

СОДЕРЖАНИЕ

Авторский коллектив	5
Предисловие	6
Список сокращений и условных обозначений.....	7
Инструкция по технике безопасности и производственной санитарии для студентов, работающих на кафедре микробиологии.....	8
Введение	10
Модуль № 1. Морфология бактерий.	
Микроскопический метод	13
Теоретический обзор к модулю № 1	13
Лабораторный практикум № 1. Микроскопическое исследование препаратов. Окраска по Граму. Мазок по Бурри–Гинсу.	
Методы исследования микроорганизмов.....	23
Модуль № 2. Физиология бактерий.	
Дезинфекция и стерилизация	28
Теоретический обзор к модулю № 2	28
Лабораторный практикум № 2. Профилактика профессиональных вредностей в стоматологическом кабинете, отделении лечебно-профилактического учреждения. Изучение дезинфектантов и антисептиков. Знакомство с методами и аппаратурой для дезинфекции и стерилизации	37
Модуль № 3. Симбиоз, инфекция и антибиотики.	
Микробиота полости рта	39
Теоретический обзор к модулю № 3	39
Лабораторный практикум № 3. Изучение микробиоты ротовой полости, основные виды и свойства микробов. Получение соскоба зубного налета. Окраска микропрепаратов зубного налета. Культуральный метод и демонстрация антибиотикограмм (способ дисков)	46

Модуль № 4. Возбудители инфекционных заболеваний рта: бактерии, вирусы и грибы.	50
Теоретический обзор к модулю № 4	51
Лабораторный практикум № 4. Демонстрация микропрепаратов с возбудителями кариеса зубов, пародонтита, одонтогенной инфекции, кандидоза.	57
Модуль № 5. Иммуитет. Методы иммунодиагностики и иммунопрофилактики инфекционных болезней	60
Теоретический обзор к модулю № 5	60
Лабораторный практикум № 5. Демонстрация препаратов для специфической диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний (ампулы с диагностикумами, вакцинами, анатоксинами, сыворотками)	70
Ситуационные иллюстрированные задачи (для устного собеседования)	71
1. Иллюстрированное задание по теме модуля № 1. Морфология бактерий. Микроскопический метод	71
2. Иллюстрированное задание по теме модуля № 2. Физиология бактерий. Дезинфекция и стерилизация.	81
3. Иллюстрированное задание по теме модуля № 3. Симбиоз, инфекция и антибиотики. Микробиота полости рта	83
4. Иллюстрированное задание по теме модуля № 4. Возбудители инфекционных заболеваний рта: бактерии, вирусы и грибы.	86
5. Иллюстрированное задание по теме модуля № 5. Иммуитет. Методы иммунодиагностики и иммунопрофилактики инфекционных болезней	92
Задания в тестовой форме (для письменного контроля).	94
Практические задания	103
Справочная литература	104
Ответы к разделу «Задания в тестовой форме (для письменного контроля)»	105

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Авторы — сотрудники кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России

Редактор

Царев Виктор Николаевич — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой, заслуженный деятель науки РФ

Авторы

Царев Виктор Николаевич — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой, заслуженный деятель науки РФ

Балмасова Ирина Петровна — д-р мед. наук, проф., профессор кафедры

Ишполитов Евгений Валерьевич — д-р мед. наук, проф., профессор кафедры

Горелова Любовь Александровна — канд. биол. наук, доц., доцент кафедры

Ласточкин Александр Александрович — канд. мед. наук, доц., доцент кафедры

Мхитарова Лиана Александровна — канд. биол. наук, доц., доцент кафедры

Царева Татьяна Викторовна — канд. мед. наук, доц., доцент кафедры

Ягодина Елена Александровна — канд. мед. наук, доц., доцент кафедры

Кузнецова Юлия Александровна — старший преподаватель кафедры

Подпорин Михаил Сергеевич — канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представления о биологии микробов, их медицинском значении, способах распознавания у них патогенных свойств и методах борьбы с ними входят в ту категорию знаний, без которой невозможно становление любого медицинского работника, поскольку обеспечение качества и безопасности медицинской помощи — важнейшая стратегическая задача здравоохранения, неотъемлемой составляющей которой служит обеспечение инфекционной безопасности пациентов и медицинского персонала. Изучение мира микробов и вирусов на кафедрах микробиологии, вирусологии и иммунологии — не самоцель, а условие познания процессов взаимодействия человека с микробами.

