центре конденсора чёрная бумага (темнопольный конденсор) → эффект Тиндаля → светящиеся контуры микроорганизмов на чёрном фоне.

## **18. Фазово-контрастный микроскоп. Принцип работы.**

### **Сфера применения.**

Фазово-контрастный микроскоп, состоит из специального конденсора и объективов с фазовыми пластинками позволяет перевести невидимые глазу фазовые колебания в видимые амплитудные.

Изменение фазы колебания когерентных лучей происходит при прохождении через прозрачные объекты. При этом, в отличие от темнопольного микроскопа, можно рассмотреть не только контуры объекта, но и его внутреннее строение.

#### **Достоинства**

- Возможность изучения живых микроорганизмов – изучение подвижности бактерий и простейших

- Нет искажений, связанных с фиксацией и окраской препаратов
- Возможно изучение внутренней структуры крупных объектов (ядра, вакуоли)

#### **Недостатки**

- Хроматические аберрации (возникают за счет разложения белого света на составные части)

#### **Принцип работы:**

Преобразовывает не видимые глазу фазовые изменения вносимые объектом в видимый изменения контрастности. Конденсор с поляризатором.

#### **Сфера применения:**

- изучение подвижности
- изучение внутреннего строения микроорганизмов
- изучение неокрашенные живые препараты.

## **19. Этапы развития микробиологии. Работы основоположников микробиологии.**

- **Эмпирические знания** (до изобретения микроскопов и их применения для изучения микромира). Дж. Фракасторо (1546г.) предположил живую природу агентов инфекционных заболеваний- *contagium vivum*.
- **Морфологический период** занял около двухсот лет. Антони ван Левенгук в 1675г. впервые описал простейших, в 1683г. - основные формы бактерий. Несовершенство приборов (максимальное увеличение микроскопов X300) и методов изучения микромира не способствовало быстрому накоплению научных знаний о микроорганизмах.
- **Физиологический период** (с 1875г.) - эпоха Л.Пастера и Р.Коха. Л. Пастер - изучение микробиологических основ процессов брожения и гниения, развитие промышленной микробиологии, выяснение роли микроорганизмов в кругообороте веществ в природе, открытие **анаэробных** микроорганизмов, разработка принципов **асептики**, методов **стерилизации**, ослабления (**аттенуации**) **вирулентности** и получения **вакцин (вакцинных штаммов)**. Р. Кох - метод выделения **чистых культур** на твердых питательных средах, способы окраски бактерий анилиновыми красителями, открытие возбудителей сибирской язвы, холеры (**запятой Коха**), туберкулеза (**палочки Коха**), совершенствование техники микроскопии. Экспериментальное обоснование критериев Хенле, известные как постулаты (триада) Хенле - Коха.
- **Иммунологический период**. И. И. Мечников создал новую эпоху в микробиологии - учение о невосприимчивости (иммунитете), разработав теорию фагоцитоза и обосновав клеточную теорию иммунитета. Одновременно накапливались данные о выработке в

организме **антител** против бактерий и их **токсинов**, позволившие П. Эрлиху разработать гуморальную теорию иммунитета. В последующей многолетней и плодотворной дискуссии между сторонниками фагоцитарной и гуморальной теорий были раскрыты многие механизмы иммунитета и родилась наука **иммунология**.

- **Следующим важным этапом в развитии микробиологии стало открытие антибиотиков.** В 1929г. А. Флеминг открыл пенициллин и началась эра антибиотикотерапии, приведшая к революционному прогрессу медицины. В дальнейшем выяснилось, что микробы приспосабливаются к антибиотикам, а изучение механизмов лекарственной устойчивости привело к открытию второго- **внехромосомного (плазмидного) генома** бактерий. Изучение **плазмид** показало, что они представляют собой еще более просто устроенные организмы, чем вирусы, и в отличие от **бактериофагов** не вредят бактериям, а наделяют их дополнительными биологическими свойствами. Открытие плазмид существенно дополнило представления о формах существования жизни и возможных путях ее эволюции.
- **Современный молекулярно - генетический этап** развития микробиологии, вирусологии и иммунологии начался во второй половине 20 века в связи с достижениями генетики и молекулярной биологии, созданием электронного микроскопа. В опытах на бактериях была доказана роль ДНК в передаче наследственных признаков. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно- биологических и генетических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни. Выяснение принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установление универсальности генетического кода позволило лучше понимать молекулярно - генетические закономерности, свойственные более высоко организованным организмам.

## **БЛОК 2**

### **1. Бактериологический метод диагностики. Достоинства и недостатки.**

**Бактериологические методы диагностики** - это совокупность методов изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения.

Основным, наиболее точным и достоверным, является бактериологический метод — **метод выделения чистых культур**.

Метод выделения чистых культур позволяет выделить из естественной среды обитания — тканей и жидкостей организма человека или внешней среды —

отдельные виды микробов. Это достигается посевом материалов в искусственные питательные среды.

Чистые культуры патогенных микробов, выделенные от больных людей и животных, позволяют своевременно установить диагноз и определить природу инфекционного заболевания. Они являются исходным материалом для получения бактериальных препаратов (вакцины, токсины, фаги, антибиотики и т. д.)

Выделенная чистая культура идентифицируется по морфологическим, тинкториальным, культуральным, токсигенным и биохимическим свойствам, по антигенной структуре и вирулентности.

Идентификация представляет собой комплекс микроскопических, бактериологических, иммунологических и биологических исследований, применяемых для определения типа и вида бактерий.

#### **Достоинства**

- относительно высокая специфичность исследования
- возможность лабораторного моделирования терапевтического воздействия на микроорганизмы и учет его эффективности.

#### **Недостатки**

- длительность исследования
- высокие требования к забору материала
- повышенные требования к квалификации персонала лабораторий.

## **2. Бактериологический метод диагностики. Основные этапы.**

**Бактериологические методы диагностики** - это совокупность методов изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения.

Основным, наиболее точным и достоверным, является бактериологический метод — **метод выделения чистых культур**.

Метод выделения чистых культур позволяет выделить из естественной среды обитания — тканей и жидкостей организма человека или внешней среды — отдельные виды микробов. Это достигается посевом материалов в искусственные питательные среды.

Чистые культуры патогенных микробов, выделенные от больных людей и животных, позволяют своевременно установить диагноз и определить природу инфекционного заболевания. Они являются исходным материалом для получения бактериальных препаратов (вакцины, токсины, фаги, антибиотики и т. д.)

Выделенная чистая культура идентифицируется по морфологическим, тинкториальным, культуральным, токсигенным и биохимическим свойствам, по антигенной структуре и вирулентности.

Идентификация представляет собой комплекс микроскопических, бактериологических, иммунологических и биологических исследований, применяемых для определения типа и вида бактерий.

### **Достоинства**

- относительно высокая специфичность исследования
- возможность лабораторного моделирования терапевтического воздействия на микроорганизмы и учет его эффективности.

### **Недостатки**

- длительность исследования
- высокие требования к забору материала
- повышенные требования к квалификации персонала лабораторий.

### **Основные этапы**

#### **1 этап**

- **Подготовительные мероприятия.** Эта стадия включает в себя забор, хранение и транспортировку материала. Также, при необходимости, может проводиться его обработка, в зависимости от свойств изучаемых бактерий. Например, при обследовании материала на туберкулёз, для выявления кислотоустойчивых микробактерий используются растворы щёлочи или кислоты.
- **Обогащение.** Данная стадия не является обязательной и проводится в том случае, если количества бактерий в исследуемом материале недостаточно для проведения полноценного исследования. Например, при выделении гемокультуры, исследуемую кровь помещают в среду в соотношении 1 к 10 и хранят в течение суток при температуре 37°.
- **Микроскопия.** Мазок исследуемого материала окрашивается и изучается под микроскопом - исследуется микрофлора, её свойства и количество. В дальнейшем из первичного мазка необходимо отдельно выделить все находящиеся в нём микроорганизмы.
- **Создание отдельных колоний.** На чашку, со специальной, селективной средой, наносится материал, для этого используют петлю или шпатель. Далее, устанавливают чашку вверх дном, для защиты колоний от конденсата, и хранят в термостате около 20 часов, поддерживая температуру 37°.

**Важно!** Следует помнить, что в процессе исследования, необходимо придерживаться правил изоляции. С одной стороны, для защиты исследуемого материала и выводимых бактерий, и с другой стороны, для предотвращения заражения окружающих лиц и внешней среды.

## 2 этап

- **Изучение морфологических свойств колоний в средах и их микроскопия.** Исследуются чашки и отмечаются свойства микроорганизмов, показатели их количества, темпы роста, а также отмечается наиболее подходящая питательная среда. Для изучения лучше всего выбрать колонии, располагающиеся ближе к центру, и если образуется несколько типов чистых культур, то изучить каждую в отдельности. Для изучения морфотипной чистоты культуры используют мазок колонии, его окрашивают (обычно используется метод по Граму или же любой другой) и тщательно микроскопируют.
- **Накопление чистой культуры.** Для этого колонии всех морфотипов рассаживают в отдельные пробирки с питательной средой и содержат в термостате при определённой температуре (для большинства микроорганизмов подходящей является температура 37°С, но в некоторых случаях может быть иной).

Питательной средой для накопления часто служит среда Клиглера. Она имеет «скошенный» вид в пробирках, где 2/3 её части в виде столбика, а 1/3 – скошенная поверхность, окрашена в светло-красный цвет.

### **Состав среды Клиглера**

- МПА
- 0,1% глюкозы
- 1% лактозы
- Специальный реактив на сероводород
- Феноловый красный индикатор.

## 3 этап

- **Уровень роста и чистоты культуры.** В общем порядке, выведенная чистая культура имеет однородный рост и при микроскопическом рассмотрении клетки имеют одинаковое морфологическое и тинкториальное строение. Но встречаются некоторые виды бактерий с ярковыраженным плеофоризмом, при этом, встречаются клетки, имеющие различное морфологическое строение.

## 3. Биохимические свойства бактерий. Механизмы изучения.

**Биохимические свойства** - способность микроорганизмов к ферментации и ассимиляции тех или иных химических веществ.

**У бактерий различают три основные группы ферментов:**

- **Конститутивные** - постоянно синтезирующиеся в микробных клетках.
- **Индукцибельные** - синтез которых индуцируется соответствующим субстратом.

- **Репрессибельные** - синтез которых подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом.

Для идентификации микроорганизмов - возбудителей инфекционных болезней, кроме морфологических и культурных свойств, необходимо изучение биохимических признаков.

#### **Биохимические признаки**

- сахаролитические свойства бактерий
- протеолитические свойства бактерий
- пигментообразование
- токсинообразование.

Бактерии характеризуются неодинаковой способностью использовать различные углеводы. Утилизация углеводов бактериями приводит к образованию органических кислот, либо кислот и газов.

