

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--------------------------------------|----|
| Предисловие ко второму изданию | 7 |
| Предисловие к первому изданию | 8 |
| Список сокращений | 10 |

ОБЩАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

| | |
|---|-----|
| Занятие № 1. Правила работы и устройство микробиологической лаборатории. Методы микроскопии. Техника приготовления микроскопических препаратов. Простые и сложные методы окраски | 13 |
| Правила работы и устройство микробиологической лаборатории | 14 |
| Методы микроскопии. Техника приготовления микроскопических препаратов | 19 |
| Исследование микроорганизмов в окрашенном состоянии | 35 |
| Занятие № 2. Морфология бактерий. Ультраструктура бактериальной клетки. Исследование микроорганизмов в живом состоянии | 46 |
| Морфология бактерий | 46 |
| Ультраструктура бактериальной клетки | 48 |
| Исследование микроорганизмов в живом состоянии | 49 |
| Занятие № 3. Физиология, биохимия бактерий. Питательные среды. Этапы выделения и идентификации чистых культур аэробных и анаэробных бактерий | 54 |
| Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях | 55 |
| Особенности культивирования облигатно-анаэробных бактерий | 63 |
| Автоматизация микробиологических исследований | 71 |
| Краткая характеристика питательных сред | 77 |
| Занятие № 4. Генетика микроорганизмов. Изменчивость микроорганизмов. Бактериофаги | 89 |
| Генетические особенности бактерий | 90 |
| Бактериофаги | 95 |
| Занятие № 5. Основные группы химиотерапевтических препаратов. Антибиотики. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам | 101 |
| Антибактериальные препараты | 101 |
| Методы серийных разведений | 106 |

| | |
|--|------------|
| Диско-диффузионный метод | 108 |
| Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам | 113 |
| Занятие № 6. Стерилизация. Дезинфекция. Асептика, антисептика | 116 |
| Стерилизация | 116 |
| Дезинфекция | 124 |
| Асептика | 126 |
| Антисептика | 126 |
| Занятие № 7. Инфекция. Патогенность и вирулентность | 129 |
| Патогенность | 129 |
| Определение вирулентности микроорганизмов | 130 |
| Токсины микробов | 132 |
| Занятие № 8. Иммунная система организма. Виды иммунитета. | |
| Аллергия | 135 |
| Иммунная система организма | 135 |
| Лизоцим | 137 |
| Оценка кислородзависимой и кислороднезависимой фаз фагоцитоза | 138 |
| Методы исследования фагоцитарной активности нейтрофилов крови | 143 |
| Методы лабораторной диагностики аллергии | 145 |
| Занятие № 9. Основы серологических реакций | 152 |
| Биологические и иммунологические методы исследований | 152 |
| Серологические реакции | 167 |
| Занятие № 10. Иммунобиологические препараты | 180 |
| Вакцины | 180 |
| Сыворотки и иммуноглобулины | 184 |
| Схема описания иммунобиологического препарата | 185 |
| Перечень иммунобиологических препаратов, применяемых в Российской Федерации | 185 |

ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

| | |
|--|------------|
| Занятие № 11. Грамположительные кокки | 189 |
| Стафилококки | 189 |
| Стрептококки | 195 |
| Пневмококки | 195 |
| Занятие № 12. Грамотрицательные кокки | 204 |
| Менингококки | 204 |
| Гонококки | 210 |

| | |
|---|-----|
| Занятие № 13. Возбудители бактериальных кишечных инфекций | 215 |
| Эшерихии | 216 |
| Шигеллы | 222 |
| Сальмонеллы | 227 |
| Занятие № 14. Патогенные иерсинии и вибрионы | 241 |
| Возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза | 242 |
| Патогенные вибрионы | 245 |
| Занятие № 15. Возбудители клостридиозов | 251 |
| Возбудители столбняка | 252 |
| Возбудители газовой гангрены | 254 |
| Возбудители ботулизма | 257 |
| Возбудители энтеральных клостридиозов | 259 |
| Занятие № 16. Возбудители бактериальных инфекций дыхательных путей | 262 |
| Коринебактерии дифтерии | 263 |
| Патогенные микобактерии | 270 |
| Занятие № 17. Возбудители зоонозных инфекций — чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии | 278 |
| Возбудители чумы | 279 |
| Возбудители бруцеллеза | 282 |
| Возбудители туляремии | 284 |
| Бациллы сибирской язвы | 286 |
| Занятие № 18. Патогенные спирохеты | 294 |
| Возбудители сифилиса | 294 |
| Патогенные лептоспиры | 296 |
| Патогенные боррелии | 298 |
| Занятие № 19. Патогенные кампилобактеры и хеликобактеры | 303 |
| Кампилобактеры | 303 |
| Хеликобактеры | 306 |
| Занятие № 20. Патогенные риккетсии, микоплазмы и хламидии | 310 |
| Риккетсии | 310 |
| Микоплазмы | 313 |
| Хламидии | 316 |
| Занятие № 21. Основы медицинской микологии. | |
| Микробиология кандидозов | 321 |
| Грибы, патогенные для человека | 321 |
| Лабораторная диагностика микозов | 323 |