Вместе с тем специфика работы в сфере стоматологии такова, что именно эти специалисты оказываются важнейшей группой риска инфицирования микробными возбудителями, которые способны широко распространяться среди людей через объекты внешней среды, а также их работа создает условия для неизбежного тесного контакта с биологическим материалом (слюной, слюзью, кровью) пациента. При этом сам специалист может служить источником инфицирования пациента, обратившегося за стоматологической помощью. Эти обстоятельства определяют необходимость включения в образовательную подготовку стоматолога любого профиля не только знаний, связанных с этиологией, патогенезом, клиникой, диагностикой и лечением инфекционных заболеваний, но и навыков соблюдения санитарно-гигиенического режима и мероприятий по профилактике внутрибольничных инфекций.

Все это определяет актуальность данного предмета для студентов колледжей, училищ и соответствующих факультетов медицинских вузов Российской Федерации — будущих ассистентов врача-стоматолога, стоматологов-гигиенистов и зубных техников.

*Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой
пропедевтики стоматологических заболеваний
и подготовки зубных техников, декан факультета
среднего профессионального образования
ФГБОУ ВО «Российский университет медицины»
Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор
С.Д. Арутюнов*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

*	— торговое наименование лекарственного средства и/или фармацевтическая субстанция
pH	— водородный показатель
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИСМП	— инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
РНК	— рибонуклеиновая кислота

ИНСТРУКЦИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ САНИТАРИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ, РАБОТАЮЩИХ НА КАФЕДРЕ МИКРОБИОЛОГИИ

В учебных лабораториях кафедры микробиологии на практических занятиях проводят работу с использованием сильнодействующих и ядовитых реактивов. Использование при работе красителей, растворов кислот и щелочей, горящих спиртовок при неаккуратных действиях может привести к порче имущества, одежды, ожогам кожи и слизистых оболочек. В микробиологической лаборатории возможна работа с инфицированным материалом, чистыми культурами микробов, попадание которых в большой дозе на кожу и слизистые оболочки может привести к заражению возбудителями гнойных и кишечных инфекций, а также дифтерии, туберкулеза. На занятиях по теме «Иммунитет» студентам необходимо помнить, что работа с сывороткой крови пациентов и другими биологическими материалами всегда представляет опасность инфицирования исследователя вирусами группы герпеса, парентеральных гепатитов (В, С, дельта, D, TTV) и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В связи с этим выделяют основные требования к работе в лабораториях кафедры: **ВНИМАТЕЛЬНОСТЬ, АККУРАТНОСТЬ, ОСТОРОЖНОСТЬ.**

1. Перед входом в лабораторию студент должен надеть халат и шапочку, личные вещи убрать в стол. Нельзя ставить на стол и на пол лаборатории сумки, рюкзаки и т.п. **КАТЕГОРИЧЕСКИ ЗАПРЕЩАЕТСЯ** находиться в лаборатории без спецодежды, принимать пищу, пить и курить. Курение на кафедре и в здании повсеместно запрещено.
2. На лабораторном столе студента должен быть минимум необходимых вещей, чтобы они не мешали работе. Студент обязан поддерживать порядок на столе во время работы, аккуратно и экономно обращаться с вверенным ему лабораторным имуществом

и материалом. В случае попадания инфицированного материала или реактивов на руки, халат, стол необходимо сообщить о случившемся преподавателю. При работе со спиртовками или газовыми горелками **КАТЕГОРИЧЕСКИ ЗАПРЕЩАЕТСЯ** перемещать горящие спиртовки/горелки или зажигать одну от другой.

3. По окончании работы студент обязан навести порядок на своем рабочем месте: вылить содержимое лотка в специальное ведро, вымыть лоток от красителей, сдать на стол преподавателя отработанный материал, демонстрационные препараты, протереть от иммерсионного масла объектив микроскопа.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ оставлять препараты (предметные стекла) на предметном столике микроскопа. После окончания работы необходимо выключить свет на столе и тщательно вымыть руки с мылом.

При работе с пациентом медицинский работник, стоматологический гигиенист, зубной техник обязан выполнять следующие условия.

