



**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения России**

Кафедра микробиологии

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
для самостоятельной работы ординаторов, обучающихся по
специальности 31.08.77 Ортодонтия.
Дисциплина «Микробиология».**

Рязань, 2018

УДК 576.8 (075.83)

ББК 28.4

М 545

Рецензенты: **Т.Д. Здольник**, д.м.н., заведующий кафедрой эпидемиологии;
С.А. Шустова, к.м.н., доцент кафедры патофизиологии.

Составители: **О.В. Евдокимова**, к.м.н., заведующий кафедрой микробиологии;
Т.М. Гусева, к.с/х.н., доцент кафедры микробиологии;
А.В. Санкин ассистент кафедры микробиологии.

М 545 Методические указания для самостоятельной работы ординаторов, обучающихся по специальности 31.08.77 Ортодонтия по дисциплине «Микробиология» /сост.: О.В Евдокимова [и др.]. – Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2018. – 21с.

Методические указания по дисциплине «Микробиология» разработаны в соответствии с требованиями образовательного стандарта (ФГОСЗ+ ВО, 2016). Учебно-методический материал к лабораторному занятию включает описание целей занятия, материально-техническое оснащение, перечень вопросов для самоконтроля и видов самостоятельной работы, выполняемой на кафедре, список литературы, рекомендуемой для подготовки ординаторов к практическим занятиям. Методические указания предназначены для формирования у ординаторов общекультурных и профессиональных компетенций. Методические указания обсуждены на заседании кафедры (протокол №4 от 25.10.18). Утверждены на УМС ФГБОУ ВО РязГМУ от _____, протокол №____, и рекомендованы к использованию в учебном процессе.

Табл.: Библиограф.:

УДК 576.8 (075.83)

ББК 28.4

©ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2018

Тема занятия: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

цели: знать способы приготовления микропрепаратов для микроскопии с иммерсией, цель и способы фиксации, окраску по Граму.

Контрольные вопросы.

1. Особенности микробов как объектов исследования?
2. Каковы задачи медицинской микробиологии?
3. Для чего в микробиологических лабораториях соблюдается специальный режим работы?
4. Как приготовить препарат для микроскопического исследования? Для чего и как проводят фиксацию мазков?
5. В чем состоит принципиальное различие простых и сложных методов окраски микропрепаратов? Приведите примеры.
6. Почему метод Грама относится к дифференциальным методам окраски? В чем его сущность? Приведите примеры Грам+ и Грам- бактерий.
7. Механизм иммуноферментного анализа (ИФА). Разновидности, ингредиенты, учетные признаки ИФА.
8. Практическое применение ИФА?
9. Назовите учетные признаки РН, поставленной по типу цветной пробы, объясните механизм изменения цвета среды 199.
10. Что называют серологическими реакциями? Для чего их применяют?
11. Какая фаза серологической реакции наступает раньше: специфическая или неспецифическая? В чем их сущность?
12. Как получают и используют антимикробные диагностические сыворотки? Что означает их титр?
13. При каких заболеваниях реакция нейтрализации используется с диагностической целью?

Выполнение самостоятельной работы.

1. Приготовить микропрепарат из чистой культуры микроорганизмов.
2. Окрасить микропрепарат по Граму.
3. Микроскопировать демонстрационные микропрепараты, определить морфологию и тинкториальные свойства бактерий.
4. Записать схему постановки РСК. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты.
5. Записать схему постановки РТГА с целью серодиагностики гриппа. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты.
6. Записать схему постановки РН (по типу цветной пробы) с целью серодиагностики полиомиелита. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты.
7. Записать образец направления крови на серодиагностику.

8. Записать схему постановки развернутой (пробирочной, объемной) РА при серодиагностике брюшного тифа с целью определения титра антител к возбудителю заболевания. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты
9. Записать схему постановки РПГА для выявления антител к возбудителям дизентерии. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты
10. Поставить РА на стекле с неизвестной чистой культурой Грам- палочек и адсорбированными сыворотками к шигеллам Флекснера и Зонне. Определить вид микроба по результатам реакции
11. Записать схему постановки ИФА с целью серодиагностики и идентификации неизвестного антигена. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты.
12. Записать схему постановки прямой и непрямой РИФ с целью идентификации неизвестного антигена. Отметить в протоколе необходимые ингредиенты.
13. Оформить протокол.

