

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ
КАФЕДРА ГІСТОЛОГІЇ ТА МЕДИЧНОЇ БІОЛОГІЇ**

**ПЕТРО БОЙКО, ОКСАНА БОЙКО, ОЛЬГА ПАНІВСЬКА,
БОГДАН ПОРУЧИНСЬКИЙ**

**ПРАКТИКУМ З МЕДИЧНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ,
ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

Навчально-методичні матеріали до виконання лабораторних робіт

Луцьк – 2025

УДК 579.61+578.7+616:612.017(072)

Б 77

Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Волинського національного університету імені Лесі Українки
(протокол № 6 від 20.02.2025 р.).

Укладачі:

Петро БОЙКО,
Оксана БОЙКО,
Ольга ПАНІВСЬКА,
Богдан ПОРУЧИНСЬКИЙ

Бойко П.К., Бойко О.П., Панівська О.В., Поручинський Б.А. Практикум з медичної мікробіології, вірусології та імунології. Частина 1. Навчально-методичні матеріали до виконання лабораторних робіт. Навчальний посібник для підготовки магістра, галузі знань 22 Охорона здоров'я, спеціальності 222 Медицина, за освітньо-професійною програмою «Медицина». Луцьк: ВНУ, 2025. 172 с.

Рецензенти:

Пикалюк Василь Степанович – професор, доктор медичних наук, професор кафедри анатомії людини Волинського національного університету імені Лесі Українки.

Мотузюк Олександр Петрович – доцент, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини і тварин Волинського національного університету імені Лесі Українки

Практикум з медичної мікробіології, вірусології та імунології є навчально-методичним виданням для здобувачів освіти галузі знань 22 Охорона здоров'я, спеціальності 222 Медицина, за освітньо-професійною програмою «Медицина». Основне мета практикуму допомогти студентам засвоїти теоретичний і практичний матеріал лабораторних занять з вивчення медичної мікробіології, вірусології та імунології.

Практикум сформовано відповідно до силабусу з курсу медичної мікробіології, вірусології та імунології для здобувачів освіти спеціальності 222 Медицина.

© Бойко П. К., Бойко О. П.,
Панівська О. В., Поручинський Б.А., 2025.
© ВНУ імені Лесі Українки, 2025

ЗМІСТ		
Теми лабораторних робіт (ЛР)		Стр.
	Пояснювальна записка.....	4
1	Мікробіологічна лабораторія. Оснащення мікробіологічних лабораторій. Правила поведіння і техніки безпеки при роботі із біоматеріалами і культурами мікроорганізмів у мікробіологічній лабораторії.	6
2	Будова мікроскопа. Види мікроскопії. Налаштування світлового мікроскопа і правила роботи із мікроскопічною технікою.	14
3	Дезінфекція. Види, методи та засоби дезінфекції.	23
4	Стерилізація. методи стерилізації.	27
5	Виготовлення живих і фіксованих мікроскопічних препаратів. Фазово-контрастна мікроскопія і мікроскопія у темному полі.	34
6	Методи фарбування бактерій. Фарбування за Грамом: суть, методика та інтерпретація результатів фарбування чистих і змішаних культур.	41
7	Морфологія бактерій. Фарбування капсул і джгутиків.	44
8	Морфологія бактерій. Фарбування ендоспор та включень.	50
9	Морфологія бактерій. Фарбування кислотостійких бактерій.	56
10	Метаболізм бактерій. Види поживних середовищ для культивування бактерій. Виготовлення простих поживних середовищ.	59
11	Правила роботи з чистими культурами мікроорганізмів. Техніка посіву на тверді і рідкі живильні середовища.	67
12	Принципи виділення та ідентифікації чистих культур.	73
13	Біологічний метод досліджень (біопроба). Види лабораторних тварин. Способи зараження лабораторних тварин.	80
14	Визначення чутливості бактерій до антибіотиків.	89
15	Імунологічні методи діагностики інфекційних хвороб людини. Частина 1. Реакції з феноменом аглютинації.	100
16	Імунологічні методи діагностики інфекційних хвороб людини. Частина 2. Реакції з феноменом преципітації.	110
17	Імунологічні методи діагностики інфекційних хвороб людини. Частина 3. Реакції з феноменом лізису.	115
18	Імунологічні методи діагностики інфекційних хвороб людини. Частина 4. Метод флуоресціюючих антитіл. (МФА) Імуноферментний аналіз (ІФА).	119
19	Молекулярно-генетичні методи діагностики інфекційних хвороб людини.	125
20	Імунопрофілактика інфекційних хвороб.	133
21	Будова вірусів. Взаємодія вірусів із клітиною.	148
22	Загальна вірусологія. Методи діагностики вірусних інфекцій.	156
23	Загальна вірусологія. Виділення і титрування бактеріофагів. Фаготипування як метод ідентифікації виділених культур.	162
24	Список рекомендованої літератури.	171