**Определение сахаролитических ферментов проводится на средах пестрого ряда (среда Гисса).**

#### **Средах пестрого ряда (среда Гисса)**

##### **Состав:**

- Пептонная вода
- Углевод (сахар или многоатомный спирт)
- Индикатор pH

В пробирку с глюкозой помещают "поплавок" для определения продукции газа (изначально все желтое, а потом окрашивается в розовый)

**Для определения протеолитических ферментов** - коллагеназ производят посев уколом исследуемой культуры в столбик мясо-пептонной желатины (МПЖ). Продолжительность культивирования 7-10 суток при комнатной температуре. При положительном результате наблюдается разжижение желатины. Например: возбудитель сибирской язвы образует кратерообразное разжижение МПЖ.

**В настоящее время для изучения биохимических свойств бактерий используется система индикаторная бумажная (СИБ)**

**СИБ** - набор бумажных дисков, пропитанных различными субстратами и индикаторами, которые помещают в пробирки с взвесью изучаемой культуры.

Диски фильтровальной бумаги пропитывают индикаторными (дифференциальными) средами. В высушенном состоянии диски можно длительно хранить. Перед использованием диски раскладывают пинцетом в стерильные пробирки и добавляют суспензию идентифицируемой культуры в физрастворе

## 4. Влияние физических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов.

К числу основных физических факторов, воздействующих на микроорганизмы как в естественной среде обитания, так и в условиях лаборатории, относятся:

- **Температура.**

О влиянии температуры на микроорганизмы судят по их способности расти и размножаться в определенных температурных границах. Для каждого вида микроорганизмов определена оптимальная температура развития. В зависимости от пределов этой температуры бактерии разделены на три физиологические группы.

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микроорганизмы. При низких температурах клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать длительное время. Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы. На этом принципе основано сохранение продуктов в холодильниках.

Высокая температура губительно действует на микробы. Чем выше температура, тем меньше время необходимо для инактивации микроорганизмов.

В основе бактерицидного действия высоких температур лежит разрушение ферментов за счет денатурации белков и нарушения осмотического барьера.

- **Действие видимого излучения (света).**

Видимый (рассеянный свет), имеющий длину волны 300...1000 нм, обладает способностью угнетать рост и жизнедеятельность большинства микроорганизмов. В связи с этим культивирование микроорганизмов осуществляют в темноте.

Видимый свет положительно влияет только на бактерии, которые используют свет для фотосинтеза.

Прямые солнечные лучи действуют на микроорганизмы более активно, чем рассеянный свет. Бактерицидное действие света связано с образованием гидроксильных радикалов и других высокореактивных веществ, разрушающих вещества, входящие в состав клетки. Например, происходит инактивация ферментов.

Микроорганизмы-сапрофиты более устойчивы к воздействию света, чем патогенные. Это объясняется тем, что они, чаще подвергаясь действию прямых солнечных лучей, более адаптированы к ним.

- **Ультрафиолетовое излучение.**

Ультрафиолетовое излучение с длиной волны 295...200 нм является бактерицидно активным, то есть способным губительно действовать на микроорганизмы.

Механизм действия ультрафиолетового излучения заключается в его способности частично или полностью подавлять репликацию ДНК и повреждать рибонуклеиновые кислоты (особенно мРНК).

- **Ионизирующее излучение.**

Ионизирующее (рентгеновское) излучение представляет собой электромагнитное излучение с длиной волны 0,006...10нм. В зависимости от длины волны различают гамма-излучение, бета-излучение и альфа-излучение.

Наиболее активным действие на биологические объекты отличается гамма-излучение, но даже его бактерицидные свойства значительно ниже, чем бактерицидные свойства ультрафиолетового излучения. Гибель бактерий наступает только при облучении их большими дозами от 45000 до 280000 рентген.

Механизм действия рентгеновского излучения заключается в поражении ядерных структур, в частности нуклеиновых кислот цитоплазмы, что приводит к гибели микробной клетки или изменению ее генетических свойств (мутации).

- **Электричество.**

Электрический ток малой и высокой частоты уничтожает микроорганизмы. Особенно сильным бактерицидным действием обладают токи ультравысокой частоты.

Они приводят в колебание молекулы всех элементов клетки, вследствие чего происходит быстрое и равномерное нагревание всей массы клетки не зависимо от температуры окружающей среды.

Кроме того, установлено, что длительное воздействие токов высокой частоты приводит к электрофорезу некоторых компонентов питательной среды. Образующиеся при этом соединения инактивируют микробную клетку.

- **Ультразвук.**

Механизм бактерицидного действия ультразвука (волны с частотой 20 000 Гц) заключается в том, что в цитоплазме микроорганизмов, находящихся в жидкой среде, образуется кавитационная полость, которая заполняется парами жидкости, в пузырьке возникает давление, что приводит к дезинтеграции цитоплазматических структур.

- **Аэроионизация.**

Наибольшее влияние на бактерии оказывают отрицательно заряженные ионы, действуя в средних концентрациях ( $5 \cdot 10^4$  в 1 см<sup>3</sup> воздуха). Положительно заряженные ионы обладают менее выраженным бактерицидным действием, они способны задерживать рост и развитие микроорганизмов только в больших концентрациях ( $10^6$  в 1 см<sup>3</sup> воздуха). Сила действия аэроионов зависит от их концентрации, длительности экспозиции и расстояния от источника.

## **5. Влияние химических факторов на жизнедеятельность микроорганизмов.**

Способность ряда химических веществ подавлять жизнедеятельность микроорганизмов зависит от **концентрации** химических веществ и **времени** контакта с микробом.

Дезинфектанты и антисептики дают неспецифический микробицидный эффект; химиотерапевтические средства проявляют избирательное противомикробное действие.

#### **По механизму действия химические вещества разделяются**

- деполимеризующие пептидогликан клеточной стенки
- повышающие проницаемость клеточной мембраны
- блокирующие те или иные биохимические реакции
- денатурирующие ферменты
- окисляющие метаболиты и ферменты микроорганизмов
- растворяющие липопротеиновые структуры
- повреждающие генетический аппарат или блокирующие его функции.

У микроорганизмов химической деструкции прежде всего подвергаются белки и липиды цитоплазматической мембраны, белковые молекулы жгутиков, фимбрий, секс-пили, порины клеточной стенки грамположительных бактерий, связывающие белки периплазмы, протеиновые капсулы, экзотоксины, ферменты-токсины и ферменты питания.

Деструкция гетерогенных полимеров (белки, полиэферы и др.) происходит как при действии окислителей, так и при действии гидролизующих и детергентных антисептиков (кислоты, щелочи, соли двух- и поливалентных металлов и др.)

## **6. Классификация питательных сред. Особенности состава и применения.**

### **По составу:**

- **Простые** - содержат основные компоненты белкового питания. Используются в качестве питательной основы для приготовления сложных питательных сред.
  1. пептонная вода,
  2. мясо-пептонный бульон
  3. питательный агар
- **Сложные** - содержат питательную основу и различные добавки: ростовые, дифференцирующие, селективные, хромогенные.
  1. кровяной агар
  2. солевой агар
  3. селенитовый бульон

### **По консистенции:**

- **Жидкие (бульоны)** - не содержат гелеобразующих веществ
  1. солевой бульон
  2. пептонная вода
- **Полужидкие** - содержат 0,1 - 0,7% агар-агара
  1. тиогликолевая среда (среда для контроля стерильности)

- **Плотные (агары)** - содержат 1,0 - 2,0% агар-агара
  1. мясо-пептонный агар
  2. среда Эндо...

### **По назначению:**

- **Дифференциальные** - выделение чистой культуры микроорганизмов при одновременной дифференцировке по биохимическим свойствам.  
**Основной состав:**
  1. диф. фактор
  2. индикатор
  3. пит. основа (МПА, лактоза, осн фуксин)**Например:**
  1. среда Эндо
  2. кровяной агар
- **Элективные** - предназначены для подавления роста сопутствующей микрофлоры с целью облегчения выделения целевого микроорганизма в чистой культуре.  
**Например:**
  1. солевой агар
- **Элективно-дифференциальные** - предназначены для выделения чистой культуры микроорганизмов и одновременного подавления роста сопутствующей микрофлоры.  
Вырастающая сопутствующая микрофлора дифференцируется от целевых микроорганизмов по биохимическим свойствам.  
**Основной состав:**
  1. МПА
  2. элективный фактор
  3. диф. фактор
  4. индикатор**Например:**
  1. желточно-солевой агар
  2. агар Плоскирева
- **Обогащительные** - увеличение концентрации микроорганизмов в исследуемом материале, с последующим выделением чистой культуры путем посева на плотную среду.  
В зависимости от характеристики исследуемой пробы обогатительные среды могут обладать селективностью или быть неселективными (МПБ, обогат фактор)  
**Например:**
  1. сахарный бульон
  2. солевой бульон
- **Синтетические** – состоят из химически чистых компонентов, что позволяет создавать строго контролируемые условия роста.

Предназначены для изучения метаболизма (аксотрофы и прототрофы), генетических экспериментов

**Основной состав:**

1. Вода
2. Глюкоза
3. Мин. соли/орг молек

**Например:**

1. агар М9

- **Среды для анаэробов** - выделение и культивирование строгих анаэробов.

**Основной состав:**

1. Глюкоза
2. ред фактор

**Например:**

1. анаэробный кровяной агар
2. тиогликолевая среда
3. среда Вильсона-Блер

## **7. Культивирование. Рост и размножение бактерий на жидких питательных средах**

**Культивирование микроорганизмов** - это получение большого числа бактерий на питательной среде.

**Цели культивирования:**

- Изучение микробиологических свойств
- Для диагностики инфекций
- Для получения биопрепарата – из бактерий или полученные с помощью бактерий.

**Условия культивирования бактерии:**

- Наличие полноценной питательной среды.
- Оптимальная температура
- Атмосфера культивирования – либо кислород, либо его отсутствие.
- Время культивирования – видимый рост через 18-48 часов, но некоторые – туберкулез например – 3-4- недели
- Освещенность. Некоторые будут расти только в присутствии света.

**Способы культивирования аэробов:**

- **Стационарный**
- **Периодическое культивирование**
- **Непрерывное культивирование**
- **Метод глубинно культивирования с аэрацией среды**

- **Стационарный**

Для культивирования микроорганизмов необходимы питательные среды, которые могут обеспечить, клетки всеми нужными для роста и размножения веществами.

- **Периодическое культивирование**

При периодическом процессе весь объем питательной среды загружают в аппарат сразу, добавляют посевной материал и при оптимальных условиях продолжают процесс до тех пор, пока не накопится нужное количество биомассы или определенного метаболита.

В ходе периодического культивирования изменяется темп роста культуры, ее морфология и физиология. За время культивирования меняется состав среды - уменьшается концентрация питательных веществ, увеличивается содержание метаболитов.

С физиологической точки зрения периодическое культивирование невыгодно. В ходе его возникает также ряд технологических трудностей - циклический ход операций, сменные режимы, что затрудняет контроль и регуляцию процесса.

- **Непрерывное культивирование**

Способ непрерывно-проточного культивирования микроорганизмов более совершенен. Суть его заключается в том, что микробная популяция развивается в проточной питательной среде. Непрерывный способ имеет две разновидности: гомогенно-непрерывный и градиентно-непрерывный. В первом случае выращивание ведут в одном ферментаторе; при тщательном перемешивании среды и аэрации обеспечивается одинаковое состояние культуры во всем объеме жидкости.

**Рост** - увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК). Достигнув определенных размеров, клетка прекращает рост и начинает размножаться.