| | |
|--|------------|
| Занятие № 22. Основы санитарной микробиологии | 330 |
| Санитарно-микробиологическое исследование почвы | 330 |
| Санитарно-микробиологическое исследование воды | 332 |
| Санитарно-микробиологическое исследование воздуха | 333 |
| Занятие № 23. Санитарная микробиология пищевых продуктов. | |
| Пищевые токсикоинфекции и интоксикации | 336 |
| Санитарная микробиология мясных продуктов | 337 |
| Бактериологическое исследование консервов | 339 |
| Санитарно-микробиологическое исследование молока и молочных продуктов | 341 |
| Санитарно-микробиологическое исследование смывов с объектов внешней среды | 341 |
| Пищевые токсикоинфекции и интоксикации | 342 |

ОБЩАЯ И ЧАСТНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

| | |
|--|------------|
| Занятие № 24. Общая характеристика вирусов, методы вирусологических исследований | 347 |
| Правила работы в вирусологической лаборатории | 348 |
| Применение лабораторных животных | 350 |
| Культивирование вирусов на куриных эмбрионах | 353 |
| Культивирование вирусов на культурах клеток | 358 |
| Занятие № 25. Возбудители острых респираторных вирусных инфекций. Коронавирусы. Вирусы оспы и бешенства | 366 |
| Вирусы острых респираторных заболеваний | 366 |
| Коронавирусы | 369 |
| Вирус натуральной оспы | 375 |
| Вирус бешенства | 378 |
| Занятие № 26. Энтеровирусы. Вирусы гепатитов. | |
| Вирусы иммунодефицита человека | 382 |
| Кишечные вирусы | 382 |
| Вирусы гепатитов | 385 |
| Вирус иммунодефицита человека | 392 |
| Список литературы | 398 |

Занятие № 1

ПРАВИЛА РАБОТЫ И УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Знание и неукоснительное соблюдение правил работы с различными группами микроорганизмов являются гарантией отсутствия случаев внутрилабораторных заражений, а изучение техники приготовления микроскопических препаратов — основа микроскопического метода исследования.

Цель занятия

Ознакомление студентов с устройством микробиологических лабораторий, изучение правил работы в них, освоение техники приготовления и микроскопического исследования окрашенных препаратов.

Студент должен знать

1. Определение термина «микробиология». Задачи, достижения и проблемы данной научной сферы. Связь микробиологии с другими дисциплинами.
2. Принципы организации и оборудование микробиологической лаборатории.
3. Правила работы в микробиологической лаборатории.
4. Простые и сложные методы окраски бактерий.

Студент должен уметь

1. Содержать рабочее место в порядке.
2. Микроскопировать препараты, обнаруживать внутриклеточные включения, капсулы, элементы бактериальной клетки.
3. Работать с помощью иммерсионного объектива биологического микроскопа, с фазово-контрастной установкой и в темном поле.
4. Приготовить мазок-препарат, окрашенный простым способом по методам Грама, Циля–Нильсена.
5. Приготовить препараты для микроскопического исследования микроорганизмов в живом состоянии.

ПРАВИЛА РАБОТЫ И УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Микробиологические лаборатории входят в состав как лечебно-профилактических, так и санитарно-эпидемиологических учреждений. В лабораториях выполняются бактериологические, вирусологические, серологические и микологические анализы материалов, полученных от больных и контактных лиц, обследуются бактерионосители и проводятся санитарно-микробиологические исследования.