Правила оформления протокола.

1. Ответить письменно на контрольные вопросы.
2. Графически изобразить этапы окраски по Граму.
3. Зарисовать демонстрационные микропрепараты, дать характеристику морфологии и тинкториальным свойствам бактерий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Правила работы в микробиологической лаборатории.

1. Работа с инфекционным материалом требует особой тщательности и соблюдения правил личной и общественной безопасности при ее выполнении.
2. В помещении лаборатории необходимо строго соблюдать чистоту и порядок. На рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов. Запрещается прием пищи, излишние разговоры, суета.
3. Работа в лаборатории обязательно проводится в халате, шапочке, сменной обуви.
4. Каждый студент имеет в лаборатории свое постоянное рабочее место.
5. Материалы для работы принимает дежурный у лаборанта и раздает студентам в присутствии преподавателя.
6. Все предметы, использованные при работе с живой культурой, обезвреживаются в дезинфицирующих растворах или в пламени горелки.
7. В конце занятия студенты сдают весь материал лаборанту или преподавателю.
8. В конце лабораторной работы студент должен:
 - привести в порядок свое рабочее место, световой микроскоп.
 - обработать руки дезинфицирующим раствором, а затем вымыть с мылом.

Правила работы с живой культурой микроорганизмов.

1. Требование безопасности при посеве живой культуры микроорганизмов – это оградить посев от посторонних микробов и распространение культуры микроорганизма с питательной среды во внешнюю среду.
2. Работать следует быстро, без резких движений, усиливающих колебания воздуха.
3. Во время посевов нельзя разговаривать, перемещаться по лаборатории.
4. Вся посуда и оборудование, подвергшиеся контаминации во время работы с культурой, обрабатываются прожиганием в пламени газовой горелки (спиртовки) или погружения в емкость с дезинфицирующим средством.
5. По окончании посевов рабочие поверхности столов подвергаются дезинфекции, обрабатываются руки.
6. Лабораторная посуда с посевами помещается в термостат: пробирки в штативе, а чашки Петри переворачивают дном вверх.

Приготовление микропрепарата для световой микроскопии с иммерсией.

1. Предметное стекло стерилизуют в пламени газовой горелки. Восковым карандашом отмечают пределы будущей мазки в виде окружности диаметром 1-2 см и кладут стекло на стеклянную подставку на лотке. Прокаленной в пламени газовой горелки петлей вносят в середину кружка каплю стерильного физиологического раствора. Затем прокаленной петлей вносят небольшое количество культуры бактерий с питательного агара в пределах окружности, готовят мазок в пределах кружка. Петлю обеззараживают прожиганием.
2. Стекло оставляют на воздухе до полного высыхания (исчезновения влаги).
3. Проводят фиксацию микропрепарата; фиксируют для того чтобы убить микробы, прикрепить микробы к стеклу, повысить восприимчивость к красителям. Для фиксации предметное стекло трижды накладывают на пламя горелки в верхней части на 2 секунды с интервалом 4 секунды, (суммарно в пламени 6 секунд).

Метод окраски по Граму. Этот метод позволяет все микроорганизмы разделить на две группы: грамположительные (Гр+) и грамотрицательные (Гр-). Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в красный. Сущность окраски по Граму состоит в том, что отношение к краскам зависит от химического состава клеточной стенки бактерий. В составе клеточной стенки грамположительных микроорганизмов большое количество муреина, воздействие этиловым спиртом вызывает его разбухание, что приводит к уменьшению диаметра пор и снижению проницаемости клеточной стенки.

Схема выделения чистой культуры аэробов.

1-й день. Микроскопия микропрепарата из исследуемого материала, окрашенного по Граму с целью ознакомления с микрофлорой исследуемого материала и ориентировочного выбора питательной среды. Посев исследуемого материала бактериальной петлей на чашку с питательной средой по секторам для механического разобщения микробных клеток и получения изолированных колоний. Инкубирование посевов в термостате при $t +37^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

2-й день. Изучение культуральных свойств выросших колоний и отбор изолированных колоний. Микроскопия мазков из части изолированных колоний, окрашенных по Граму для проверки чистоты выросшей колонии. Пересев изолированной колонии на скошенный питательный агар для накопления и сохранения чистой культуры. Инкубирование посевов в термостате при $t +37^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

3-й день. Изучение готовых посевов на скошенном ПА. Микроскопия мазков со скошенного ПА, окрашенных по Граму; просмотр нескольких полей зрения.