**Размножение** - способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема.

**На жидких питательных средах** бактерий вызывают помутнение среды, могут образовывать осадок – придонный, пристеночный и могут образовывать пленку на поверхности среды.

## **8. Культуральные свойства. Колония и ее характеристики.**

**Культуральные свойства** - свойства, характеризующие рост микроорганизмов на искусственных питательных средах

**К культуральным (или макроморфологическим) свойствам относятся** характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

На поверхности плотных питательных сред, в зависимости от посева, микроорганизмы могут расти в виде:

- Колоний
- Штриха
- сплошного газона.

**Колонией** - называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки.

В зависимости от того, где растет микроорганизм (на поверхности плотной питательной среды или в толще ее), различают

- Поверхностные
- Глубинные
- Донные колонии

При описании колоний учитывают следующие признаки:

- **форму колонии:**
  1. округлая
  2. амебовидная
  3. ризоидная
  4. неправильная
- **размер (диаметр) колонии:**
  1. очень мелкие (точечные) (0,1-0,5 мм)
  2. мелкие (0,5-3 мм)
  3. средних размеров (3-5 мм)
  4. крупные (более 5 мм в диаметре);
- **поверхность колонии:**
  1. гладкая
  2. шероховатая
  3. складчатая
  4. морщинистая
- **профиль колонии:**
  1. плоский
  2. выпуклый
  3. конусовидный
  4. кратерообразный
- **прозрачность:**
  1. тусклая
  2. матовая
  3. блестящая
  4. прозрачная
  5. мучнистая

- **цвет колонии (пигмент):**
  1. бесцветная
  2. пигментированная (белая, желтая, золотистая, красная, черная)
- **край колонии:**
  1. ровный
  2. волнистый
  3. зубчатый
  4. бахромчатый
- **структуру колонии :**
  1. однородная
  2. мелко- или крупнозернистая
  3. струйчатая
- **консистенцию колонии:**
  1. плотной
  2. мягкой
  3. растающей в агар
  4. слизистой (тянется за петлей)
  5. хрупкой (легко ломается при соприкосновении с петлей).

## 9. Метаболизм бактерий. Катаболизм, анаболизм.

**Метаболизм (обмен веществ)** - бактерий представляет собой совокупность двух взаимосвязанных противоположных процессов катаболизма и анаболизма.

**Катаболизм (диссимиляция)** - распад веществ в процессе ферментативных реакций и накопление выделяемой при этом энергии в молекулах АТФ.

**Анаболизм (ассимиляция)** - синтез веществ с затратой энергии.

**Особенности метаболизма у бактерий состоят в том, что:**

- его интенсивность имеет достаточно высокий уровень, что возможно обусловлено гораздо большим соотношением поверхности к единице массы, чем у многоклеточных;
- процессы диссимиляции преобладают над процессами ассимиляции;
- субстратный спектр потребляемых бактериями веществ очень широк - от углекислого газа, азота, нитритов, нитратов до органических соединений, включая антропогенные вещества - загрязнители окружающей среды (обеспечивая тем самым процессы ее самоочищения);
- бактерии имеют очень широкий набор различных ферментов - это также способствует высокой интенсивности метаболических процессов и широте субстратного спектра.

**Ферменты бактерий по локализации делятся на 2 группы:**

- **экзоферменты** - ферменты бактерий, выделяемые во внешнюю среду и действующие на субстрат вне клетки (например, протеазы, полисахариды, олигосахаридазы);

- **эндоферменты** - ферменты бактерий, действующие на субстраты внутри клетки (например, ферменты, расщепляющие аминокислоты, моносахара, синтетазы).

Синтез ферментов генетически детерминирован, но регуляция их синтеза идет за счет прямой и обратной связи, т.е. для одних - репрессируется, а для других - индуцируется субстратом. Ферменты, синтез которых зависит от наличия соответствующего субстрата в среде.

**У бактерий различают три основные группы ферментов:**

- **Конститутивные** - постоянно синтезирующиеся в микробных клетках.
- **Индукцибельные** - синтез которых индуцируется соответствующим субстратом.
- **Репрессибельные** - синтез которых подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом.

Изучают метаболизм бактерий с помощью физико-химических и биохимических методов исследования в процессе культивирования бактерий в определенных условиях на специальных питательных средах, содержащих то или иное соединение в качестве субстрата для трансформации.

Такой подход позволяет судить об обмене веществ путем более детального изучения процессов различных видов обмена (белков, углеводов) у микроорганизмов.

## **10. Методы контроля режима стерилизации. Контроль стерильности.**

**Контроль эффективности стерилизации осуществляется:**

- Физическими методами.
- Химическими методами.
- бактериологическими методами.

**К физическим методам контроля относятся:**

- измерение температуры
- измерение давления
- измерение времени применения стерилизации.

**К химическим методам контроля работы стерилизаторов**

- химические тесты
- термохимические индикаторы, изменяющие свое агрегатное состояние и цвет при достижении определенного для него плавления

### **Бактериологический контроль**

- биотесты, имеющие дозированное количество спор тест - культуры.

Контроль эффективности стерилизации с помощью биотестов рекомендуется проводить 1 раз в 2 недели.

### **Существуют 3 группы способов контроля стерильности.**

- **Физический контроль:**

берется пробирка, куда насыпают какое-либо вещество, плавящееся при температуре около 120 градусов - сера, бензойная кислота. Недостаток этого способа контроля состоит в том, что мы видим, что порошок расплавился и, значит, необходимая температура была достигнута, но мы не можем быть уверены, что она была такой на протяжении всего времени экспозиции.

- **Химический контроль:**

берут фильтровальную бумагу, помещают ее в раствор крахмала, после чего погружают в раствор Люголя. Она приобретает темно-бурый цвет. После экспозиции в автоклаве крахмал при температуре выше 120 градусов разрушается, бумажка обесцвечивается. Метод имеет тот же недостаток, что и физический контроль.

- **Биологический контроль –**

берут образцы стерилизованного материала и сеют на питательные среды, не нашли микробов - значит все в порядке. Нашли микробы - значит необходимо повторно провести стерилизацию.

## **11. Методы культивирования бактерий. Непрерывное и периодическое**

**Культивирование микроорганизмов** - это получение большого числа бактерий на питательной среде.

### **Цели культивирования:**

- Изучение микробиологических свойств
- Для диагностики инфекций
- Для получения биопрепарата – из бактерий или полученные с помощью бактерий.

### **Условия культивирования бактерии:**

- Наличие полноценной питательной среды.
- Оптимальная температура
- Атмосфера культивирования – либо кислород, либо его отсутствие.

- Время культивирования – видимый рост через 18-48 часов, но некоторые – туберкулез например – 3-4- недели
- Освещенность. Некоторые будут расти только в присутствии света.

**Различают два основных способа культивирования микроорганизмов:**

- периодическое
- непрерывное.

### ***Периодическое культивирование***

При периодическом процессе весь объем питательной среды загружают в аппарат сразу, добавляют посевной материал и при оптимальных условиях продолжают процесс до тех пор, пока не накопится нужное количество биомассы или определенного метаболита.

В ходе периодического культивирования изменяется темп роста культуры, ее морфология и физиология. За время культивирования меняется состав среды - уменьшается концентрация питательных веществ, увеличивается содержание метаболитов.

С физиологической точки зрения периодическое культивирование невыгодно. В ходе его возникает также ряд технологических трудностей - циклический ход операций, сменные режимы, что затрудняет контроль и регуляцию процесса.

Периодическую культуру обычно рассматривают как замкнутую систему, переживающую разные фазы развития. Каждая фаза характеризуется определенными физиологическими параметрами.

- **1-я — начальная, или лаг-фаза, или фаза задержки размножения,** — характеризуется началом интенсивного роста клеток, но скорость их деления остается невысокой;
- **2-я — логарифмическая, или лог-фаза, или экспоненциальная фаза,** — характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и значительным увеличением числа клеток в популяции;
- **3-я — стационарная фаза** — наступает тогда, когда число клеток в популяции перестает увеличиваться. Это связано с тем, что наступает равновесие между числом вновь образующихся и гибнущих клеток. Число живых бактериальных клеток в популяции на единицу объема питательной среды в стационарной фазе обозначается как М-концентрация. Этот показатель является характерным признаком для каждого вида бактерий;
- **4-я — фаза отмирания (логарифмической гибели)** — характеризуется преобладанием в популяции числа погибших клеток и прогрессивным снижением числа жизнеспособных клеток популяции.

### ***Непрерывное культивирование***

Способ непрерывно-проточного культивирования микроорганизмов более совершенен. Суть его заключается в том, что микробная популяция развивается в проточной питательной среде. Непрерывный способ имеет две разновидности: гомогенно-непрерывный и градиентно-непрерывный. В первом случае выращивание ведут в одном ферментаторе; при тщательном перемешивании

среды и аэрации обеспечивается одинаковое состояние культуры во всем объеме жидкости.

## **12. Методы культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов.**

Выведение облигатно анаэробных микроорганизмов существенно отличается от изучения других типов бактерий, так как если в атмосфере содержание  $O_2$  будет превышать 0,1%, то они погибнут.

### ***Специфика выведения анаэробов***

Для правильного культивирования анаэробов, необходима специально подготовленная среда, отвечающая определенным требованиям

### ***Требования к питательным средам для анаэробов***

- создание бескислородных условий
- обязательное наличие глюкозы (дыхательный субстрат)
- наличие редуцирующего фактора (связывания токсичных паров кислорода)
- разливание среды высоким столбиком (т.к. на дне нет кислорода)  
регенерация среды перед посевом (среду кипятят и быстро охлаждают, чтобы уничтожить растворенный кислород)
- закрытие доступа кислороду (после посева среды закрывают стилизованным вазелиновым маслом)

### ***Методы создания анаэробной среды:***

- ***Физические методы*** -

основаны на создании вакуума в специальных аппаратах — анаэроостатах. Иногда воздух в них заменяют каким-либо другим газом, например  $CO_2$ .

***Анаэроостат*** — прибор для выращивания микроорганизмов в анаэробных условиях. Микроорганизмы выращивают в анаэроостате при заданной температуре, большей частью  $37^\circ$ , в условиях вакуума.

- ***Химические методы*** -

закключаются в том, что при культивировании исследуемого материала на плотных средах в эксикатор помещают химические вещества, например пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода. В жидкие питательные среды можно добавлять различные редуцирующие вещества: аскорбиновую или тиогликолевую кислоту.

- ***Биологический метод*** -

основан на одновременном культивировании аэробов и анаэробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закупоренных. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, посеянными на одной половине

среды, а затем начинается рост анаэробов, посев которых сделан на другой половине.

**Также можно использовать методы Фортнера, Цейсслера и Вейнберга.**

#### **Метод Фортнера**

Посевы проводят на чашку Петри с толстым слоем среды, разделённым пополам узкой канавкой, вырезанной в агаре. На одну половину засевают культуру аэробных бактерий, на другую — анаэробных. Края чашки заливают парафином и инкубируют в термостате. Первоначально наблюдают рост аэробов, а затем (после поглощения кислорода) — рост анаэробов.