1. При обследовании различных поражений в полости рта использовать перчатки, чтобы патогенные микробы не попали на кожу (возбудители сифилиса, гепатита В, ВИЧ и др.).
2. Для профилактики воздушно-капельных инфекций следует во время приема надевать защитную маску и периодически менять ее.
3. Следует рекомендовать пациенту перед осмотром прополоскать полость рта раствором антисептика [растворами водорода пероксида (Перекиси водорода[▲]), калия перманганата, хлоргексидина и др.].
4. Перед приемом нового пациента должен быть приготовлен стакан со свежим дезинфицирующим раствором.
5. Для защиты слизистой оболочки глаз от попадания распыленных частиц, в том числе микробов, при работе с турбинным наконечником следует надевать очки.
6. При мытье рук необходимо соблюдать следующие правила.
 - Использовать жидкое антисептическое мыло (на куске мыла многие бактерии остаются жизнеспособными).
 - Мыть руки теплой, а не холодной водой (для профилактики микротрещин кожи рук).
7. Закрывать все порезы, повреждения кожи рук перчатками, напальчниками или лейкопластырем.
8. Избегать микротравм ногтевого ложа.
9. Использовать на приеме только стерильные инструменты, наконечники, боры, одноразовые шприцы, чтобы исключить возможность переноса бактерий и вирусов от одного пациента другому.
10. Внимательно изучить историю болезни, анамнез жизни пациента, характер поражений.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология — наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов (мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, не видимых невооруженным глазом). Микробиология изучает всех представителей микромира. По своей сути микробиология — фундаментальная биологическая наука. Для изучения микроорганизмов она использует методы других наук, прежде всего физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии. Как и всякую науку, микробиологию подразделяют на общую и частную. Общая микробиология изучает закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на всех уровнях — молекулярном, клеточном, популяционном, а также генетику и взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой. Предметы изучения частной микробиологии — отдельные представители микромира в зависимости от проявления и влияния их на окружающую среду, живую природу, в том числе человека. К частным разделам микробиологии относят медицинскую, ветеринарную, сельскохозяйственную, техническую, морскую, фармацевтическую, космическую микробиологию.

Многочисленные открытия в области микробиологии, изучение взаимоотношений между макро- и микроорганизмами во второй половине XIX в. способствовали началу бурного развития иммунологии. Современная медицинская микробиология и иммунология достигли больших успехов и играют огромную роль в диагностике, профилактике и лечении инфекционных и многих неинфекционных болезней, связанных с нарушениями иммунной системы (онкологических и аутоиммунных болезней, трансплантации органов и тканей и др.).

Микробиология — важнейшая дисциплина, обеспечивающая диагностику инфекционных и многих неинфекционных болезней. Этим целям служат основные **методы микробиологического исследования**.

1. **Микроскопический метод** — изучение морфологии микробов с использованием специальной микроскопической техники.
2. **Культуральный метод** — получение чистых культур микробов и изучение их биологических свойств, позволяющее провести идентификацию, то есть определение вида микроба.
3. **Серологический метод** — выявление антител к возбудителям в биологических жидкостях организма больного (чаще — в сыво-

ротке крови, от лат. *serum* — сыворотка) как формы иммунного реагирования организма человека на микробного возбудителя.

4. **Аллергический метод** — оценка аллергических феноменов, возникающих в организме человека (на коже, слизистых оболочках или в крови) под действием компонентов или цельных клеток микроба-возбудителя.
5. **Биологический метод** — моделирование инфекционных процессов на лабораторных животных или куриных эмбрионах.
6. **Хемотаксономический метод** — изучение микробов по продуктам их жизнедеятельности непосредственно в организме человека (без предварительного культивирования на питательных средах, например при использовании газовой и газовой-жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии).
7. **Молекулярно-биологический метод** — изучение состава микробных нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции, секвенирования и гибридизации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), метагеномного анализа.

Воздух, которым мы дышим, вода во всех водоемах, почва, которая дает жизнь растительному царству, руда, из которой выплавляют металл, пищевые продукты — практически все вещи вокруг нас и мы сами густо населены микроорганизмами. Они живут в самой глубокой впадине океана и на высочайшей горной вершине на земле, их находят во льдах Арктики и Антарктиды и в горячих подземных источниках. Их обнаружили даже в пробах воздуха, взятых на высоте 85 км. В каждой капле воды их насчитывают миллионы, а в 1 г почвы — от 300–400 млн до 3 млрд. Прошло время, когда со словом «микроб» люди связывали лишь болезни и опустошения, эпидемии, уносившие миллионы жизней. Ныне многие знают, что есть и такие микробы, которые приносят людям пользу и бывают неумолимыми помощниками человека. Полезных микробов больше, чем вредных, об их значении мы и поговорим.

Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего, служат определяющими и необходимыми звеньями круговорота таких элементов, как углерод, азот, сера, фосфор, и других биогенных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе и жизнь на Земле стала бы невозможной.