Серологические методы диагностики инфекционных заболеваний.

Серологические исследования — это методы изучения определенных антител или антигенов в сыворотке крови больных, основанные на реакциях иммунитета. С их помощью также выявляют антигены микробов или тканей с целью их идентификации.

Обнаружение в сыворотке крови больного антител к возбудителю инфекции или соответствующего антигена позволяет установить причину заболевания.

Серологические исследования применяют также для определения антигенов групп крови тканевых антигенов и уровня гуморального звена иммунитета.

Серологические исследования включают:

1. Реакцию агглютинации.
2. Реакцию преципитации.
3. Реакцию нейтрализации.
4. Реакцию с участием комплемента.
5. Реакцию с использованием меченых антител или антигенов и т.д.

Реакция агглютинации — простая реакция склеивания корпускулярных антигенов с помощью антител. Различают: прямые реакции агглютинации, которые используют для выявления антител в сыворотке крови больного. Добавление взвеси убитых микробов к сыворотке больного вызывает образование хлопьевидного осадка (положительная реакция склеивания микробов антителами). Используется для диагностики брюшного тифа, паратифа и т.д. Реакция пассивной или непрямой гемагглютинации основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами

сыворотки крови больных приводит к образованию фестончатого осадка из эритроцитов. Реакция коаггутинации — разновидность реакции агглютинации, в которой антигены возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой.

Реакции преципитации — реакции, в которых происходит осаждение комплекса антиген-антитело. Антиген в данном случае должен быть растворимым. Комплекс антиген-антитело называется преципитатом. Реакцию ставят путем наслоения раствора антигена на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении антиген-антитело на границе этих растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Наибольшее распространение получила реакция преципитации в полужидком геле агара (двойная иммуно-иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.). Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента.

Реакция нейтрализации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки или ткани. При отсутствии повреждающего эффекта комплекса антител и микробов или их токсинов на культуру клеток говорят о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело.

Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента в результате присоединения его к комплексу антиген-антитело. Если комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент присоединяется к комплексу эритроцит-антиэритроцитарное антитело, вызывая тем самым гемолиз (разрушение) эритроцитов. Применяется для диагностики инфекционных болезней, например, сифилиса.

Реакция с использованием меченых антител или антигенов основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками, мечеными флюорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции).

Имуноферментный анализ. В имуноферментном анализе вместо флюорохромов иммунную сыворотку можно метить ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Реакцию оценивают по окрашиванию раствора в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфотаза) цвет после добавления субстрата.

Радиоиммунологический метод — количественное определение антител или антигенов, меченых радионуклидами, с применением аналогичных антигенов или антител. Методы применяют для выявления антигенов микробов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и концентрации

иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction) – метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце. Образование нуклеотидной цепи осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Однако для начала работы ферменту необходима стартовая площадка. В качестве площадок выступают "праймеры" (затравки) - синтетические олигонуклеотиды длиной 15-20 нуклеотидов. Праймеров должно быть два (прямой и обратный), они комплементарны участкам ДНК-матрицы и именно фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, будет многократно копироваться ДНК-полимеразой. Работа полимеразы заключается в последовательном добавлении нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК-матрицы. Тем самым в одном температурном цикле вновь синтезируется два новых фрагмента ДНК (т.к. молекула ДНК - двуцепочечная, то и матриц изначально две). Таким образом, за 25-35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, определенного праймерами. Структуру отдельного цикла можно представить следующим образом:

1. денатурация ДНК (плавление, расхождение цепей ДНК) - 95°C - 1 или 2 минуты;
2. отжиг праймеров (затравки связываются с ДНК-матрицей, температура данной стадии определяется нуклеотидным составом праймера) - 60°C (к примеру) - 1 минута;
3. элонгация ДНК (полимераза синтезирует цепь ДНК) - 72°C - 1 минута (время зависит от длины синтезируемого фрагмента).

Темы для рефератов

1. Современные методы микроскопических исследований в стоматологии.
2. Разнообразие микробов полости рта.
3. Современные методы окраски микроорганизмов.
4. Методы микробиологического исследования в стоматологии.
5. Применение бактериологического метода исследования в стоматологической практике.
6. Серологические исследования в стоматологии.

Тема занятия: ПАРАДОНТОПАТОГЕННЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ.