#### **Метод Цейсслера**

Метод Цейсслера используют для выделения чистых культур спорообразующих анаэробов. Для этого проводят посев на среду Китта-Тароцци, прогревают 15 мин при 80 °С (для уничтожения вегетативных форм), заливают вазелиновым маслом и инкубируют 24 ч. Затем проводят посев на сахарно-красный агар для получения чистых культур. После 24-часового культивирования подозрительные колонии изучают и отсевают на среду Китта-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры).

#### **Метод Вейнберга**

Метод Вейнберга используют для получения чистых культур строгих анаэробов. Культуры, выращенные на среде Китта-Тароцци, вносят в сахарный бульон. Затем пастеровской пипеткой с запаянным концом материал переносят в узкие пробирки (трубки Виньяля) с сахарным МПА, погружая пастерку до дна пробирки. Засеянные пробирки быстро охлаждают холодной водой, что позволяет зафиксировать отдельные бактериальные клетки в толще затвердевшего агара. Пробирки инкубируют, и изучают выросшие колонии. При обнаружении подозрительной колонии на её месте делают распил, колонию быстро отбирают и засевают на среду Китта-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры). - Читать далее "Методы культивирования бактерий. Стационарный способ культивирования бактерий. Способ глубинного культивирования бактерий. Метод проточных сред."

### **13. Основные группы дезинфектантов. Механизмы действия.**

**Дезинфекция** — это мероприятия, направленные на уничтожение или резкое подавление численности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов во внешней среде, в том числе на объектах и изделиях.

#### **Целью дезинфекции является:**

предупреждение или прерывание передачи возбудителей от инфицированного индивидуума к интактному через объекты внешней среды.

### **Используют следующие методы дезинфекции:**

- **химический**,
- **физический** (кипячение, сжигание, ультрафиолетовое облучение),
- **механический** (встряхивание, обработка пылесосом, влажная уборка, проветривание, стирка, мытье),
- **биологический**.

### **Применяют следующие основные группы дезинфектантов:**

- **Галоидсодержащие** -

в них активно действующим антимикробным началом являются хлор, бром или йод (хлорная известь, соли гипохлорита кальция, хлорамины, дихлорциануровая кислота и ее соли, аквасепт, йодонат, дибромантин);

- **Кислородсодержащие** -

на основе перекисных соединений или перекиси водорода (первомур, ПВК, перамин, виркон, дезоксон);

- **Поверхностно-активные вещества**

на основе четвертично-аммониевых соединений и амфотерных поверхностно-активных соединений (аламинол, дюльбаль, санифект, велтолен, гермосепт, септодор);

- **Гуанидины и их смеси с ПАВ**

(демос, катасепт, лизоформин, пливасепт)

- **Спирты** (на основе этанола)

- **Альдегидсодержащие**

на основе глутарового или янтарного альдегидов (гигасепт, сайдекс, глутарал, альдесол)

Если дезинфекции подвергали изделие медицинского назначения — эндоскопы, катетеры и тому подобные объекты, то после окончания дезинфекции они обязательно должны быть промыты водой от дезинфектанта.

### **Механизмы действия дезинфектантов**

Начальной стадией действия любого дезинфектанта на бактериальную клетку является его сорбция на клеточной поверхности.

После диффузии дезинфектантов сквозь клеточную стенку мишенями их действия становятся цитоплазматическая мембрана, нуклеоид, цитоплазма, рибосомы, мезосомы.

Следующий этап — деградация макромолекулярных, в том числе белковых, структур бактериальной клетки в результате инактивации высоко-реактивноспособных функциональных групп (сульфгидрильных, аминных, фе-

нольных, индольных, тиоэтиловых, фосфатных, кетогрупп, эндоциклических атомов азота и пр.).

Наиболее чувствительными являются ферменты, содержащие SH-группы, т. е. тиоловые ферменты.

Среди них наиболее сильно угнетаются дегидрогеназы, которые обеспечивают дыхание бактерий и локализованы преимущественно в мезосомах.

## **14. Паровой и воздушный методы стерилизации. Режимы, области применения. Питательные среды. Классификация.**

**Стерилизация** - это процесс уничтожения всех видов микробной флоры, в том числе их споровых форм, и вирусов с помощью физических или химических воздействий

### ***Паровым методом стерилизуют:***

- медицинские изделия
- детали приборов и аппаратов из коррозионностойких металлов
- стекла
- хирургическое белье
- перевязочный и шовный материал
- изделия из резины (катетеры, зонды, трубки)
- изделия из латекса
- изделия из пластмасс.

При паровом методе стерилизующим средством является водяной насыщенный пар под избыточным давлением 0,05 МПа (0,5 кгс/см<sup>2</sup>) - 0,21 МПа (2,1 кгс/см<sup>2</sup>) (1,1-2,0 бар) температурой 110-134°С.

Процесс стерилизации происходит в стерилизаторах (автоклавах). Полный цикл составляет от 5 до 180 минут

### ***Преимущества метода:***

- короткий цикл
- возможность стерилизации нетермостойких изделий
- применение различных типов упаковки

### ***Недостатком является:***

- высокая стоимость оборудования.

### ***Воздушным методом стерилизуют***

- медицинские изделия
- детали приборов и аппаратов из коррозионностойких металлов
- стекла с пометкой 200° С
- изделия из силиконовой резины.

**Стерилизация при воздушном методе** осуществляется сухим горячим воздухом температурой 160°, 180° и 200°C.

Перед стерилизацией воздушным методом изделия подвергаются предстерилизационной очистке и обязательно высушиваются в сушильном шкафу при температуре 85°C до исчезновения видимой влаги. Полный цикл составляет до 150 минут.

**Преимущество стерилизации горячим воздухом по сравнению с паровым методом состоит**

- в низкой себестоимости оборудования.

**Недостатками являются:**

- длинный полный цикл стерилизации (не менее 30 мин)
- опасность повреждения инструментов высокими температурами,
- невозможность стерилизации тканей и пластмасс
- только один контрольный параметр – температура
- высокие энергозатраты.

## **Классификация питательных сред**

**По составу:**

- **Простые** - содержат основные компоненты белкового питания. Используются в качестве питательной основы для приготовления сложных питательных сред.
  4. пептонная вода,
  5. мясо-пептонный бульон
  6. питательный агар
- **Сложные** - содержат питательную основу и различные добавки: ростовые, дифференцирующие, селективные, хромогенные.
  4. кровяной агар
  5. солевой агар
  6. селенитовый бульон

**По консистенции:**

- **Жидкие (бульоны)** - не содержат гелеобразующих веществ
  3. солевой бульон
  4. пептонная вода
- **Полужидкие** - содержат 0,1 - 0,7% агар-агара
  2. тиогликолевая среда (среда для контроля стерильности)
- **Плотные (агары)** - содержат 1,0 - 2,0% агар-агара
  3. мясо-пептонный агар
  4. среда Эндо...

## **По назначению:**

- **Дифференциальные** -  
выделение чистой культуры микроорганизмов при одновременной дифференцировке по биохимическим свойствам.  
**Основной состав:**
  4. диф. фактор
  5. индикатор
  6. пит. основа (МПА, лактоза, осн фуксин)**Например:**
  3. среда Эндо
  4. кровяной агар
- **Элективные** -  
предназначены для подавления роста сопутствующей микрофлоры с целью облегчения выделения целевого микроорганизма в чистой культуре.  
**Например:**
  2. солевой агар
- **Элективно-дифференциальные** -  
предназначены для выделения чистой культуры микроорганизмов и одновременного подавления роста сопутствующей микрофлоры.  
Вырастающая сопутствующая микрофлора дифференцируется от целевых микроорганизмов по биохимическим свойствам.  
**Основной состав:**
  1. МПА
  2. элективный фактор
  3. диф. фактор
  4. индикатор**Например:**
  1. желточно-солевой агар
  2. агар Плоскирева
- **Обогащительные** -  
увеличение концентрации микроорганизмов в исследуемом материале, с последующим выделением чистой культуры путем посева на плотную среду.  
В зависимости от характеристики исследуемой пробы обогатительные среды могут обладать селективностью или быть неселективными (МПБ, обогат фактор)  
**Например:**
  1. сахарный бульон
  2. солевой бульон
  - 3.
- **Синтетические** –  
состоят из химически чистых компонентов, что позволяет создавать строго контролируемые условия роста.  
Предназначены для изучения метаболизма (аксотрофы и прототрофы), генетических экспериментов  
**Основной состав:**
  4. Вода
  5. Глюкоза
  6. Мин. соли/орг молек

**Например:**

2. агар М9

- **Среды для анаэробов** - выделение и культивирование строгих анаэробов.

**Основной состав:**

3. Глюкоза

4. ред фактор

**Например:**

1. анаэробный кровяной агар

2. тиогликолевая среда

3. среда Вильсона-Блер

## 16. Способы получения энергии бактериями. Мембранное и субстратное фосфорилирование.

**У микроорганизмов существует два типа биологического окисления:**

- Аэробный
- Анаэробный.

**При аэробном типе** биологического окисления участвует кислород, и этот процесс называется **дыханием** в строгом смысле слова.

**При анаэробном типе** биологического окисления освобождение энергии из органических молекул происходит без участия кислорода и называется **брожением**. Анаэробноз существует только среди прокариотов.

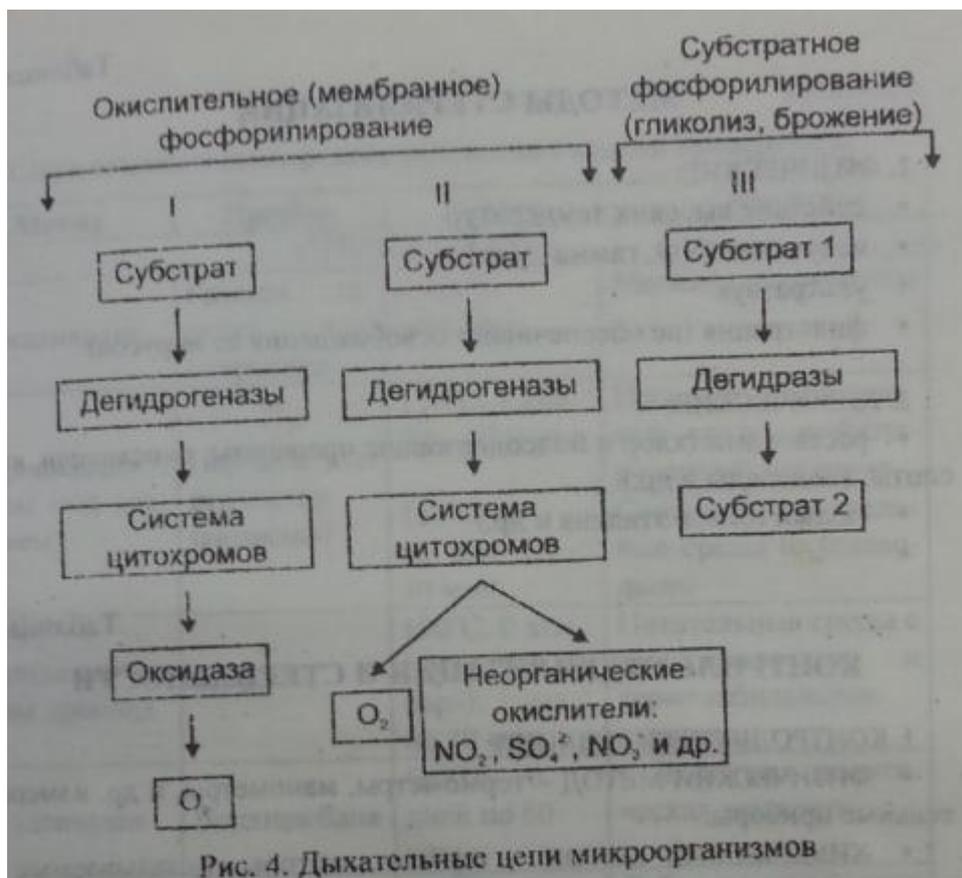
**Все микроорганизмы по типу дыхания делятся на следующие группы:**

- облигатные аэробы
- облигатные анаэробы
- факультативные анаэробы
- микроаэрофилы.