Пояснювальна записка

Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія – це збірна наукова дисципліна, яка викладається у вищих медичних навчальних закладах як єдиний курс. Об'єктами вивчення є не лише мікроскопічні організми – бактерії, віруси, гриби та найпростіші, як збудники низки заразних захворювань людини, але й організм людини – як дійова особа інфекційного процесу. Сприйнятливості конкретної особини до зараження інфекційним агентом визначається не лише патогенними властивостями мікроорганізму, але, в першу чергу, опірністю організму, яка безпосередньо залежить від стану імунної системи організму.

Інфекційний процес як сукупність реакцій організму у відповідь на вторгнення хвороботворного мікроорганізму може відбуватися на молекулярному, клітинному, тканинному, органному та організменному рівнях на тлі впливу природних та соціальних факторів довкілля. Взаємодія популяції патогенного збудника із популяцією людей спричиняє виникнення епідемічного процесу – біологічного явища, яке має конкретні часові та просторові виміри. Існування епідемічного процесу можливе за умови взаємодії трьох рушійних сил – джерела збудника інфекції, механізму передачі та сприйнятливих організмів. Фактори довкілля дуже часто мають визначальний вплив на виникнення та перебіг інфекційного захворювання. Тому інфекційні хвороби, виникнення яких залежить від впливу зовнішніх факторів, називають *факторними інфекціями*.

Інфекційні захворювання, виникнення яких залежить від вірулентних властивостей збудника, називають *класичними інфекціями*. Проте, незалежно від того з якими інфекціями приходить мати справу у тих чи інших обставинах, медичному лікареві слід володіти глибокими знаннями, які дозволили б йому, в першу чергу, запідозрити у пацієнта інфекційну хворобу. А для цього необхідно вміти провести цілеспрямований анамнез та епідеміологічний аналіз зібраних даних, правильно відібрати, упакувати та направити у лабораторію необхідний матеріал для мікробіологічного дослідження, за необхідності провести найпростіше мікробіологічне дослідження. У випадку підозри на особливо небезпечні інфекції – провести всі необхідні заходи з метою недопущення розсіювання збудника інфекції.

Набуття всіх цих необхідних знань і навиків – основна задача курсу ОК «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» та представленого посібника. В ньому подані ті лабораторні роботи, які передбачені силабусом ОК. Теоретичний матеріал до кожної роботи тут подано разом із виконанням практичних завдань, що стосуються висвітлюваної теми. Такий підхід

виправдовує себе, бо дозволяє студенту не лише поглибити теоретичні знання, але закріпити їх практичними навичками.

Знання основ мікробіології, вірусології та імунології є необхідним для лікарів, оскільки дозволяє їм точно діагностувати інфекційні захворювання, підбирати ефективні засоби та методи лікування, запобігати поширенню збудників інфекції, розробляти профілактичні заходи.

Сучасна медична мікробіологія активно розвивається, використовуючи новітні технології молекулярної біології та генетики. Про це свідчать факти розробки та застосування генно-інженерних вакцин проти збудника COVID та широке використання імуноферментних та молекулярно-генетичних методів індикації та ідентифікації збудників інфекційних хвороб. Це відкриває нові можливості для боротьби з інфекційними хворобами людини.

Проте, знання основ мікробіології, вірусології та імунології, класичних методів виявлення та диференціації збудників заразних захворювань формує у майбутніх лікарів базові знання етіопатогенезу, механізмів розвитку інфекційного процесу, рушійних сил та принципів функціонування епідемічного процесу.

Основними завданнями вивчення навчальної дисципліни «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» є:

- Інтерпретувати біологічні властивості патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибів і найпростіших), закономірності їх взаємодії з макроорганізмом, з популяцією людини та зовнішнім середовищем.
- Визначати методи мікробіологічної і вірусологічної діагностики, етіотропної терапії та специфічної профілактики інфекційних хвороб.
- Пояснювати будову імунної системи організму людини.
- Трактувати основні механізми формування імунної відповіді організму людини.
- Визначати основні типи патологічних реакцій імунної системи і їх зв'язок з виникненням найбільш поширених хвороб людини.
- Знати основні закони та принципи епідеміології, особливості інфекційного та епідемічного процесів людини і на основі цих знань вміти будувати систему контролю того чи іншого інфекційного захворювання.

З метою досягнення згаданих вище завдань укладено цей посібник.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Тема: МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ. ОСНАЩЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ. ПРАВИЛА ПОВОДЖЕННЯ І ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ ІЗ БІОМАТЕРІАЛАМИ І КУЛЬТУРАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.