цели: знать морфологические и физиологические особенности облигатно анаэробных бактерий, факторы вирулентности, источники и механизмы заражения человека; методы микробиологической диагностики; препараты для лечения и профилактики; *уметь обосновать* выбор методов

исследования, материала, особенностей его забора и доставки в лабораторию, уметь написать направление на исследование материала, интерпретировать результаты исследований.

Контрольные вопросы.

1. Каков принцип газовой-хроматографического метода диагностики неклостридиальных раневых анаэробных инфекций?
2. Как правильно отобрать и транспортировать клинический материал для бактериологического исследования от больного с подозрением на анаэробную инфекцию?
3. Какова роль облигатно анаэробных бактерий в развитии заболеваний пародонта.
4. Дайте характеристику биологическим свойствам *Porphyromonas gingivalis*.
5. Дайте характеристику биологическим свойствам *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Выполнение самостоятельной работы

1. Изучить морфологию *Clostridium* spp., *Tannerella* spp., *Porphyromonas* spp., *Aggregatibacter* spp. (по демонстрационным таблицам и микропрепаратам).
2. Познакомиться со схемой микробиологического исследования при анаэробных инфекциях.
3. Изучить микропрепарат из раневого отделяемого (окраска по Граму).
4. Изучить характер роста возбудителей в демонстрационных посевах (на лакмусовом молоке, средах Вильсона-Блера, тиогликолевой, в высоких столбиках сахарного агара).
5. Учесть демонстрационный опыт изучения лецитиназной активности экзотоксина.
6. Изучить набор иммунобиологических препаратов, применяемых для диагностики, специфического лечения и профилактики раневых анаэробных инфекций.
7. Решение ситуационных задач.
8. Оформить протокол.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Актиномикоз челюстно-лицевой локализации. Актиномикоз – инфекционное заболевание, при котором могут поражаться все ткани и органы, но чаще в 80-85% случаев челюстно-лицевая область. Основным механизмом в развитии актиномикоза является снижение или нарушение иммунобиологической реактивности и антиинфекционной резистентности организма. В развитии актиномикоза большое значение имеют местные

патогенетические причины – одонтогенные, реже – тонзиллиты и риногенные воспалительные заболевания, механические повреждения тканей, нарушающие симбиоз актиномицетов с аэробной и облигатно-анаэробной микрофлорой. При актиномикозе развиваются нарушения специфического иммунитета и патологические иммунные реакции, из которых ведущими являются аллергические реакции. Входными воротами актиномицетов при поражении тканей и органов челюстно-лицевой области являются кариозные зубы, патологические зубодесневые карманы, поврежденная и воспаленная слизистая оболочка полости рта, зева, носа, протоки слюнных желез и др. Актиномицеты от места внедрения распространяются контактным, лимфогенным и гематогенным путями. Специфический воспалительный очаг развивается в хорошо васкуляризованных тканях: рыхлой клетчатке, соединительно-тканых прослойках мышц, где актиномицеты образуют колонии – друзы. Развитие клинических симптомов заболевания зависит от реактивности макроорганизма и локализации специфической гранулемы в тканях челюстно-лицевой области.

Кожная форма актиномикоза встречается сравнительно редко. Заболевание возникает в результате распространения одонтогенной инфекции или повреждения кожного покрова. На небольшом участке кожи щеки, поднижнечелюстной области формируется воспалительный инфильтрат, кожа над инфильтратом истончается, цвет кожи меняется с ярко красного до бурого-синего. В одних случаях на коже лица и шеи преобладают пустулы, заполненные серозным или гнойным отделяемым, в других – бугорки, содержащие грануляции, встречается сочетание пустул и бугорков.

Подкожная форма актиномикоза характеризуется развитием патологического процесса в подкожной клетчатке, как правило, вблизи гнойного одонтогенного очага инфицирования. Подкожная форма также развивается на фоне поражения надчелюстных или шейных лимфатических узлов, их распада и вовлечения в процесс подкожной клетчатки.

Подслизистая форма актиномикоза и актиномикоз слизистой оболочки полости рта возникает при повреждении целостности слизистой оболочки полости рта: попадании инородных тел, травме острыми краями зубов или прикусывании.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

№14 Бактериологическая лаборатория	Исследуемый материал: кровь
	Диагноз: одонтогенный сепсис
	Гр. Баев И.Ф. Возраст 40 лет
	Адрес: с. Выселки Клепик. р-на Ряз. обл.
	По поручению инф. отд. б-цы Семашко Врач Иванова М.И.