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обуславливают почвообразовательные процессы. Микроорганизмы участвуют и в образовании гумуса, определяющего основное свойство почвы — плодородие. Микроорганизмы-редуценты — «санитары» природы. Они осуществляют разложение растительных и животных остатков и превращают их в минеральные вещества. Кроме того, микроорганизмы

способны осуществлять деградацию отдельных искусственно синтезированных человеком органических веществ — пестицидов, гербицидов, поверхностно-активных веществ, составляющих упаковочных материалов, нафталина, толуолов и др. Если бы это не происходило, ксенобиотики бесконтрольно накапливались бы в окружающей среде, загрязняя ее. Микроорганизмы принимают активное участие в биологическом самоочищении водоемов, выполняя функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ.

Человек с древних времен интуитивно использовал уникальные особенности микроорганизмов, даже не подозревая об этом. С давних пор процессы брожения применялись при приготовлении теста для хлеба, производстве пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов. Все эти процессы происходят при участии определенных микроорганизмов, которые присутствуют на используемых для брожения субстратах.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов позволило установить их способность к синтезу самых разнообразных соединений, имеющих большое народно-хозяйственное значение. В настоящее время с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах получают аминокислоты, витамины, ферменты, интерферон, инсулин, гормон роста человека, органические кислоты, этанол, глицерин, ацетон, бутанол, полисахариды, средства защиты растений, антибиотики, стероиды, каротиноиды, рибонуклеотиды, кортизон, преднизолон, гидрокортизон и другие ценные продукты. Достижения микробиологии находят практическое применение в металлургии для извлечения различных металлов из руд. Следует отметить, что еще есть большие возможности, основанные на применении микроорганизмов, для расширения и совершенствования биотехнологических процессов.

МОДУЛЬ № 1. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

Учебная цель

1. Получить представление о морфологии и классификации микробов.
2. Освоить технику микроскопирования с применением светового микроскопа с иммерсионной системой.
3. Изучить морфологию отдельных представителей бактерий, в том числе населяющих полость рта.
4. Ознакомиться с другими методами микроскопического исследования (фазово-контрастная, электронная, иммунолюминесцентная микроскопия и др.).
5. Получить представление об основных методах микробиологического исследования.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР К МОДУЛЮ № 1

Возникновение и последующее развитие микробиологии как науки неразрывно связано с исследованиями голландского естествоиспытателя Антони ван Левенгука. Будучи продавцом сукна, он в свободное от работы время увлекался модной тогда в Голландии шлифовкой стекол и конструированием линз. В 1673 г. он усовершенствовал микроскоп, ранее сконструированный английским физиком Робертом Гуком. Рассматривая с помощью изобретенного им микроскопа воду, налет с зубов, испражнения, кровь и другие объекты, А. Левенгук описал инфузории, лямблии, эритроциты, а также неизвестные образования шарообразной, палочковидной и извитой формы. Обнаруженных живых «зверушек» Левенгук назвал «анималькулюсами». Свои зарисовки и описания «анималькулюсов» он направлял в Лондонское королевское научное общество.

Эти описания сначала печатались в научных журналах, а в 1695 г. были изданы на латинском языке отдельной книгой под названием «Тайны природы, открытые Антони ван Левенгуком при помощи микроскопов». Микроскоп А. Левенгука имел увеличение в 150–300 раз, его разрешающая способность составляла 0,5 мк. Современные микроскопы имеют увеличение в 1000 раз, а разрешающую способность — 0,1–0,25 мк.

В связи с малыми размерами большинства патогенных микроорганизмов, служащих предметом исследования медицинской микробиологии, изучение их морфологии возможно только с помощью специальных оптических приборов, получивших название «микроскопы» (от греч. *mikros* — малый и *scopeo* — рассматривать, наблюдать). Они дают значительное увеличение и обладают высокой разрешающей способностью. Современные микроскопы позволяют получать раздельное увеличенное изображение микроорганизмов и других объектов и структур, недоступных невооруженному человеческому глазу.

Световая микроскопия. Световой микроскоп позволяет изучать микробы в проходящем свете, он состоит из механической (штатив, тубус, тубусодержатель, система винтов, предметный столик, револьвер для объективов) и оптической (окуляр, объективы, зеркало, конденсор) систем (**рис. 1**). Необходимо наличие источника света.

Световой микроскопии подвергают неживые фиксированные окрашенные объекты. Увеличению числовой апертуры и разрешающей способности объектива способствует использование иммерсионной системы, позволяющей создать единую систему между предметным стеклом и объективом.

Выпускают студенческие, лабораторные, исследовательские микроскопы.