**Субстратное фосфорилирование** – образование АТФ непосредственно на молекуле субстрата. Протекает в анаэробных условиях. (в процессе гликолиза).

**Окислительное фосфорилирование** – образование АТФ одновременно с процессом переноса протонов и электронов по дыхательной цепи ферментов. На каждые 2 атома водорода, поступившие в дыхательную цепь, синтезируются 3 молекулы АТФ.

Окислительное фосфорилирование осуществляется аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами.



## 17. Стерилизация. Методы стерилизации, используемые в медицине

**Стерилизация** - это процесс уничтожения всех видов микробной флоры, в том числе их споровых форм, и вирусов с помощью физических или химических воздействий

**Стерилизация осуществляется:**

- **физическими методами**
  1. паровая
  2. воздушная
  3. ионизирующая
- **химическими методами:**
  1. растворы химических средств
  2. газы.

**Физические методы:**

**Паровым методом стерилизуют:**

- медицинские изделия
- детали приборов и аппаратов из коррозионностойких металлов
- стекла
- хирургическое белье

- перевязочный и шовный материал
- изделия из резины (катетеры, зонды, трубки)
- изделия из латекса
- изделия из пластмасс.

При паровом методе стерилизующим средством является водяной насыщенный пар под избыточным давлением 0,05 МПа (0,5 кгс/см<sup>2</sup>) - 0,21 МПа (2,1 кгс/см<sup>2</sup>) (1,1-2,0 бар) температурой 110-134°С.

Процесс стерилизации происходит в стерилизаторах (автоклавах). Полный цикл составляет от 5 до 180 минут

***Преимущества метода:***

- короткий цикл
- возможность стерилизации нетермостойких изделий
- применение различных типов упаковки

***Недостатком является:***

- высокая стоимость оборудования.

***Воздушным методом стерилизуют***

- медицинские изделия
- детали приборов и аппаратов из коррозионностойких металлов
- стекла с пометкой 200° С
- изделия из силиконовой резины.

***Стерилизация при воздушном методе*** осуществляется сухим горячим воздухом температурой 160°, 180° и 200°С.

Перед стерилизацией воздушным методом изделия подвергаются предстерилизационной очистке и обязательно высушиваются в сушильном шкафу при температуре 85°С до исчезновения видимой влаги. Полный цикл составляет до 150 минут.

***Преимущество стерилизации горячим воздухом по сравнению с паровым методом состоит***

- в низкой себестоимости оборудования.

***Недостатками являются:***

- длинный полный цикл стерилизации (не менее 30 мин)
- опасность повреждения инструментов высокими температурами,
- невозможность стерилизации тканей и пластмасс
- только один контрольный параметр – температура
- высокие энергозатраты.

### **Ионизирующее излучение**

Активно действующими агентами являются гамма-лучи. Ионизирующее излучение не используется для дезинфекции. Его используют для стерилизации изделий однократного применения при производстве в заводских условиях.

### **Химический метод**

стерилизации достаточно широко применяется для обработки «проблемной техники», например, для аппаратуры с волоконной оптикой, наркозной аппаратуры, кардиостимуляторов, стоматологического инструментария.

**Используются такие современные стерилизующие агенты,**

- глутаровый альдегид
- производные ортофталевой и янтарной кислот
- кислородосодержащие соединения.

### **Преимущество**

- нет специального оборудования.

Промытые стерильные изделия после удаления жидкости из каналов и полостей используют сразу по назначению или после упаковки в двухслойную стерильную х/б бязь, помещают в стерильную коробку, выложенную стерильной простыней, на срок не более 3 суток.

## **18. Чистая культура. Методы выделения чистой культуры бактерий**

**Чистая культура** - популяция бактерий одного вида, выращенная на питательной среде

Для того, чтобы выделить чистую культуру микроорганизмов, следует отделить многочисленные бактерии, которые находятся в материале, одна от другой.

Это можно достичь с помощью методов, которые основаны на двух принципах

- механическом разобщении бактерий.
- биологическом разобщении бактерий.

| <b>Механический принцип</b>  | <b>Биологический принцип</b>  |
|--|---|
| <b>МЕТОДЫ</b><br>1. Фракционных разведений Л. Пастера<br>2. Пластинчатых разведений Р. Коха<br>3. Поверхностных посевов Дригальского<br>4. Поверхностных штрихов | <b>МЕТОДЫ</b><br>Приймают во внимание:<br>а - тип дыхания (метод Фортнера);<br>б - подвижность (метод Шукевича);<br>в - кислотоустойчивость;<br>г - спорообразование;<br>д - температурный оптимум;<br>е - избирательную чувствительность лабораторных животных к бактериям |

## **Механическое разобщении бактерий**

- **Метод последовательных разведений**

предложен Л. Пастером, был одним из самых первых, который применялся для механического разъединения микроорганизмов. Он заключается в проведении последовательных серийных разведений материала, который содержит микробов, в стерильной жидкой питательной среде. Этот прием достаточно кропотлив и несовершенный в работе, поскольку не позволяет контролировать количество микробных клеток, которые попадают в пробирки при разведениях.

- **Метод Коха (метод пластинчатых разведений).**

Р. Кох использовал плотные питательные среды на основе желатины или агар-агара. Материал с ассоциациями разных видов бактерий разводился в нескольких пробирках с растопленным и кое-что охлажденным желатином, содержание которых позже выливалось на стерильные стеклянные пластины. После застудневания среды оно культивировалось при оптимальной температуре. В его толще образовывались изолированные колонии микроорганизмов, которые легко могут быть перенесены на свежую питательную среду с помощью платиновой петли для получения чистой культуры бактерий.

- **Метод Дригальского**

является более совершенным методом, который широко распространен в повседневной микробиологической практике. Сначала на поверхность среды в чашке Петри пипеткой или петлей наносят исследуемый материал.

С помощью металлического или стеклянного шпателя его тщательным образом втирают в среду. Чашку во время посева держат привидкрытою и осторожно вращают, чтобы равномерно распределить материал. Не стерилизуя шпателя, проводят им занял материалу в другой чашке Петри, при потребности – в третьей.

Только после этого шпатель окунают в дезинфикующий раствор или прожаривают в пламени горелки. На поверхности среды в первой чашке наблюдаем, как правило, сплошной рост бактерий, во второй – густой рост, а в третьей – рост в виде изолированных колоний.

- **Метод штриховых посевов**

сегодня используется в микробиологических лабораториях чаще всего. Материал, который содержит микроорганизмы, набирают бактериологической петлей и наносят на поверхность питательной среды возле края чашки. Снимают избыток материала и проводят занял его параллельными штрихами от края к краю чашки.

Спустя сутки инкубации посевов при оптимальной температуре на поверхности чашки вырастают изолированные колонии микробов.

Для получения изолированных колоний можно использовать занял тампоном, которым проводили забор исследуемого материала.

Несколько приоткрывают чашку Петри с питательной средой, вносят туда тампон и осторожными движениями втирают материал в поверхность чашки, возвращая постепенно тампон и чашку.

**Таким образом**, существенное преимущество методов пластинчатых разведений Коха, Дригальского и штриховых посевов заключается в том, что они создают изолированные колонии микроорганизмов, которые при инокуляции на другую питательную среду превращаются в чистую культуру

### **Биологическое разобщении бактерий**

- **По типу дыхания (метод Фортнера)**

посевы производят на чашку Петри с утолщенным слоем среды, разделённым пополам узкой канавкой, вырезанной в агаре. Одну половину засевают культуру аэробных бактерий, на другую — анаэробных.

Края чашки заливают парафином и инкубируют в термостате. Первоначально наблюдают рост аэробной микрофлоры, а затем (после поглощения кислорода) — рост аэробной резко прекращается и начинается рост анаэробной.

- **По подвижности бактерий (Метод Шукевича)**

применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара.

Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересекая верхние края культуры можно получить чистую культуру.

- **По кислотоустойчивости (метод Циля-Нильсона)**

. Метод Циля-Нильсена предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых.

- Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.
- Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.
- Промывают водой.
- Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).

Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов. Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

**NB!** Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые - в сине-голубой.

- **По спорообразованию (метод Ожешко)**

Метод Ожешко сходен с методом Циля-Нильсена, но отличается использованием раствора соляной кислоты в качестве протравы, разруляющей оболочку споры, которая плохо воспринимает красители.

После протравы соляной кислотой при нагревании в течение 2-3 мин мазок фиксируется и окрашивается по методу Циля-Нильсена.

**NB!** Цитоплазма клетки окрашивается в синий цвет, а споры в красный

## 19. Экзо- и эндоферменты, адаптивные и конститутивные ферменты

Питание микроорганизмов осуществляется благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции.

Ферменты - это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом.

Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов.

**Эндоферменты** локализируются в цитоплазме, цитоплазм. мембране, и периплазматическом пространстве.

**Экзоферменты** выделяются в окруж. среду, где они расщепляют макромолекулы до простых соединений, кот. затем транспортируются с микробную клетку (напр, гидролазы)

**Конститутивные ферменты** - синтезируются постоянно с одной скоростью, осуществляют постоянно протекающие в клетке жизненно важные процессы. Удобно использовать для быстрого определения, поскольку не нужно время на наработку фермента.

**Адаптивные ферменты** - выработка начинается только в присутствии субстрата. Необходимо время на активацию синтеза и накопление фермента.

### БЛОК 3

## 1. Антибиотики. Механизмы действия на бактериальную клетку.

**Антибиотики** — это вещества, которые подавляют рост живых клеток

**Механизмы действия:**

- **нарушение синтеза клеточной стенки посредством ингибирования синтеза пептидогликана**
  1. пенициллин
  2. цефалоспорин
  3. монобактамы
- **образования димеров и их переноса к растущим цепям пептидогликана**
  1. ванкомицин
  2. флавомицин

- **синтеза хитина**

1. никкомицин
2. туникамицин

Антибиотики, действующие по подобному механизму, обладают бактерицидным действием, не убивают покоящиеся клетки и клетки, лишенные клеточной стенки (L-формы бактерий).

- **Нарушение функционирования мембран:**

нарушение целостности мембраны, образование ионных каналов, связывание ионов в комплексы, растворимые в липидах, и их транспортировка.