Навчальна мета

Знати:

- які є види мікробіологічних лабораторій за їх призначенням;
- основні та допоміжні приміщення мікробіологічної лабораторії;
- правила безпечного поведження у мікробіологічній лабораторії;
- основне оснащення мікробіологічної лабораторії.

Уміти:

- правильно одіти лабораторний спецодяг;
- організувати своє робоче місце;

Ознайомитися із:

- правилами безпечної роботи у мікробіологічних лабораторіях;

Матеріали і реактиви: халати, шапочки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, інструкції, Правила поведження у лабораторіях, Правила з техніки безпеки при роботі з електроприладами, хімічними речовинами, мікробіологічними об'єктами.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ.

Мікробіологічна лабораторія – спеціальна науково-практична установа, в якій проводять бактеріологічні, імунологічні й серологічні дослідження.

Лабораторії організовують при клінічних лікарнях, санітарно-епідеміологічних станціях, в складі окремих державних служб, зокрема, ветеринарній, фітосанітарній, Держпродспоживслужбі, профільних науково-дослідних інститутах, біологічних фабриках, де виготовляють вакцини та інші біологічні препарати, і звичайно при кафедрах мікробіології і вірусології, інфекційних хвороб вищих учбових закладів біологічного, медичного, ветеринарного та сільськогосподарського напрямків підготовки спеціалістів.

Виходячи з цього, **мікробіологічні лабораторії за призначенням** поділяються на:

- **навчально-дослідні** ;
- **діагностичні** (клінічні, санітарно-епідеміологічні, ветеринарні, фітокарантинні тощо);
- **науково-дослідні** (лабораторії НД інститутів, закритих об'єктів);

– **виробничо-контрольні** (біофабрик, фармзаводів, підприємств з випуску біологічної та продовольчої продукції).

Мікробіологічні лабораторії можуть мати вузький напрям досліджень і займатися дослідженням лише одного роду мікроорганізмів. В цьому випадку лабораторії поділяють на:

- **вірусологічні**, де проводять лише вірусологічні дослідження;
- **бактеріологічні**, проводять дослідження на бактеріальні хвороби;
- **мікологічні** – де досліджують мікроскопічні гриби – збудники грибкових захворювань;
- **протозологічні** – де досліджують хвороби, що спричиняються найпростішими.

У складі великих санітарно-епідеміологічних станцій існують **лабораторії з діагностики особливо небезпечних інфекцій** тощо.

Мікробіологічні лабораторії в лікувально-профілактичних установах проводять аналізи для ранньої діагностики інфекційних хвороб і визначення строків виписування хворого з лікувального закладу.

У складі санітарно-епідеміологічних станцій крім діагностичної роботи вони здійснюють мікробіологічні обстеження окремих осіб і організованих колективів, переважно з підприємств громадського харчування й джерел водопостачання, на носійство патогенних кишково-тифозних бактерій, стафілококів (у медперсоналу лікарень), збудників дифтерії, епідемічного менінгіту й інших хвороб, пологових будинків, хірургічних стаціонарів, дитячих закладів тощо.

Спеціалісти лабораторії Держпродспоживслужби контролюють бактерійну забрудненість змивів з устаткування, інвентаря й рук персоналу м'ясопереробних і молокопереробних підприємств, молочнотоварних ферм, контролюють безпечність імпортованих продуктів харчування і кормів за показниками мікробіологічної безпеки та інше.

Завдання медичної мікробіологічної лабораторії:

1. **Діагностичні дослідження** при інфекційних хворобах проводять з метою:

- 1) виявлення збудника або ДНК і продуктів його метаболізму в матеріалі, що досліджується;
- 2) визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків;
- 3) виявлення імунної відповіді макроорганізму на проникнення мікроорганізму.

1. **Профілактичне обстеження населення** для виявлення носіїв патогенних мікроорганізмів.

2. **Санітарно-мікробіологічне обстеження об'єктів навколишнього середовища** (води, харчових продуктів, повітря тощо) з метою стеження за циркуляцією збудників та запобігання поширенню інфекцій.

3. **Наукові дослідження** з метою вивчення властивостей збудників інфекційних хвороб, вдосконалення методів мікробіологічної діагностики, створення ефективних препаратів для профілактики та лікування інфекційних хвороб.

Робота мікробіологічної лабораторії
в комплексі з іншими медичними і немедичними установами
спрямована на зниження захворюваності населення
і оздоровлення довкілля.

В залежності від призначення і напрямку роботи лабораторії **матеріалом для мікробіологічних досліджень** є різні об'єкти живої і неживої природи.