По степени опасности (патогенности) все микроорганизмы и вирусы разделены на 4 группы. Наиболее опасные отнесены к I и II группам. Работа с этими возбудителями проводится в специальных режимных лабораториях. Классификация, используемая Всемирной организацией здравоохранения, отличается от российской обратным порядком: микроорганизмы и вирусы наиболее высокой степени патогенности, наоборот, отнесены к IV группе.

Вирусологические лаборатории предназначены для исследований в интересах диагностики заболеваний вирусной, хламидийной и риккетсиозной природы.

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля обеспечивается необходимым для работы количеством помещений, что регламентируется санитарно-эпидемиологическими правилами: «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (СП 1.3.2322-08).

Микробиологические лаборатории, где проводят работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности, должны размещаться в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания. На входной двери лаборатории должны быть обозначены название (номер) лаборатории и международный знак «Биологическая опасность» (рис. 1).

Размещение лабораторий в жилых зданиях не допускается. Производственные лаборатории, проводящие работу с патогенными биологическими агентами III группы, должны располагаться в отдельно стоящих зданиях или изолированном блоке здания, имеющем отдельный вход, а производственные лаборатории, работающие с микроорганизмами IV группы, могут располагаться в изолированном блоке производственного корпуса.

Диагностические лаборатории должны иметь два входа: один — для сотрудников, другой — для доставки материала на исследование. Допускается получение материала через передаточное окно. Лабораторию необходимо обеспечить холодным и горячим водоснабжением, канализацией, электричеством, отоплением и вентиляцией. Все помещения лаборатории должны иметь естественное и искусственное освещение в соответствии с требованиями действующих нормативных документов. Лаборатории должны иметь набор рабочих и вспомогательных помещений (комнат). Набор помещений и их оснащение оборудованием могут варьироваться в зависимости от конкретных целей и задач лаборатории. Помещения лабораторий разделяют на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с микроорганизмами III–IV групп и их хранение, и «чистую» зону, где не проводят работы с микроорганизмами и не осуществляется их хранение.

В «чистой» зоне лабораторий должны располагаться следующие помещения:

- ▶ гардероб для верхней одежды;
- ▶ помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, моечная, комната приготовления и разлива питательных сред и др.);



Рис. 1. Знак «Биологическая опасность»

- ▶ помещение для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды (стерилизационная);
- ▶ помещение с холодильной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов;
- ▶ помещение для работы с документами и литературой;
- ▶ помещение для отдыха и приема пищи;
- ▶ кабинет заведующего;
- ▶ помещение для хранения и надевания рабочей одежды;
- ▶ подсобные помещения;
- ▶ туалет.

В «заразной» зоне должны размещаться:

- ▶ помещение для приема и регистрации материала (проб);
- ▶ боксированные помещения с предбоксами или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности;
- ▶ помещение для проведения бактериологических (вирусологических) исследований;
- ▶ помещение для проведения иммунологических исследований;
- ▶ помещение для люминесцентной микроскопии;
- ▶ помещение для проведения зооэнтмологических работ;
- ▶ помещение для гельминтологических исследований;
- ▶ помещение для работы с лабораторными животными (осуществление процессов заражения, вскрытия);
- ▶ помещение для содержания инфицированных лабораторных животных;
- ▶ помещение для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики);
- ▶ термостатная комната;
- ▶ помещение для обеззараживания (автоклава).

На границе «чистой» и «заразной» зон должен располагаться санитарный пропускник. При отсутствии водопровода и канализации устраивают местный водопровод, канализацию и очистные сооружения с устройствами для обеззараживания сточных вод.

В лаборатории устанавливают водопроводные раковины для мытья рук персонала и раковины, предназначенные для мытья посуды и инвентаря.

Помещения лаборатории оборудуют легко открываемыми фрамугами (форточками), которые в летнее время закрывают мелкоячеистыми сетками.

Стены в лабораторных помещениях облицовывают кафелем на высоту 1,5 м или красят масляной краской светлых тонов; в боксах и виварии стены и потолок красят масляной краской. Полы покрывают линолеумом, в боксах и виварии — гладкой плиткой.