1. нистатин
2. грамицидины
3. полимиксины.

- Подавление синтеза нуклеиновых кислот: связывание с ДНК и препятствование продвижению РНК-полимеразы (актидин), сшивание цепей ДНК, что вызывает невозможность её расплетания (рубомидин), ингибирование ферментов.

- Нарушение синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин).

- Нарушение синтеза белка: ингибирование активации и переноса аминокислот, функций рибосом (стрептомицин, тетрациклин, пурамицин). Ингибирование работы дыхательных ферментов (антимидины, олигомицины, ауровертин).

## **2. Антимикробные препараты. Классификация.**

### **Требования, предъявляемые к препаратам.**

Антимикробными препаратами называются препараты химического и биологического происхождения, содержащие химические вещества, либо микроорганизмы, способные активно подавлять жизнедеятельность патогенных микробов.

Классификация антибиотиков:

По способу получения

- Полусинтетические (химическая модификация природных антибиотиков для изменения фармакокинетики, спектра действия, преодоления лекарственной устойчивости)

- Синтетические (синтезированные химическим способом препараты, имеющие природный прототип)

По продуцентам:Продуцируемые плесневыми грибами ( $\beta$ -лактамы - пенициллины, цефалоспорины)

- Продуцируемые бактериями (полимиксины),Продуцируемые актиномицетами,

По чувствительным микроорганизмам

Антибактериальные:Противогрибковые.Противопротозойные.

- По широте спектра: Широкого спектра. Узкого спектра
  - По конечному эффекту: Бактериостатические, Бактерицидные
  - По мишени: Нарушающие синтез клеточной стенки, Нарушающие функции цитоплазматической мембраны, Нарушающие синтез белка на рибосомах, Нарушающие синтез нуклеиновых кислот
- Медицина предъявляет следующие основные требования к антимикробным антибиотикам:
- высокая избирательность антимикробного эффекта в дозах, нетоксичных для организма;
  - отсутствие или медленное развитие резистентности возбудителей к препарату в процессе его применения;
  - сохранение антимикробного эффекта в жидкостях организма, экссудатах и тканях, отсутствие или низкий уровень инактивации белками сыворотки крови, тканевыми ферментами;
  - хорошее всасывание, распределение и выведение препарата, обеспечивающие терапевтические концентрации в крови, тканях и жидкостях организма (в том числе в ликворе), которые должны быстро достигаться и поддерживаться в течение длительного периода; при этом особое значение имеет создание высоких концентраций в моче, желчи, кале, очагах поражения;
- удобная лекарственная форма для различных возрастных групп и локализации процесса, обеспечивающая максимальный эффект и стабильность в обычных условиях хранения.

### **3. Бактериофаги. Строение. Этапы и исходы взаимодействия вирулентных фагов с бактериальной клеткой.**

Бактериофаг состоит из полиэдрической головки длиной 100 нм и отростка, или «хвоста», примерно такой же длины. Поэтому говорят о «составных» вирусах. Головка состоит из капсомеров и содержит внутри ДНК. Количество белка и ДНК примерно одинаково. Отросток фага T2 имеет сложное строение. В нем можно различить не менее трех частей: полый стержень, окружающий его сократимый чехол и находящуюся на дистальном конце стержня базальную пластинку с шипами и нитями (от последних зависит специфическая адсорбция на клетке-хозяине).

Вирулентный бактериофаг:

- Адсорбция, Проникновение, Репликация генома и синтез фаговых белков, Сборка фаговых частиц
- Выход фагов из клетки

Результатом взаимодействия вирулентного бактериофага с чувствительной клеткой является лизис культуры. На плотных средах это приводит к образованию фаговых колоний (др. названия - негативные колонии, бляшки). На жидких средах наблюдается просветление среды

#### **4. Бактериофаги. Этапы и исходы взаимодействия умеренных фагов с бактериальной клеткой.**

Бактериофаг состоит из полиэдрической головки длиной 100 нм и отростка, или «хвоста», примерно такой же длины. Поэтому говорят о «составных» вирусах. Головка состоит из капсомеров и содержит внутри ДНК. Количество белка и ДНК примерно одинаково. Отросток фага T2 имеет сложное строение. В нем можно различить не менее трех частей: полый стержень, окружающий его сократимый чехол и находящуюся на дистальном конце стержня базальную пластинку с шипами и нитями (от последних зависит специфическая адсорбция на клетке-хозяине).

Умеренный бактериофаг: Адсорбция, Проникновение, Интеграция фаговой ДНК в бактериальный геном (переход в профаг).

Деление клетки. Каждая клетка получает фаговый геном в составе бактериальной хромосомы.

Результатом взаимодействия умеренного фага с чувствительной клеткой является фаговая конверсия (лизогенизация) - изменение свойств культуры за счет генетической информации бактериофага.

#### **5. Генетические рекомбинации.**

Микроорганизмам, как и клеткам высших организмов свойственны генетические рекомбинации, которые имеют свои особенности. Они определяются прежде всего способом размножения и закономерностями передачи генетического материала. Генетические рекомбинации у клеток эукариот совершаются в ходе процессов, сопровождающих половое размножение путем реципрокного (взаимного) обмена фрагментами хромосом. При таком обмене генетическим материалом из двух рекомбинирующих родительских хромосом образуются две рекомбинантные хромосомы. В результате рекомбинаций возникают две рекомбинантные особи.

Прокариотам не свойственно половое размножение. Рекомбинация у них происходит в результате внутригеномных перестроек, заключающихся в изменении локализации генов в пределах хромосомы, или при проникновении в клетку реципиента части ДНК донора. Последнее приводит к формированию неполной зиготы - мерозиготы. Образуется только один рекомбинат, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включенным в него фрагментом ДНК донора. Реципрокность генетических рекомбинаций у бактерий не может быть выявлена.

Рекомбинации подразделяют на законные и незаконные. Законная рекомбинация требует наличия протяженных, комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах. Она происходит только между близкородственными видами микроорганизмов. Незаконная рекомбинация не требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК.

Практическое значение имеют запрограммированные внутригеномные рекомбинации, при которых происходит только изменение локализации имеющихся генов. Они играют важную роль в изменении антигенной структуры

микроорганизмов и тем самым эффективно противостоят факторам иммунной защиты. Это относится к боррелиям, трипаносомам, малярийному плазмодию и другим микробам.

## **6. ПЦР. Достоинства и недостатки метода.**

Полимеразная цепная реакция заключается в многократной репликации определенной нуклеотидной последовательности. Реакция носит циклический характер и приводит к амплификации (умножению) только выбранного фрагмента ДНК.

Этапы реакции  
Выделение и очистка нуклеиновых кислот из пробы

Важнейшим преимуществом ПЦР является ее высокая чувствительность, позволяющая определять единичные молекулы инфекционных патогенов. Благодаря этому с помощью ПЦР можно диагностировать не только острые инфекции, сопровождающиеся присутствием в инфицированном организме большого количества возбудителей, но и хронические и латентные инфекции, а также заболевания со стертой, нетипичной клинической картиной

Высокая специфичность исследований (точность в обнаружении искомого генетического материала), а также возможность выявления возбудителей в довольно короткие сроки (в зависимости от целей — от 6 до 48 ч). Преимущества ПЦР позволяют быстро и точно проводить лабораторную генодиагностику и прямо у постели больного подтвердить или опровергнуть клинический диагноз.

В качестве исследуемого материала для ПЦР-диагностики могут использоваться любые биологические жидкости. Выбор биологического материала для исследований зависит от вида диагностируемой инфекции, ее локализации, течения и т.д.

## **7. Геном бактерий. Особенности организации и функционирования нуклеоида.**

Геном бактерий (нуклеоид) представлен кольцевой молекулой ДНК, которую часто называют бактериальной хромосомой. Для бактериального генома характерно объединение многих функционально связанных генов в т. н. опероны. В клетке могут присутствовать внехромосомные генетические элементы - ДНК плазмид, которые несут несколько полезных для бактерии генов (в т.ч. гены устойчивости к антибиотикам). Она может существовать автономно или временно включаться в хромосому. Иногда, в результате мутаций, эта ДНК теряет способность выходить из хромосомы и становится постоянным компонентом генома. Появление новых генов может быть обусловлено генетическим переносом в результате однонаправленной передачи ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент (аналог полового процесса). Такая передача может осуществляться при прямом контакте двух клеток (конъюгация), при участии бактериофагов (трансдукция) или путём попадания генов в клетку из внешней среды без межклеточного контакта. Всё это имеет большое значение для микроэволюции бактерий и приобретения ими новых свойств.

У бактерий ДНК упакована менее компактно, чем у эукариот и из кольцевой формы может лишь единожды спирализоваться.

## 8. Плазмиды бактерий Строение функции

Плазида - кольцевая молекула ДНК, несущая дополнительную генетическую информацию.

Плазида не несет жизненно необходимую информацию, но она, обычно, дает эволюционные преимущества.

Функции: F (fertility - плодовитость) - плазида несет гены, ответственные за формирование F-пилей и передачу информации при конъюгации. R (resistans - устойчивость) - плазида резистентности к антибиотикам и антимикробным химиопрепаратам. Col (colicin) - плазида, кодирующая синтез бактериоцинов. Hly - плазида, кодирующая синтез гемолизина

Криптическая - плазида, закономерно обнаруживаемая у микроорганизма, но функция ее не определена.

## 9. Изменчивость микроорганизмов ее формы и практическое значение.

Изменчивость может проявиться в виде адаптации, мутации и диссоциации.

Адаптация - самая распространенная форма изменчивости. Возникает она вследствие длительного приспособления организмов к различным условиям внешней среды, а также воздействию физических, химических, биологических и других факторов. Могут закрепляться наследственно и передаваться от одного поколения к другому.

В результате адаптации один и тот же вид микробов может дать несколько разновидностей и типов. Например, различают три типа туберкулезной палочки: человеческий, крупного рогатого скота и птицы. Имеет большое практическое значение для промышленности, медицины, ветеринарии и сельского хозяйства. Искусственным путем получены штаммы дрожжей, адаптированных к повышенной концентрации спирта в питательной среде, что позволяет увеличить выход спирта в процессе винного брожения.

Адаптированные вирусы широко применяют для получения высокоактивных вакцин, которые используют с целью предупреждения инфекционных болезней человека и животных. Например, детей против оспы прививают вирусом оспы человека, адаптированным к организму телят. Вирус оспы голубей используют для приготовления вакцины против оспы дифтерита кур.

Мутация - форма наследственной изменчивости организмов. Характеризуется внезапным появлением не свойственных данному виду микробов новых свойств. Микробы-мутанты отличаются от представителей исходного вида морфологическими признаками, физиологическими, биохимическими и биологическими особенностями. Различают естественно и искусственно вызванные мутации.

Искусственные мутации, у микробов получают путем воздействия на них лучистой энергии (ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, радиоактивных веществ) и некоторых химических соединений. Полученные полезные мутанты грибов и бактерий используют в биологической промышленности и виноделии. Диссоциация микробов относится к ненаследственной изменчивости (модификации). Ее отмечают у многих видов бактерий при выращивании их на искусственных питательных средах. Явления изменчивости особенно показательны при выращивании бактерий на плотной агаровой среде. При посеве чистой культуры бактерий часто вырастают разные по своему внешнему виду колонии.