	№ 164 «17» января 2014 12 часов 30 минут
Результат исследования	Выделен <i>S.perfringens</i> Врач – Иванов А.С.

1. Метод исследования, охарактеризуйте его принцип.
2. Диагностические критерии для подтверждения клинического диагноза.
3. Срок выдачи результата лабораторией.
4. Необходимость в дополнительном исследовании.

№15 Бактериологическая лаборатория	Исследование – фаготипирование <i>S. aureus</i>
	Диагноз: одонтогенный сепсис
	Гр. Баев И.Ф. Возраст 40 лет
	Адрес: с. Выселки Клепик. р-на Ряз. обл.
	По поручению инф. отд. б-цы Семашко
	Врач Иванова М.И.
	№ 164 «17» января 2014 12 часов 30 минут
Результат исследования	Штамм <i>S. aureus</i> выделенный от больного имеет фаготип 77/80. Штамм, выделенный от медсестры Петровой К.А. имеет фаготип 77/80. Врач – Иванов А.С.

1. Метод исследования, охарактеризуйте его принцип.
2. Диагностические критерии для подтверждения клинического диагноза.
3. Срок выдачи результата лабораторией.
4. Необходимость в дополнительном исследовании.

Темы для рефератов

1. Основные этиологические факторы развития пародонтопатогенных заболеваний.
2. Современные представления об актиномикозе в стоматологии.
3. облигатные анаэробы в стоматологии.
4. Методы забора и правила работы с материалом при пародонтопатогенных заболеваниях.

Тема занятия: ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ

цели: знать морфологические и физиологические особенности возбудителей слизистой оболочки полости рта, факторы вирулентности, источники и механизмы заражения человека; методы микробиологической диагностики; препараты для лечения; *уметь* обосновать выбор методов исследования, материала, особенностей его забора и доставки в лабораторию, уметь написать направление на исследование клинического материала, интерпретировать результаты исследований. морфологические и физиологические особенности грибов *Candida* spp., факторы вирулентности, источники и механизмы заражения человека; методы микробиологической диагностики; антимикробные препараты для лечения; *уметь* обосновать выбор методов исследования, материала, особенности его отбора и доставки в лабораторию, уметь написать направление на исследование клинического материала, интерпретировать результаты исследований

Контрольные вопросы.

1. Дайте определение понятию “стоматит”. Особенности классификации стоматитов по клиническим проявлениям.
2. Какие виды спирохет обитают на слизистой оболочке полости рта в норме. Охарактеризуйте их биологические свойства.
3. Назовите особенности поражения слизистой полости рта спирохетами: клинические проявления, локализацию.
4. Какой патологический процесс называют гингивостоматитом Венсена. Перечислите причины.
5. Назовите метод диагностики гингивостоматита Венсена, диагностические критерии.
6. Дайте характеристику морфологическим особенностям грибам рода *Candida*. Назовите особенности культивирования грибов рода *Candida*.
7. Перечислите виды грибов, имеющих наибольшее медицинское значение. Как дифференцируют различные виды грибов *Candida*?
8. Какова диагностическая значимость микроскопического метода исследования при диагностике кандидозного стоматита? Какие существуют клинические формы кандидоза слизистой оболочки полости рта?
9. В чем сущность микологического метода исследования при кандидозе?
10. Назовите основные принципы лечения кандидоза.
11. Какие антимикробные препараты используют при лечении кандидозного стоматита?