Лабораторную мебель красят масляной или эмалевой краской светлых тонов, рабочие поверхности столов покрывают пластиком или другим материалом, не портящимся от применения дезинфектантов. Внутренние и наружные поверхности мебели должны быть без щелей и пазов, затрудняющих проведение дезинфекции.

Приборы, оборудование и средства измерений, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности. Температура воздуха в лабораторных помещениях поддерживается в пределах 18–21 °С, в районах с жарким климатом они оборудуются кондиционерами.

Помещения лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов.

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь закрепленное за ним рабочее место. Перед началом работы надевается спецодежда, которая хранится в индивидуальных шкафчиках отдельно от верхней одежды. Тип защитного костюма и частота его смены определяются в зависимости от характера работы.

Выполняя микробиологические исследования, необходимо соблюдать следующие правила:

- ▶ с инфицированным материалом работают только с помощью инструментов (пинцетов, петель, корнцангов и др.);
- ▶ прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках запрещается;
- ▶ перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды, проходимость игл и надежность поршней шприцев;

- ▶ при посеве материала делают надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с названием номера анализа (культуры) и даты посева;
- ▶ в пробирки и чашки Петри материал высевают вблизи от огня горелки с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки;
- ▶ во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, пробирки — в штативы;
- ▶ растворы, содержащие патогенные микроорганизмы, набирают пипеткой с помощью резинового баллона;
- ▶ насасывать ртом и переливать растворы из сосуда в сосуд через край нельзя;
- ▶ по окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфицированным материалом.

Доставлять инфицированный материал в лабораторию и переносить его из одной лаборатории в другую на территории учреждения нужно в специально приспособленной посуде (металлических биксах, ящиках, баках).

В комнатах, предназначенных для обработки и посева инфекционного материала, нельзя проводить другие работы, выращивать цветы, держать домашних животных.

Принимать пищу, пить, курить, хранить продукты питания в помещениях, где работают с материалом, зараженным патогенными микроорганизмами или подозрительным на такое заражение, запрещается.

Центрифугирование инфекционного материала проводит специально обученный персонал. Если в процессе центрифугирования разбивается пробирка, содержащая инфекционный материал, центрифугу отключают от сети, выжидают время для того, чтобы осели капли аэрозоля, дезинфицируют, а загрязненные места очищают.

Термостаты и термостатные комнаты, предназначенные для выращивания патогенных микроорганизмов, дезинфицируют не реже одного раза в месяц.

При хранении инфекционных материалов в холодильнике необходимо принимать меры, предупреждающие его инфицирова-

ние. Оттаивание холодильника, предусмотренное правилами эксплуатации, нужно совмещать с его дезинфекцией.

В лаборатории обязательно должна быть укомплектованная аптечка для экстренной медицинской помощи, включающая этиловый спирт, настойку йода, перевязочные средства, набор необходимых антибиотиков.

Использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят. Отработанные чашки Петри и пробирки с посевами патогенных культур, посуду с использованным материалом, взятым от инфекционных больных, собирают в банки с крышками и стерилизуют паром под давлением. Трупы зараженных животных помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором и по окончании рабочего дня сжигают в специальной печи (крематории) или автоклавируют в течение одного часа при температуре 120 °С. Бактерицидные лампы включают только в отсутствие персонала. Руки тщательно моют с туалетным мылом, вытирают вафельным полотенцем и смазывают защитным питательным кремом.

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В связи с малыми размерами большинства патогенных микроорганизмов (не более 2–30 мкм) изучение их морфологии возможно только с помощью специальных оптических приборов, получивших название микроскопы (от греч. *μικρος* — малый и *σκοπέω* — рассматривать, наблюдать). Они дают значительное увеличение и обладают высокой разрешающей способностью, то есть наименьшим расстоянием между двумя точками, дающими в поле зрения раздельное изображение.

Разрешающая способность человеческого глаза превышает 80 мкм. Размеры патогенных микроорганизмов меньше указанной величины, поэтому мы их не видим. Более того, микроорганизмы, расположенные друг к другу ближе 80 мкм, раздельно не воспринимаются. Современные микроскопы позволяют получать

раздельное увеличенное изображение микроорганизмов и других объектов и структур, не доступных невооруженному человеческому глазу.

В настоящее время в практике микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, исследовательский, электронный) и специальные методы микроскопии (темнопольный, фазово-контрастный).