Так, для досліджень *у лабораторії клінічної лікарні* найчастіше матеріалом для мікробіологічного дослідження є виділення хворої людини: сеча, випорожнення, блювотні маси й промивні води шлунка, мокротиння, слиз із зіва, жовч, а також кров, спинномозкова рідина, трупний матеріал.

При *дослідженні екології мікроорганізмів* матеріалом служать вода, повітря, ґрунт, харчові продукти, змиви з різних об'єктів, перев'язувальні й шовні матеріали, ліки.

Нормальну мікрофлору людини досліджують, забираючи матеріал стерильним тампоном із носо- та ротоглотки, наліт із зубів, слиз із вагіни, змив зі шкіри й випорожнення.

Основна вимога до мікробіологічних лабораторій - створити такі умови, які забезпечують проведення досліджень при дотриманні стерильності й гарантують персоналу та оточуючим безпеку від можливого зараження.

У структуру звичайної мікробіологічної лабораторії входить ряд приміщень спеціального призначення: одна або декілька лабораторних кімнат, бокс із передбоксом, препаратозна, приміщення для виготовлення живильних середовищ, автоклавна (стерилізаційна), термостатна, мийка, кімната для забору (або прийому) матеріалу для дослідження і його реєстрації, віварій для лабораторних тварин.

Отже, такими кімнатами є:

1. **Гардеробна** - кімната, де спеціалісти лабораторії переодягаються у спецодяг (халат, косинка або шапочка, окуляри, маска і рукавиці (за необхідності));

2. **Кімната підготовки матеріалу для дослідження** (кімната пробопідготовки), в якій проводять попередню підготовку матеріалу й обладнання для проведення мікробіологічних досліджень;

3. **Кімната для роботи з чистими культурами мікроорганізмів** – бокс. Іноді такий бокс може замінювати ламінарний бокс – сучасний прилад, що забезпечує стерильні умови для роботи з чистими культурами;

Бокси біологічної безпеки (англ. biological safety cabinet or microbiological safety cabinet or biohazard safety cabinet) — спеціальне обладнання, оснащене HEPA та ULPA-фільтрами і призначене для захисту працівника або одночасного захисту його і продукту, отриманого від хворих чи речовин, що являють собою біологічну небезпеку. Термін може бути застосований тільки стосовно обладнання, яке оснащується відповідно до вимог для I—III класів безпеки, що регламентують конструкцію, швидкість і розведення повітряних потоків, систем витяжки. Вперше такі бокси з'явилися у вжитку в 1950-ті роки. Ці бокси створюють найбезпечніші умови для дослідження біологічних агентів, які ранжуються згідно з рівнями біологічної безпеки.

«Біологічна небезпека» — наявність інфекційного агента (або його частини), що являє потенційну небезпеку для здорової людини, тварини або рослини в результаті прямого впливу, зараження або непрямого впливу — через руйнування довкілля.

На підставі лабораторної практики, використовуваних методик і сучасного обладнання для безпечної роботи встановлені *рівні біологічної безпеки з 1 по 4*, які присвоюються в залежності від застосовуваних у роботі агентів, напрямків діяльності лабораторії.

Автоклава — спеціально обладнане приміщення, де проводиться стерилізація живильних середовищ, знешкодження відпрацьованого матеріалу у спеціальних приладах — автоклавах.

4. **Мийна кімната**, в якій крім мийки повинна бути сушка для вимитого посуду, сушильна шафа для стерилізації посуду сухим жаром, шафи для зберігання стерильного посуду.

5. Додаткові приміщення, якими може бути облаштована мікробіологічна лабораторія, включатимуть:

6. **Віварій** — приміщення для утримання лабораторних піддослідних тварин (білі миші, білі щури, морські свинки, кролі, кури та ін.),

7. **Ізолятор** — приміщення для утримання лабораторних тварин, на яких проводяться досліди..

8. **Складські приміщення** тощо.

Усі основні лабораторні кімнати мають бути добре освітлені та вентилявані, стіни на висоту до 170 см від підлоги пофарбовані спеціальною олійною фарбою або викладені плиткою (для вологого прибирання із застосуванням дезінфікувальних розчинів). Підлога вкрита спеціальним суцільним лінолеумом або як виняток кахельна плитка.

На робочому столі повинні знаходитись тільки предмети, необхідні для проведення бактеріологічних досліджень: газовий пальник, банка з дезінфікуючим розчином, пастерівські й градуйовані піпетки, бактеріальна петля і шпателі, пінцети, предметні та покривні скельця, штативи, пробірки, чашки Петрі, мікроскоп, аглютиноскоп, лупа. Біля стола повинна стояти посудина з дезрозчином, куди опускають відпрацьований заразний матеріал, який потім автоклавують.