Выполнение самостоятельной работы

1. Изучить морфологию спирохет, возбудителей язвенно-некротического гингивостоматита (по демонстрационным таблицам и микропрепаратам). Зарисовать трепонемы в тушевом препарате (окраска по Бурри).
2. Изучить микропрепарат, приготовленный с язвенных поражений слизистой десны. Отметить доминирующую ассоциацию бактерий в клиническом материале - *Fusobacterium*spp. и *Spirochetes*.
3. Познакомиться со схемой микологической диагностики при кандидозе.
4. Рассмотреть и зарисовать демонстрационные микропрепараты:
 - а) грибы *Candida* spp. в чистой культуре (окраска фуксином)
 - б) блок с хламидоспорагаром (нативный)
5. Изучить характер роста грибов на специальных питательных средах (плотных и жидких).
6. Взять исследуемый материал тампоном со слизистой оболочки ротовой полости и посеять его на среду Сабуро.
7. Приготовить микропрепараты из чистой культуры грибов рода *Candida*, окрасить фуксином, микроскопировать, зарисовать.
8. Решение ситуационных задач.
9. Оформить протокол.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Язвенно-некротический гингивостоматит Венсена. Основными возбудителями являются бактерии – представители нормальной микрофлоры полости рта, сконцентрированные в десневой борозде и складках слизистой оболочки (*Treponema vinsentii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella gingivalis* и *Prevotella intermedia*). В нормальных условиях у здорового человека вирулентность бактерий достаточно низкая, но при иммунодефицитных состояниях симбиоз этих видов является причиной воспаления десны и слизистой оболочки полости рта. Развитие заболевания часто провоцирует герпетическая инфекция, стимулирующая возникновение бактериального симбиоза. При некротическом гингивостоматите имеется тенденция к быстрому распространению инфекции в окружающие ткани. Характерным является образование пленчато-язвенных поражений слизистой оболочки щек, десны. Возможно спонтанное кровотечение. При осложненном течении гингивостоматита развивается язвенно-некротическая ангина Симановского-Венсана-Плаута. У пациентов со СПИДом частым возбудителем гингивостоматита является *Campylobacter rectus*.

Кандидоз. Наиболее частая локализация слизистая оболочка ротовой полости, один из основных возбудителей кандидоза - дрожжеподобные грибы *S.albicans*. Любопытно, что обе части его биномиального названия по латыни обозначают «белый». Действительно, для кандидоза полости рта характерны белые налеты, а при росте на агаре Сабуро грибы образуют кремово-белые

колонии. Кандидозные инфекции характерны для больных с Т-клеточным, но не В-клеточным иммунодефицитами.

В 1996г. Лехнер опубликовал классификацию кандидозных инфекций полости рта, которая использовалась долгое время. В соответствии с ней различают две основных группы кандидоза – острый (псевдомембранозный и атрофический) и хронический (атрофический и гиперпластический). Появление кандидозных инфекций у лиц с иммунодефицитом привело к некоторым изменениям классификации. Так, простой длительности заболевания уже недостаточно, поскольку псевдомембранозная форма может долго оставаться у лиц с иммунодефицитом и нарушениями местного иммунитета. В этой связи псевдомембранозный кандидоз может быть острым или хроническим. Вместо гистопатологического термина «атрофический» рекомендуется применять термин «эритематозный» которым описывают клинический признак покраснения. Последнее может быть результатом не только атрофии, но и воспаления, сосудистой реакции. Угловой хейлит, хронический эритематозный кандидоз и срединный ромбовидный глоссит могут вызывать и грибы и бактерии, поэтому их рассматривают как Кандида-ассоциированные состояния.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

№1 Бактериологическая лаборатория	Исследуемый материал: кровь
	Диагноз: одонтогенный сепсис
	Гр. Тимин М.Р. Возраст 40 лет
	Адрес: с. Выселки Клепик. р-на Ряз. обл
	По поручению БСМП
	Врач Иванова М.И.
Результат исследования	№ 164 «17» мая 2014 12 часов 30 минут
	Выделены Candidatropicalis Врач - Иванов А.С.

1. Метод исследования, охарактеризуйте его принцип.
2. Диагностические критерии для подтверждения клинического диагноза.
3. Срок выдачи результата лабораторией.
4. Необходимость в дополнительном исследовании

Темы для рефератов

1. Основные этиологические факторы развития заболеваний слизистой оболочки полости рта.
2. Современные представления о кандидозе.
3. Современные представления о стоматитах.

4. Методы забора и правила работы с материалом при воспалительных заболеваниях ротовой полости.

Тема занятия: ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА.

цели: знать основные механизмы, спектр действия антибиотиков; причины возникновения, пути преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов, методы определения чувствительности микробов к антибиотикам; уметь учитывать и интерпретировать результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, обосновывать выбор антибиотика для лечения.

Контрольные вопросы.