Темнопольная микроскопия. Применяют для наблюдения живых неокрашенных микробов, она позволяет различать подвижные и неподвижные формы бактерий.

Микроскопия в темном поле основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля — свечение пылинок в воздухе темного помещения, в которое проникает узкий солнечный луч). Микроорганизмы также способны рассеивать свет.

Для темнопольной микроскопии используют обычные объективы и специальные темнопольные конденсоры (**рис. 2**). Краевые лучи, выходящие из темнопольного конденсора,



Рис. 1. Учебный световой микроскоп с иммерсионным объективом

проходят в косом направлении и не попадают в объектив, поэтому поле зрения микроскопа остается темным. В объектив попадают лучи, отраженные от объекта, в связи с чем в поле зрения можно наблюдать характерное изображение: на темном фоне ярко светятся микробные клетки.

Для темнопольной микроскопии используют сильные осветители. Изучают препараты типа «раздавленная капля», «висячая капля». Предметные стекла должны быть тонкими. Работа с темнопольным конденсором осуществляется в определенной последовательности.

Исследование нативного материала в неокрашенном состоянии дает возможность сразу, в присутствии пациента, ориентировочно оценить состояние патологического процесса.

Фазово-контрастная микроскопия. Метод фазового контраста позволяет наблюдать слабоконтрастные биологические объекты в неокрашенном состоянии, получая при этом их контрастное изображение. Фазово-контрастный микроскоп дает возможность преобразовывать невидимые фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные, различимые глазом.

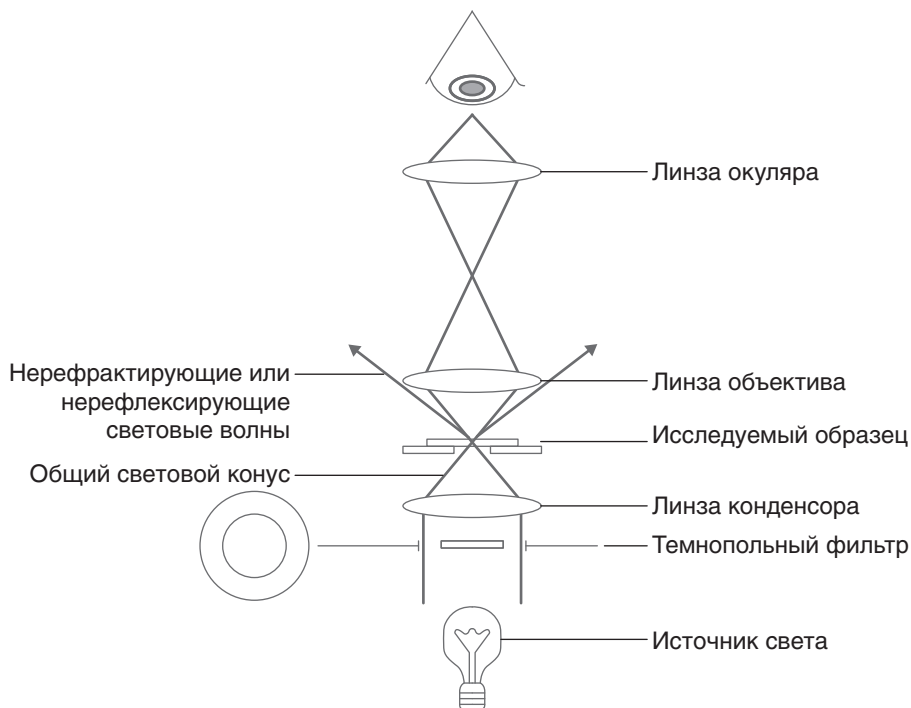


Рис. 2. Схема устройства микроскопа для темнопольной микроскопии

Фазово-контрастное устройство может быть установлено на любом световом микроскопе. В его комплект входят следующие детали (рис. 3):

- набор объективов с фазовыми пластинками;
- фазово-контрастный конденсор;
- вспомогательный микроскоп малого увеличения, которым заменяют окуляр при настройке освещения.

Перед работой осуществляется настройка фазового контраста. Готовят влажные препараты типа «раздавленная капля», «висячая капля». При этом способе микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов, а также некоторых элементов их внутренней структуры резко увеличивается (рис. 4), и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст). В России для позитивного фазового контраста выпускают устройство КФ-4.

За изобретение фазово-контрастной микроскопии его автор, голландский физик Цернике, был удостоен Нобелевской премии.



Рис. 3. Фазово-контрастная насадка