Для проведення бактеріологічних (вірусологічних) досліджень в особливо стерильних умовах відводять окрему кімнату або бокс, приміщення якого розраховують на роботу двох чоловік. Перед проведенням дослідження його обробляють дезінфікуючими розчинами, а повітря стерилізують бактерицидними лампами БУВ-15, БУВ-30 протягом 1–2 год.

Лабораторне приміщення обладнують шафами, де зберігається апаратура і реактиви, термостатом для вирощування мікроорганізмів і лабораторними столами, покритими термо- і хімічностійким матеріалом, лабораторними стільцями.

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю включає:

автоклава – прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів,

сухо-жарова шафа – прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду,

термостат – прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу і використовується для культивування мікроорганізмів,

мікроанаеростат – прилад, який підтримує задану температуру і в якому створюються анаеробні умови для вирощування анаеробних мікроорганізмів,

ламінарний бокс – прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів,

водяна баня – прилад для розплавлення середовищ та інактивації сироватки тощо,

інші лабораторні прилади – терези, електричні шейкери, лічильник колоній, біокулярні лупи або мікроскопи, засоби для фільтрування (прилад Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо);

лабораторний посуд – мікробіологічні пробірки, колби, циліндри різної форми й об'єму, піпетки різного об'єму, чашки Петрі, скляні лійки, предметні скельця – всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла, оскільки підлягають нагріванню;

засоби для проведення посіву – гумові груші або одноразові піпеток, бактеріальні петлі, голки, металеві або скляні шпателі; ватно-марлеві та гумові корки;.

Якщо використовується пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

2. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОЧОГО МІСЦЯ ЛАБОРАНТА

Робочі місця в лабораторії мають бути постійно оснащені всім необхідним для повсякденної роботи. Для роботи потрібні спиртівка, бактеріологічна петля (мал. 2), предметні та покривні стекла, банка з ватою,

пінцет, ножиці, скальпель; склянки з дезінфекційними розчинами для піпеток і для відпрацьованих предметних стекол; невелика склянка з притертою кришкою для покривних стекол; фіксатори для мазків, сірники, маркер, гумові груші, 70 % етиловий спирт для оброблення рук, пробірки з ізотонічним розчином натрію хлориду; мікроскоп, імерсійне масло.

Для фарбування мазків обладнують спеціальне місце, на якому потрібно мати барвники, спирт, пісочні годинники, промивалку з дистильованою водою, лоток із місточком, пінцет, фільтрувальний папір.

3. ПРАВИЛА ПОВОДЖЕННЯ І ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.

У мікробіологічній лабораторії навчального закладу заборонено працювати з **мікроорганізмами I–III груп патогенності** (табл. 1), робота з якими вимагає відповідної кваліфікації і дотримання строгих правил безпеки. Такі роботи виконуються у спеціалізованих мікробіологічних лабораторіях різного профілю.

Таблиця 1. **Класифікація патогенних для людини мікроорганізмів за ступенем небезпечності**

Група	Види збудників					
	Бактерії	Рикетсії	Гриби	Найпр о стіші	Хламідії	Віруси
I	Збудник чуми					Збудники натуральної віспи, кримської гемора-гічної гарячки, гарячки Ебола, Ласса, Марбург
II	Збудники сибірки, сапу, бруцельозу, туляремії, легіонельозу, лептоспірозу, холери	Збудники епідемічного висипного тифу, ендемічного висипного тифу, Ку-арячки	Збудник и бластомикозу, кокцидіозу, гістоплазмозу		Збудники орнітозу	Збудники гепатиту В, Д, С, сказу, СНІДу, ящуру
III	Збудники коклюшу, дифтерії, туберкульозу, менінгококової інфекції, гонореї, дизен-	Збудники кліщового висипного тифу Північної Азії, волинської	Збудник и кандидозу, аспергілюзу	Збудники лейшманіозу, малярії, трихомоніазу	Збудники трахоми, пневмонії	Збудники грипу А, В, С; гепатиту А, Е; поліомієліту, простого герпесу, вітряної віспи,

	терії, черев-ного тифу, ботулізму, правця, сифілісу, актиномікозу	, марсельської гарячок				цитомегалії, вірус Епштейна—Барр
IV	Збудники паракклюшу, газової гангрені, ешері-хії, сальмонели, стафіло-коки, стрептококи, клеб-сієли, синьогнійна паличка, протей, мікоплазма		Мукор, пеніциліум, трихофітон	Токсоплазма, балантидій, патогенна (дизентерійна) амеба		Аденовіруси, віруси ЕСНО, збудники парагрипу, епідемічного паротиту, кору, краснухи

Однак під час виконання більшості лабораторних робіт студенти працюють з живими мікроорганізмами, виділеними з об'єктів довкілля, або з музейними культурами. Робота з ними теж вимагає **дотримання строгих правил безпеки поводження з культурами мікроорганізмів**.