1. Что такое химиотерапия и химиотерапевтические препараты (ХТП)?
2. Назовите основные группы ХТП. Какими свойствами должны обладать ХТП?
3. Что такое спектр, бактерицидное и статическое действие ХТП?
4. Назовите источники и методы получения антибиотиков. Примеры.
5. Механизмы действия антибиотиков? Примеры.
6. Как проявляется побочное действие антибиотиков на микроорганизмы?
7. Назовите основные виды лекарственной устойчивости, причины ее возникновения, механизмы?
8. Как определяют чувствительность микробов к антибиотикам?
9. Что такое МИК (МПК) антибиотика?
10. Что является критерием чувствительности микроба-возбудителя к антибиотикам? Как определяют этот показатель?

Выполнение самостоятельной работы

1. Познакомиться с лекарственными формами антибиотиков: определить химическую группу, механизм и спектр действия.
2. Учесть результаты демонстрационного опыта определения чувствительности штамма *Staphylococcus aureus* к антибиотикам диско-диффузионным методом: определить величину зон задержки роста стафилококка (в мм), дать оценку чувствительности штамма к антибиотикам, используя специальную таблицу.
3. Учесть опыт по определению чувствительности стафилококка к бензилпенициллину методом серийных разведений антибиотика в питательном бульоне.
4. Определить МИК бензилпенициллина в отношении штамма стафилококка методом серийных разведений. Рассчитать величину терапевтического

индекса, дать заключение о клинической эффективности бензилпенициллина для лечения больного.

5. Оформить протокол.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ.

Концентрации антибиотиков в крови (К, мкг/мл) после введение средних терапевтических доз препарата.

Антибиотик	К	Антибиотик	К
Ампициллин	15-25	Полимиксин В	10-15
Бензилпенициллин	0,52(ЕД/мл)	Рифампицин	15-25
Ванкомицин	10-15	Стрептомицин	20-25
Гентамицин	6-8	Тетрациклины	3-5
Канамицин	15-20	Тобрамицин	6-8
Линкомицин	10-15	Фузидиевая кислота	10-20
Метициллин	10-15	Хлорамфеиикол	5-10
Оксациллин	4-6	Цефалексин	15-25
Олеандомицин	3-5	Эритромицин	3-5

Методы определения чувствительности к антибиотикам.

1. Метод серийных разведений. Методом серийных разведений МИК антибиотика определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающей видимый рост микроорганизма в пробирках или на чашках с питательной средой, содержащих убывающие концентрации антибиотика.

Например, для определения МИК тетрациклина в отношении культуры *Staphylococcus aureus*, выделенной от больного, готовят двухкратно убывающие концентрации этого антибиотика в стандартном питательном бульоне. Контролями культуры и антибиотика являются, соответственно, бульон без антибиотика и бульон с первым разведением антибиотика. В опытные и контрольные пробирки вносят стандартизованную суспензию молодой агаровой культуры *S. Aureus* и после суточной инкубации учитывают результат.

Учетным признаком является наличие или отсутствие мутности бульона (роста культуры) в пробирках. В контроле культуры должна быть мутность, в контроле антибиотика – нет. Величина МИК соответствует той минимальной концентрации тетрациклина, при которой отсутствует видимый рост возбудителя (бульон в пробирке прозрачный). Допустим, бульон будет мутным в опытных пробирках с концентрациями, 2, 4 и 8 мкг/мл, а в пробирках с концентрациями 16, 32 и 64 мкг/мл прозрачным. В этом случае МИК тетрациклина = 16 мкг/мл. Известно, что величина К тетрациклина при

введении средне-терапевтических доз – 4 мкг/мл (при использовании максимальных доз – 10 мкг/мл). Следовательно, в данном случае терапевтический индекс будет равен $T = 16:4 = 4 (> 0,3)$, т.е. возбудитель устойчив к антибиотику и лечение тетрациклином не даст антимикробного эффекта в отношении *S. Aureus* у данного больного даже при введении максимальных доз.

Серийные разведения в плотных средах чаще используют для одновременного тестирования большого количества штаммов (для посева можно использовать специальный штамп-репликатор). Учетным признаком в этом случае является наличие или отсутствие роста на поверхности агара.

Метод серийных разведений считается наиболее точным, но относительно трудоемким и дорогим.