## **10. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Предупреждение формирования и преодоление резистентности**

Лекарственная устойчивость микроорганизмов — способность микроорганизмов сохранять жизнедеятельность, включая размножение, несмотря на контакт с химиопрепаратами. Лекарственная устойчивость (резистентность) микроорганизмов отличается от их толерантности, при которой микробные клетки не гибнут в присутствии химиопрепаратов из-за уменьшенного количества аутолитических ферментов, но и не размножаются.

- создание новых химиотерапевтических средств, отличающихся механизмом antimicrobial действия (например, созданная в последнее время группа химиопрепаратов - фторхинолоны) и мишенями,
- постоянная ротация (замена) используемых в данном лечебном учреждении или на определенной территории химиопрепаратов (антибиотиков),
- комбинированное применение бета-лактамовых антибиотиков в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам),
- и главное - соблюдение принципов рациональной химиотерапии.

## **11. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Биохимические механизмы резистентности.**

Лекарственная устойчивость микроорганизмов — способность микроорганизмов сохранять жизнедеятельность, включая размножение, несмотря на контакт с химиопрепаратами. Лекарственная устойчивость (резистентность) микроорганизмов отличается от их толерантности, при которой микробные клетки не гибнут в присутствии химиопрепаратов из-за уменьшенного количества аутолитических ферментов, но и не размножаются.

Биохимические механизмы:

- Модификация мишени действия антибактериальных препаратов.
- Инактивация антибактериальных препаратов.
- Активное выведение антибактериальных препаратов из микробной клетки (эффлюкс).

- Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки. Формирование метаболического "шунта".

## **12. Лекарственная устойчивость микроорганизмов.**

### **Генетические механизмы резистентности.**

Лекарственная устойчивость микроорганизмов — способность микроорганизмов сохранять жизнедеятельность, включая размножение, несмотря на контакт с химиопрепаратами. Лекарственная устойчивость (резистентность) микроорганизмов отличается от их толерантности, при которой микробные клетки не гибнут в присутствии химиопрепаратов из-за уменьшенного количества аутолитических ферментов, но и не размножаются.

Генетически резистентность обусловлена двумя процессами: распространением генов, детерминирующих устойчивость, и распространением резистентных клонов микроорганизмов.

Механизмы. Мутации генов принято считать спонтанными, если они возникают не в результате специальной обработки клеток мутагенами. Частота спонтанных мутаций низкая, однако при огромном числе клеток в бактериальной популяции вероятность возникновения в каком-либо гене мутации, приводящей к превращению чувствительных к данному лекарственному препарату клеток в устойчивые, достаточно велика. Спонтанные мутанты, резистентные к тому или иному лекарственному препарату, постоянно появляются в популяции чувствительных клеток в отсутствие того препарата, к которому развивается резистентность

Открытие у бактерий способности включать дополнительный генетический материал с помощью процессов трансформации, трансдукции и конъюгации привело к пониманию того, что спонтанные мутации вносят совсем малый вклад в клиническую проблему лекарственной устойчивости.

## **13. Методы внутривидового типирования и его значение**

Методы внутривидовой дифференциации бактерий, базирующиеся на феномене бактериоциногении. Существуют два метода: 1) бактериоцинотипирование - метод основан на различной чувствительности бактерий к набору типовых бактериоцинов или бактериоциногенных штаммов; 2)

бактериоциногенотипирование - метод использует различия в типах продуцируемых бактериями бактериоцинов. Вторым принципом типирования применяют реже, т.к. бактериоциногенными является лишь часть популяции бактерий того или иного вида. Методика подобна фаготипированию 3-6-часовую бульонную культуру исследуемого штамма засевают газоном на чашку с 1,5% МПА и после подсушивания на поверхность газона наносят типовые бактериоцины (по капле, пастеровской пипеткой или градуированной бактериальной петлей). Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-20 ч и учитывают результаты по наличию зон отсутствия роста бактерий («стерильных» пятен) на месте нанесения бактериоцинов.

Результаты сопоставляют со схемой типирования и дают ответ. Если типовые

стандартные бактериоцины отсутствуют, используют типовые бактериоциногенные штаммы.

Значение: установление источника и путей распространения инфекций.

## **14. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Их достоинства и недостатки.**

Качественные методы

Диско-диффузионный метод

Для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам используют диски из специального картона, содержащие определенные количества препаратов. Количество препарата на диске соответствует его концентрации в сыворотке крови при использовании среднетерапевтических доз.

Достоинства метода: Простота постановки теста и учета результатов, Низкая стоимость, Доступность для любой диагностической лаборатории

Недостатки: Результат носит качественный характер, Может быть использован не для всех препаратов (особенности диффузии некоторых препаратов в агаре), Большое влияние "человеческого фактора" на конечный результат

Метод пограничных значений (break-point method)

Для реализации метода проверяют способность культуры к росту при двух (реже одной) концентрациях препарата. Указанные концентрации определяются на основании оценки резистентности циркулирующих штаммов.

Достоинства метода: Экономичность, Малая зависимость от квалификации персонала, Применим в случаях, когда препарат плохо диффундирует в агаре (метод стандартных дисков неприменим)

Недостатки метода: Определение носит качественный характер

Количественные методы

Метод серийных разведений в агаре

Посев испытуемых культур производят на чашки с различными концентрациями антибиотика. После инкубации определяют минимальную концентрацию препарата, при которой подавляется рост штамма - минимальная ингибирующая концентрация (МИК).

Достоинства метода: Количественная характеристика резистентности, Возможно отслеживать нарастание резистентности в популяции микроорганизмов,

Одномоментное определение резистентности большого количества штаммов к большому количеству препаратов (при использовании штампа-репликатора)

Недостатки метода: Высокая трудоемкость, большой объем подготовительной работы, Не удобен для работы с единичными штаммами.

Метод разведений в жидкой среде

Испытуемый штамм засевают в серию пробирок с бульоном, содержащим различные концентрации антибиотика. После инкубации учитывают результат. О наличии роста судят по помутнению среды (в некоторых случаях - по изменению окраски).

Определение проводят в обычных пробирках (макрометод) или в 96-ти луночных панелях (микрометод).

Достоинства метода: Количественная оценка резистентности, Простота учета, Возможность автоматизации постановки и учета при использовании 96-луночных панелей

Недостатки, Высокая трудоемкость (особенно при использовании макрометода)  
Метод градиентных полосок (E-test)

На специальную полоску последовательно нанесены разведения антибиотика, что позволяет создать градиент его концентрации в агаре. Образующаяся зона задержки роста "пересекает" тест-полоску в той точке, которая соответствует минимальной ингибирующей концентрации препарата.

Достоинства метода: Простой метод, доступный для практических лабораторий, Количественная характеристика резистентности.

Недостатки метода: Высокая стоимость, Большой расход питательных сред (на стандартную чашку Петри можно поместить только один тест)

## **15. Мутации. Классификация. Роль в изменчивости бактерий.**

Изменение молекулы ДНК, возникающее под действием различных причин, влечет за собой и изменение информации, которая в ней содержится. В результате таких мутаций у микроорганизмов появляются новые свойства, передающиеся по наследству. Мутации могут быть спонтанными и индуцированными, причины которых известны. Мутации чаще всего возникают при действии на микроорганизмы ультрафиолетовых лучей, различных химических соединений (иприт, деготь, минеральные масла), а также половых гормонов, веществ, стимулирующих рост бактерий. Получены штаммы микроорганизмов, являющиеся продуцентами антибиотиков в значительно большей степени, чем исходные культуры. Мутанты с ослабленной вирулентностью могут быть использованы как вакцинные для создания препаратов, предохраняющих от инфекционных заболеваний. В результате мутаций могут возникать штаммы, устойчивые к антибиотикам, химиотерапевтическим веществам и фагам.

Мутации приводят к появлению потомства клетки с новыми свойствами, так как все они контролируются генами. Бактерия, имеющая ДНК, отличную от ДНК исходной клетки, называется мутантом.

Если мутация полезна, мутанты выживают и имеют многочисленное потомство. Нет-погибает.

Обычно в культуре микроорганизмов мутации встречаются очень редко. У бактерий может измениться форма колоний, тогда диссоциация их явится одним из видов генетической изменчивости. Может изменяться морфология клетки, способность образовывать пигменты, споры, капсулы, жгутики.

## **16. Осложнения и побочные эффекты антибиотикотерапии. Меры профилактики.**

--Аллергические явления. Для профилактики аллергии часто прописывают совместно с антибиотиками противоаллергические препараты (чаще всего диазолин).

--Дисбактериоз-профилактика пробиотики, дает хороший эффект

--Токсические реакции: Многие антибиотики оказывают прямое токсическое действие на внутренние органы.

Многие антибиотики могут вызывать дефекты развития плода.

При внутривенном и внутримышечном введении могут быть болезненные ощущения в месте введения. Профилактика-дезинтоксикационная терапия, контроль состояния.

--Реакции обострения :В результате массивной гибели бактерий в крови повышается уровень токсинов(из клетки бак.), развивается общая интоксикация. Нарушение иммунитета. Нарушается формирование естественного иммунитета. После антибиотикотерапии существует большая вероятность повторного заболевания. принятия средств для повышения им.

## **17. Применение бактериофагов в медицине и микробиологии.**

Практическое использование бактериофагов.

1.Для идентификации (определение фаготипа). 2.Для фагопрофилактики (купирование вспышек).

3.Для фаготерапии (лечение дисбактериозов). 4.Для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.

## **18.Формы, биологическое значение ,выявления антагонизма у бактерий.**

## **19. Биопленки. Строение Роль в медицине.**

Биопленка — сообщество микробов, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов .

В природе биопленки распространены повсеместно. Формирование биопленок отмечено у большинства бактерий в природных, клинических и промышленных условиях. Они образуются в условиях текучести на границе двух средовых фаз (жидкость — жидкость, жидкость — воздух и т.д.). Биопленки обнаруживаются на твердых субстратах, погруженных в водный раствор, а также могут создавать плавающие маты на жидких поверхностях.

Роль.К настоящему времени достоверно доказана роль микробных биопленок в возникновении и развитии таких распространенных заболеваний, как инфекции, связанные с катетеризацией сосудов, вызванные *Staphylococcus aureus* и другими грамположительными микроорганизмами; инфекции сердечных клапанов и

суставных протезов, вызываемые стафилококками; пародонтит, обусловленный рядом микроорганизмов полости рта; инфекции мочевых путей, определяемые *E. coli* и др. патогенами; инфекции среднего уха — причина, например, *Haemophilus influenzae*, муковисцидоз, вызываемый *P. Aeruginosa* и др.

## Практические навыки

### Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам

Агар Мюлера-Хинтон (Похож на

МПА)

Суспензия культуры (на слюнь)

Диск с Аб-это диск из фильтровальной бумаги пропитанный Аб,концентрация

соответствует среднетерапевтической (это аб в плазме крови) далее инкубация.