Правила роботи у діагностичних мікробіологічних лабораторіях:

Прийшовши на роботу і лабораторію працівники спочатку:

- знімають верхній одяг,
- перевзуваються,
- миють руки із використанням мийних засобів,
- одягають спецодяг і
- приступають до виконання службових обов'язків.

1. До роботи в бактеріологічній лабораторії допускаються особи, які обізнані з правилами роботи в ній.

2. Персонал лабораторії повинен мати індивідуальний спецодяг (халат, шапочку, взуття). У боксі працюють у стерильних халатах, шапочках і марлевих масках. При зараженні й розтині тварин одягають фартух, нарукавники й гумові рукавички.

3. Палити, вживати їжу й зберігати продукти в лабораторії категорично заборонено.

4. Матеріал, що надходить в лабораторію для дослідження, завжди вважають інфекційним, його обов'язково записують у спеціальний журнал і маркують.

5. Відпрацьовані культури мікробів, заразний матеріал підлягають обов'язковому щоденному знищенню. Поверхню робочого місця, як і використані інструменти, дезінфікують.

6. Переливати рідини, які містять патогенні мікроби, необхідно над посудиною з дезінфікуючим розчином. При набиранні таких рідин в піпетки

потрібно користуватися гумовими балонами або грушами.

7. Коли при розбиванні колби чи пробірки заразний матеріал або жива культура потрапляє на робочий стіл, інші меблі, одяг, руки, підлогу, треба негайно повідомити про це завідувача лабораторією або лікаря-бактеріолога і в його присутності провести дезінфекцію заражених ділянок, потім обробити руки дезрозчином і ретельно вимити з милом.

8. У лабораторії не дозволяються зайві ходіння, різкі рухи, непотрібні розмови. Виконання цих вимог попереджує проникання сторонніх мікробів із повітря й ротової порожнини в досліджуваний матеріал.

9. Необхідно завжди уникати втрат і виносу з лабораторії заразного матеріалу, живих культур та інфікованих тварин. Усі термостати, рефрижератори і сейфи з культурами потрібно обов'язково пломбувати. Контролює виконання цих правил завідувач лабораторією або лікар-бактеріолог.

10. Після закінчення роботи столи дезінфікують, проводить вологе прибирання лабораторії з використанням дезінфікуючих розчинів.

11. Зайшовши у гардеробну, знімають спецодяг, миють руки з мийним засобом, перевзуваються, одягають верхній одяг і залишають установу.

Правила поведінки з живими культурами, які виділяються в процесі досліджень, а також із музейними штамами мікроорганізмів, залежно від ступеня їх патогенності, ***регламентуються відповідними інструкціями.***

У навчальних мікробіологічних лабораторіях є свої *правила*, яких повинні дотримуватися студенти:

1. Заходити і працювати в лабораторії можна лише у халаті (спецодязі);
2. Спочатку знімають верхній одяг, миють руки з милом, одягають спецодяг і приступають до роботи у лабораторії;
3. Не вносити сторонніх речей;
4. Працювати на одному і тому ж місці і користуватися лише закріпленим обладнанням;
5. Не палити і не приймати їжу під час роботи;
6. Не столі під час роботи повинні бути лише необхідні для виконання речі;
7. По закінченню роботи привести в порядок робоче місце;
8. Не запалювати одну сигаретку від іншої;
9. Не торкатися оголених проводів електромережі;
10. Без відома викладача не вмикати і не вимикати лабораторне обладнання та прилади;
11. Дотримуватися правил поведінки із хімічними реактивами, фарбами та іншими реактивами;
12. Виходячи з лабораторії, зняти спецодяг і вимити руки із милом.

ХІД РОБОТИ.

1. Ознайомлення із навчальною мікробіологічною лабораторією та її оснащенням;
2. Ознайомлення із правилами поведження у мікробіологічній лабораторії;

Контрольні питання:

1. Як поділяють мікробіологічні лабораторії за призначенням?
2. Які задачі ставляться перед медичною мікробіологічною лабораторією?
3. З яких виробничих кімнат складається діагностична мікробіологічна лабораторія?
4. Основні вимоги, що ставляться до мікробіологічних діагностичних лабораторій?
5. Назвіть основні лабораторні прилади та їх призначення.
6. Як має бути організоване робоче місце лаборанти лабораторії?
7. На які групи за ступенем небезпечності поділяються патогенні мікроорганізми?
8. Назвіть збудників, що відносяться до першої і другої груп патогенності.
9. Назвіть збудників, що відносяться до третьої і четвертої груп патогенності.
10. Перелічіть основні правила поведження у мікробіологічних лабораторіях.
11. Що категорично забороняється робити у мікробіологічних лабораторіях?
12. Який найчастіше матеріал використовують для мікробіологічного дослідження у лабораторії клінічної лікарні ?
13. Який найчастіше матеріал використовують для мікробіологічного дослідження у лабораторії санітарно-епідеміологічної служби ?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Тема: БУДОВА МІКРОСКОПА. ВИДИ МІКРОСКОПІЙ. НАЛАШТУВАННЯ СВІТЛОВОГО МІКРОСКОПА І ПРАВИЛА КОРЕКТНОЇ РОБОТИ ІЗ МІКРОСКОПІЧНОЮ ТЕХНІКОЮ.

Навчальна мета

Знати:

- будову мікроскопа;
- види мікроскопії;

Уміти:

- вміти налаштувати мікроскоп для мікроскопії препаратів.

Ознайомитися із:

- інструкцією із експлуатації мікроскопів;

Матеріали і реактиви: халати, ковпачки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, мікроскопи, імерсійна олія, мікропрепарати, інструкції.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1. БУДОВА МІКРОСКОПА.

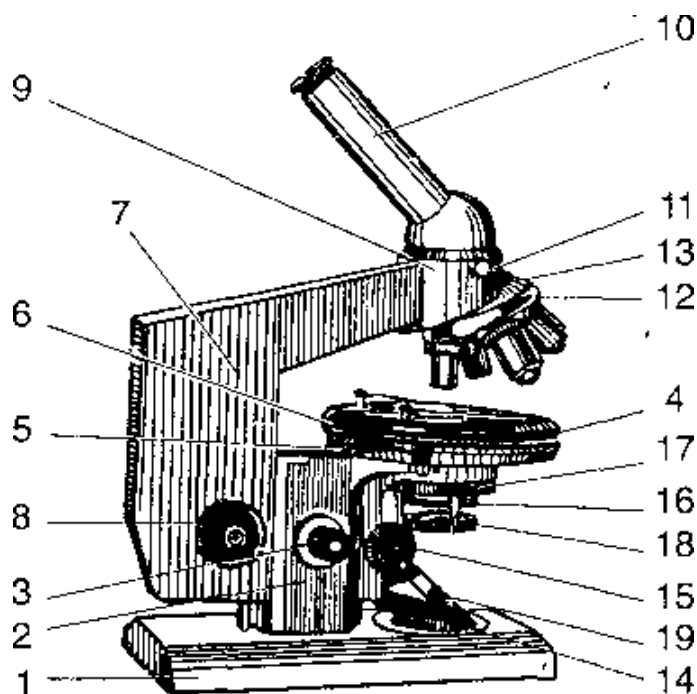
Серед різноманітних приладів, що використовуються в практиці мікробіологічних досліджень, найважливіше місце належить мікроскопу.

Мікроскоп – це прилад з певним розташуванням лінз у ньому, за допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні й тисячі разів. Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об'єкти у світлі, що проходить через лінзи, називаються *світловими* або *біологічними*.

Мікроскоп має механічну та оптичну системи.

У *механічній системі* основними частинами є прямокутна основа (штатив), коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик, тубусотримач з макро- і мікрогвинтом, тубус, револьвер з отворами для об'єктивів

Оптична система, складається з об'єктивів, окулярів та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач). Основною частиною оптичної системи є об'єктив, що характеризує основні якості мікроскопа: власне збільшення, роздільну здатність і чіткість зображення. *Об'єктив* – це система лінз у металевій оправі. Передня, найголовніша лінза об'єктива, називається *фронтальною*. Вона дає зображення об'єкта, що розглядається, із сферичною і хроматичною аберациями. Останні усуваються розміщеними вище в об'єктиві корегуючими лінзами. В об'єктивах планохроматах і планapoхроматах сферична і хроматична аберації є виправленими.



Біологічні мікроскопи серії «БІОЛАМ»

1 – основа; 2 – коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3 – рукоятка мікрогвинта; 4 – предметний столик; 5 – гвинт для фіксування диска предметного столика; 6 – регулювальні гвинти; 7 – тубусотримач; 8 – рукоятка макрогвинта; 9 – головка; 10

насадка; 11 – гвинт для закріплення насадки; 12 – револьвер; 13 – гвинт фіксування револьвера; 14 – кронштейн конденсора; 15 – рукоятка конденсора; 16 – циліндрична гільза конденсора; 17 – гвинт; 18 – додаткова лінза (відкидна); 19 – дзеркало.