2. Диско-диффузионный метод. При определении чувствительности методом диффузии в агар, чистую культуру возбудителя засевают “газоном” на специальный питательный агар в чашке, например, тампоном, смоченном в стандартизованной (10^8 КОЕ/мл) суспензии микроорганизма. Затем на поверхность агара накладывают стандартные бумажные диски, пропитанные антибиотиками, которые диффундируют в агар, создавая градиент концентрации. На чашку диаметром 90 мм равномерно укладывают 6-8 дисков. После инкубирования в термостате измеряют диаметры зон задержки роста вокруг дисков и по специальным таблицам определяют степень чувствительности к тому или иному антибиотику. Поскольку для получения результатов методом диффузии в агаре используют стандартизованные условия (состав и количество среды, количество засеваемых микробов, температура и сроки инкубирования, стандартные диски и др.), каждому значению диаметра зоны вокруг диска с антибиотиком соответствует определенное значение МИК. Исходя из значений МИК, и зная концентрацию антибиотика в сыворотке крови (очаге инфекции) можно определить терапевтический индекс: $T = \text{МИК}/K$. Терапевтический индекс не должен превышать значения 0,3. Следовательно, по диаметру зоны можно определить степень чувствительности к тому или иному антибиотику: чувствительный, умеренно-устойчивый, устойчивый.

К категории чувствительных относят те штаммы, для которых использование средних терапевтических доз будет достаточным для трехкратного превышения МИК.

В категорию умеренно-устойчивых относят микроорганизмы, для подавления роста которых, *in vivo* потребуются максимальные терапевтические дозы препарата.

Категорию устойчивых составляют те микроорганизмы, в отношении которых данный антибиотик будет неэффективным *in vivo*.

3. Метод Е-тестов. Метод определения чувствительности с помощью Е-тестов. Е-тесты представляют собой бумажные полоски, пропитанные не одной, а рядом убывающих концентраций определенного антибиотика (128,

64, 32, 16, 8, 4..... мкг/мл). Е-тесты, как и диски при диско-диффузионном методе, укладывают на поверхность стандартного питательного агара, засеянного испытуемой культурой в виде “газона“. После инкубирования вокруг полоски формируется эллипсоидная зона задержки роста микроорганизма, которая сужается в области малых концентраций и “пересекает“ полоску на уровне, соответствующем величине МИК.

Темы для рефератов

1. Принципы применения антибиотиков в стоматологии.
2. Терапевтическая концентрация антибиотиков.
3. Современные понятия о формировании и распространении механизмов антибиотикорезистентности.
4. Принципы рациональной антибиотикотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

Основная учебная литература:

1. Микробиология, вирусология и иммунология /для стоматологического факультета //Учебник под ред. В.Н. Царева – М., Практическая медицина. – 2010. – 580 с.: ил.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология /Л. Б. Борисов. - 2-е изд., доп. и перераб. - М.: Мед. информ. агенство, 2001,2002. - 736с. : ил.
- 3.Теппер Е.З. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие /Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; Под ред. Шильниковой В.К. - 5-е изд., перераб. и доп. - М.: Дрофа, 2004. - 256с. : ил..

Дополнительная учебная литература:

1. Воробьев А.А., Быков А.С. Атласа по микробиологии, иммунологии, вирусологии. //Учебное пособие УМО –М., МИА.-2005. – 450с.
2. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: Учеб. пособие /А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков. - М.: Изд. центр "Академия", 2003. - 462с.: ил.
3. Микробиология и иммунология для стоматологов: [пер. с англ.]/Под ред. Р.Дж.Ламонта, и др. – М.: Практическая медицина, 2010. – 504 с.: ил.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины:

1. ЭБС «Консультант студента ВПО и СПО», доступ предоставлен зарегистрированному пользователю университета с любого домашнего компьютера. Доступ предоставлен по ссылке www.studmedlib.ru и www.medcollegelib.ru соответственно.
2. Коллекция полнотекстовых книг по психологии ProQuest ebrary- Psychology and Social Work. Доступ предоставлен по ссылке <http://site.ebrary.com/lib/rzgmu>.
3. Библиографическая и реферативная база данных Scopus. Ссылка на ресурс: www.scopus.com.
4. Национальная электронная библиотека («НЭБ»). Ссылка на ресурс <http://нэб.рф/>.
5. Коллекция книг ЭБС "Юрайт". Доступ предоставлен по ссылке «Юрайт» biblio-online.ru
6. Polpred.com. Обзор СМИ. Доступ на Polpred.com открыт со всех компьютеров библиотеки и внутренней сети. Для работы используйте ссылку <http://polpred.com>. После регистрации с компьютеров университета можно просматривать документы из дома.