Далее измеряется зона задержки роста  $d$  в мм сравнивают с экспертными таблицами)

Категории отношения м/о к Аб 1) Чувствительный (подавление м/о в конц. Терап диапазона)

2) Промежуточный/умеренно устойчивый (подавление только в предельной терап. Конц)

3) Устойчивые/резистентные

Достоинства метода

Простота постановки теста и учета результатов

Низкая стоимость

Доступность для любой диагностической лаборатории

Недостатки

Результат носит качественный характер

Может быть использован не для всех препаратов (особенности диффузии некоторых препаратов в агаре)

Большое влияние "человеческого фактора" на конечный результат

### **Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.**

Испытуемый штамм засевают в серию пробирок с бульоном, содержащим различные концентрации антибиотика. После инкубации учитывают результат. О наличии роста судят по помутнению среды (в некоторых случаях - по изменению окраски).

Определение проводят в обычных пробирках (макрометод) или в 96-ти луночных панелях (микрометод).

Достоинства метода 1)Количественная оценка резистентности 2)Простота учета 3)Возможность автоматизации постановки и учета при использовании 96-луночных панелей

Недостатки:Высокая трудоемкость (особенно при использовании макрометода)

### **Метод серийных разведений в плотной питательной среде.**

Посев испытуемых культур производят на чашки с различными концентрациями антибиотика. После инкубации определяют минимальную концентрацию препарата, при которой подавляется рост штамма - минимальная ингибирующая концентрация (МИК).

Достоинства метода 1) Количественная характеристика резистентности 2)Возможно отслеживать нарастание резистентности в популяции микроорганизмов 3) Одновременное определение резистентности большого количества штаммов к большому количеству препаратов (при использовании штампа-репликатора)

Недостатки метода 1)Высокая трудоемкость, большой объем подготовительной работы. Не удобен для работы с единичными штаммами.

### **Желточно-солевой агар.** Элективно-дифференциальная

С помощью желточно-солевого агара можно выявить наличие у стафилококков фермента **лецито- вителазы**. Желточно-солевой агар - это

элективно-дифференциальная среда. Питательная основа МПА Элективным фактором в ней является 10% NaCl (подавляет рост сопутствующей микрофлоры), дифференциальным - лецитин куриного желтка. Вокруг колоний стафилококков, продуцирующих лецитовителазу (фермент, расщепляющий лецитин), образуется зона помутнения (радужный венчик, «перламутровая зона»).

Назначение: Выделение стафилококков и дифференцировка по лецитовителазному признаку (*S. aureus* - lec+, остальные - lec-) с одновременным подавлением сопутствующей микрофлоры.

### **Молоко по Тукаеву.** Тип среды: ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ

#### **АНАЭРОБОВ**

Состав-Пептон+глюкоза+обезжиренное молоко(редуцирующий фактор)

#### **Рост анаэробов при посеве на молоко.**

Большинство анаэробов вызывают створаживание молока.

Для приготовления мазка стерильной бактериологической петлей берут содержимое пробирки со дна пробирки. Окрашивают по Граму. Клостридии представляют крупные Грам (+) палочки с непрокрашенными терминальными или субтерминальными

### **Сахарно-кровяной агар Цейслера.**

Тип среды: дифференциальная

Кровяной агар - обогащенная питательная среда для многих видов патогенных микроорганизмов, среда для определения гемолитических свойств микроорганизмов. Питательная основа - Мясо-пептонный агар; Дифференцирующее вещество - кровь (эритроциты)+глюкоза(дыхательный субстрат)

Эту среду можно инкубировать только в анаэроостате.

Поддерживает рост многих м/дифференцируя их по способности к гемолизу:

β-гемолиз расщепление мембран эритроцитов с просветлением вокруг колоний.

А-гемолиз распад гемоглобина за счет перекрестных соединений м/о, колоний окружены зеленым ореолом.

Гамма-гемолиз или отсутствие гемолиза

**Принцип действия** :Кровь является фактором роста, необходимым для многих требовательных микроорганизмов

Некоторые микроорганизмы обладают гемолитической активностью и способны образовывать колонии, окруженные зоной гемолиза.

Таким образом среда позволяет дифференцировать микроорганизмы по наличию и типу гемолиза

**Назначение**:Выделение и дифференцировка микроорганизмов по гемолитической активности. Выделение и культивирование требовательных микроорганизмов.

### **Селенитовый бульон**

Тип среды-сложная питательная среда с селективными свойствами.

Селенитовый бульон предназначен для выделения чистой культуры сальмонелл

Состав: панкреатический гидролизат казеина а-Д-лактоза ,натрия гидроселенит (без теллура) ,натрий гидрофосфат ,калий дигидрофосфат

Через 6 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)$  °С среда должна обеспечивать накопление сальмонелл не менее, чем в 5 раз и ингибицию роста кишечной палочки не менее, чем 1,5 раза. Готовая среда прозрачная, светло-желтого цветаЧерез 6 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)$  °С проводят высеивание на среду Эндо. Колонии сальмонелл через 18-20 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)$  °С бесцветные, прозрачные, круглые, диаметром 2,0-3,0 мм.

Среда содержит высокую концентрацию углеводов и низкую концентрацию пептического перевара животной ткани для того, чтобы образующиеся в ходе ферментации пептона амины не могли нейтрализовать кислоту, которая,

например, в небольшом количестве образуется при окислении углевода (2). Фосфат придает буферные свойства среде. Концентрация агар-агара позволяет определять подвижность микроорганизмов и способствует распространению кислоты в среде. Микроорганизмы, окисляющие углевод, продуцируют кислоту в аэробных условиях, а в анаэробных не растут и не образуют кислоту, тогда как ферментирующие образуют кислоту в обеих пробирках (в аэробных и анаэробных условиях).

### **Солевой агар**

Тип среды: Элективная

Состав: Питательная основа - питательный агар (мясо-пептонный агар)  
Элективный фактор - 10% хлорида натрия

Принцип действия: Высокая концентрация хлорида натрия подавляет рост большинства микроорганизмов. Стафилококки при концентрации соли 10% не подавляются и формируют на среде изолированные колонии.

Назначение: Выделение стафилококков с одновременным подавлением сопутствующей микрофлоры.

### **Солевой бульон.**

Тип среды: Обогажительная (с селективными свойствами)

Состав: Питательная основа - питательный бульон (мясо-пептонный бульон)

Элективный фактор - 10% хлорида натрия

Принцип действия: Высокая концентрация хлорида натрия подавляет рост большинства микроорганизмов. Стафилококки при концентрации соли 10% размножаются. Если в исходном материале стафилококков было мало, то после инкубации их концентрация увеличится и при высеве из накопительной среды на плотную мы получим рост колоний стафилококков.

Назначение: Накопление стафилококков с одновременным подавлением сопутствующей микрофлоры.

## **Среда Вильсона-Блер-ДИФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ**

плотная селективная питательная среда для анаэробных бактерий, содержащая сернистоокислый натрий и хлорное железо; анаэробные бактерии образуют колонии черного цвета в результате образования сернистого железа.

**Готовится из** питательного агара, к которому добавляют 1% глюкозы, хлорид железа и сульфит натрия. Анаэробные клостридии (*Clostridium perfringens*) образуют на среде колонии черного цвета за счет образования соединений железа с серой

Принцип действия

Глюкоза является дыхательным субстратом и используется в энергетических анаэробных процессах.

*C. perfringens* восстанавливает сульфит натрия до сульфида, который, взаимодействуя с ионами железа образует черное нерастворимое соединение - сульфид железа.

назначение

Обнаружение сульфитредуцирующих клостридий (в первую очередь *Clostridium perfringens*)

## **Среда Китт-Тароцци.**

**Среда Китта-Тароцци.** Готовится на основе бульона Хоттингера с добавлением кусочков печени или мяса и разливается по пробиркам. Используется в качестве среды накопления. После посева патологического материала для прекращения диффузии кислорода воздуха поверхность питательной среды заливают небольшим слоем вазелинового масла или расплавленного парафина.

Помещение в питательную среду кусочков печени, головного мозга, почек и других внутренних органов. При этом тканевые клетки активно поглощают и адсорбируют на себе кислород, в результате чего в среде создаются анаэробные условия. Примером питательной среды, сконструированной по этому принципу, является содержащая кусочки печени среда Китта-Тароцци.

### **Среда Плоскирева.**

**Тип среды** Элективно-дифференциальная

**Состав** Питательная основа - питательный агар (мясо-пептонный агар)

Дифференцирующий фактор - лактоза

Элективный фактор - соли желчных кислот

Индикатор - нейтральный красный

**Принцип действия:** Соли желчных кислот подавляют рост сопутствующей микрофлоры. Поскольку полного подавления не происходит, колонии вырастающих микроорганизмов можно дифференцировать по способности расщеплять лактозу. В питательной среде накапливаются кислые метаболиты. В кислой среде нейтральный красный окрашивает лактозоположительные колонии в красный (брусничный) цвет.

### **Среды «пестрого ряда»**

#### **Среда Эндо.**

Среда Эндо - плотная, сложная питательная дифференциально-диагностическая среда. Применяется для посева и выделения энтеробактерий. Состав: МПА - питательная основа; лактоза - дифференциальный фактор; фуксин, нейтрализованный гипосульфитом - индикатор pH. Принцип работы среды - если выросшие микроорганизмы

расщепляют лактозу, среда закисляется, pH меняется в кислую сторону, колонии будут окрашенными в тёмнокрасный цвет иногда с металлическим блеском. Так выглядят на этой среде колонии кишечной палочки. Шигеллы. сальмонеллы не расщепляют лактозу и поэтому их колонии окрашены в цвет среды.

### **Тиогликолевая среда**

**Тип среды:** Среда для анаэробов (обогащительная)

**Состав :** Питательная основа - питательный бульон (мясо-пептонный бульон) + 0,1% агар-агара

Дыхательный субстрат - глюкоза

Редуцирующий фактор - тиоловые соединения (тиогликолят натрия и цистеин)

**Принцип действия:** Глюкоза является дыхательным субстратом и используется в энергетических анаэробных процессах. Тиоловые соединения связывают токсичные формы кислорода и снижают окислительно-восстановительный потенциал среды. Небольшое количество агар-агара повышает вязкость среды и уменьшает насыщение среды кислородом в результате конвекции.

**Назначение:** Накопление анаэробных микроорганизмов.

### **Фаготипирование.**

**Фаготипирование** - один из методов эпидемиологического маркирования. Применяется для выявления источника инфекции. Выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.

При внутривидовой идентификации бактерий, т.е. при определении фаговара (фаготипа) бактерий с помощью фаготипирования, на чашку Петри с плотной питательной средой, засеянную чистой культурой возбудителя в виде газона, наносят капли различных диагностических ти-специфических фагов. Бактерии, чувствительные к фагу, лизируются (образуется стерильное пятно, бляшка, или так называемая негативная колония фага)

Фаготипирование микроорганизмов можно проводить двумя методами. Первый метод фаготипирования, наиболее часто применяемый в практике, основан на определении чувствительности исследуемой культуры к стандартным препаратам специфических бактериофагов, взятых в определённом разведении. Второй метод фаготипирования бактерий заключается в разделении их на группы по характеру выделяемых из культур умеренных фагов. В медицинской практике этот метод используется очень редко, а в ветеринарной – вообще не применяется.