Биологический микроскоп

Для микроскопических исследований применяют биологические микроскопы отечественных моделей: БИОЛАМ Р-11, БИОЛАМ Р-15, БИОЛАМ Р-17, БИОЛАМ С-11, БИОЛАМ П-1, БИОЛАМ И (микроскопы Р — рабочие, С — студенческие).

Современный биологический микроскоп — сложный оптический прибор, позволяющий изучать объекты в проходящем свете, в светлом и темном поле, а также в отраженном свете. Все эти микроскопы обеспечивают достаточно большое увеличение и высокую разрешающую способность (до 0,4 мкм).

Биологический микроскоп состоит из двух систем — механической и оптической (рис. 2).

Механическая система микроскопа включает: а) штатив; б) колонку; в) тубус (съёмный, наклонный — в современных моделях); г) подвижный предметный столик; д) макрометрический винт для грубой (ориентировочной) настройки на резкость; е) микрометрический винт, обеспечивающий тонкую фокусировку препарата; ж) револьвер для объективов.

Оптическая система микроскопа содержит две части — осветительную и наблюдательную. Осветительная часть состоит из зеркала и конденсора с ирисовой апертурной диафрагмой. Зеркало имеет две отражательные поверхности — плоскую и вогнутую. С помощью конденсора лучи, идущие от зеркала, фиксируются и направляются на препарат. Яркость освещения регулируется ирисовой диафрагмой.

Оптическую часть микроскопа составляют объектив и окуляр. В микроскопах с наклонным тубусом имеется специальная призма, направляющая лучи под углом 45° к вертикали.



Рис. 2. Устройство микроскопа

Объективы микроскопа отличаются сложным устройством и состоят из нескольких отдельных линз — фронтальной (нижней) линзы, увеличивающей объект, и коррекционных, исправляющих недостатки оптического изображения. Обычно применяют ахроматические объективы, в которых устранена хроматическая aberrация в отношении наиболее ярких цветов спектра (окрашивание изображения в различные цвета благодаря различной преломляемости лучей с различной длиной волны) и сферическая aberrация (нечеткое изображение периферических частей рассматриваемого предмета). Апохроматические объективы дают отчетливое, почти бесцветное изображение, поэтому они особенно

эффективны при микрофотографировании (в них достаточно устранен остаточный хроматизм и достигнута равномерность резкости и величины изображения в лучах с разной длиной волны). Подобную оптику имеет БИОЛАМ Р-17 (объективы-апохроматы $\times 10$, $\times 20$, $\times 60$, $\times 90$ МИ).

Объективы разделяют на сухие и иммерсионные (от лат. *immersio* — погружение). Обычно биологические микроскопы оснащают двумя сухими объективами ($\times 8$ и $\times 40$) и одним иммерсионным ($\times 90$ МИ), однако последние модели помимо указанных объективов оснащены более совершенной и разнообразной оптикой (БИОЛАМ Р-17 — апохроматами, БИОЛАМ И — планапохроматами). Данные о каждом объективе обозначены на его оправе; к ним относятся: а) показатель увеличения $\times 8$, $\times 40$, $\times 90$; б) численная (нумерическая) апертура; в) заводской номер объектива. Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы $\times 90$ ($\times 100$ БИОЛАМ И) имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или микроскоп), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

Фронтальная линза иммерсионного объектива имеет короткое фокусное расстояние — 1,5–3 мм. При микроскопии ее погружают в каплю предварительно нанесенного на препарат иммерсионного масла, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла — 1,52. При этом устраняются неизбежные потери света при попадании в объектив.

Окуляры состоят из двух линз: верхней — глазной и нижней — собирающей. На оправе окуляров обозначено увеличение: $\times 5$ (22 мм), $\times 7$ (18 мм), $\times 10$ (13 мм), $\times 15$ (11 мм). Окуляры подобны лупе и лишь увеличивают изображение, полученное объективом микроскопа.

Общее увеличение микроскопа определяют произведением увеличений объектива и окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом $\times 90$ и окуляром $\times 10$ составляет: $90 \times 10 = 900$ раз. Полезное увеличение микроскопа может достигать 1500 раз, в повседневной же практике обычно используют увеличение порядка 630–900 раз (рис. 3).