Розрізняють сухі та імерсійні об'єктиви.

У *сухому об'єктиві* між фронтальною лінзою і об'єктом міститься повітря. Найчастіше користуються сухими об'єктивами при збільшенні досліджуваного об'єкта від 56 до 600 разів.

Імерсійні (ОИ-90 або МИ-90, $\times 100$) об'єктиви застосовують при вивченні дуже дрібних об'єктів (бактерій, грибів тощо). В імерсійних об'єктивах між фронтальною лінзою і досліджуванним об'єктом потрібно поміщати краплю імерсійної олії, найчастіше кедрової. У цій однорідній системі промені світла не заломлюються, а потрапляють в об'єктив, не змінюючи свого напрямку, оскільки показники заломлення скла і кедрової олії майже однакові: 1,52 і 1,515 відповідно.

До оптичної системи мікроскопа також належить *окуляр*, який складається з двох плоско-опуклих лінз: *верхньої очної* і *нижньої – збірної*. *Очна лінза* збільшує дійсне зображення, одержане об'єктивом, подібно до звичайної лупи. Цифри на металевій оправі окуляра ($\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$, $\times 20$) вказують на його власне збільшення.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива помноженому на збільшення окуляра. Наприклад, при використанні окуляра $\times 15$ і об'єктива $\times 90$ матимемо збільшення зображення у 1350 разів.

Основними складовими частинами освітлювального пристрою, розміщеного під предметним столиком, є конденсор і дзеркало. *Конденсор* складається з двох лінз у металевій оправі та ірисової діафрагми. Він призначений для збирання пучка світла від дзеркала. *Дзеркало* має плоску і вгнуту поверхні. Воно спрямовує пучок променів на об'єкт, що досліджується. При денному освітленні користуються плоскою стороною дзеркала, при штучному освітленні (а також при відсутності конденсора) – вгнутою.

Оптичні якості мікроскопа визначаються такими основними показниками: власним збільшенням, роздільною здатністю і чіткістю зображення.

Власне збільшення мікроскопа перебуває в оберненій залежності від фокусної відстані фронтальної лінзи об'єктива: *чим більшою є фокусна відстань, тим меншим є збільшення фронтальної лінзи.*

Роздільна здатність мікроскопа – це здатність об'єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих на препараті точок. Іншими словами це та мінімальна відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. *Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об'єкт можна побачити.* Роздільна здатність мікроскопа є тим більшою, чим вищою є нумерична апертура об'єктива.

Чіткість зображення об'єкта під мікроскопом утворюється при

загальному збільшенні об'єктива та окуляра, яке не перевищує нумеричну апертуру більш ніж у 500 разів.

Чіткість зображення залежить від ступеня усунення в об'єктиві явищ сферичної і хроматичної аберацій. З цією метою використовують планахроматичні і планapoхроматичні об'єктиви.

4. ВИДИ МІКРОСКОПІЇ.

Розрізняють такі види мікроскопії:

1. Світлова;
2. В темному полі;
3. Фазово-контрастна ;
4. Люмінесцентна;
5. Електронна.

2. Мікроскопія в ТЕМНОМУ ПОЛІ ЗОРУ. Цей метод застосовують для дослідження частинок, які є невидимі або погано розрізняються при спостереженні у світлому полі. В основі методу лежить явище Тіндаля – освітлення об'єкта косими променями світла. При вивченні живих мікроорганізмів у темному полі зору препарат розміщують на предметному столику і фокусують об'єктивом $\times 10$. Потім звичайний конденсор замінюють на темнопольний. Наступна операція – регулювання освітлення. Для цього встановлюють освітлювач ОИ-19 на відстані 25 см від дзеркала перпендикулярно до його площини і закривають діафрагму. Повертаючи дзеркало, спрямовують світло на лінзу конденсора. При правильному освітленні на поверхні лінзи конденсора утворюється світле кільце. Після цього препарат відсувають убік і наносять на верхню лінзу конденсора краплю води або імерсійної олії, яка заповнює простір між конденсором і предметним склом. Злегка опускають конденсор і повертають препарат на попереднє місце. Піднімають конденсор угору до стикання краплі води (олії) з предметним склом. Дивлячись в окуляр, додатково центрують конденсор, тобто переводять темну пляму на препараті в центр поля зору. Обережно піднімають або опускають конденсор доти, поки не зникне темна пляма. Після цього переводять револьвер мікроскопа на середнє збільшення і вивчають досліджуваний об'єкт. Цей метод особливо придатний для вивчення функціонально-морфологічних властивостей великих мікробів типу дріжджів, лептоспир тощо.

3. Фазово-контрастна мікроскопія (фкм). Клітини мікроорганізмів мало відрізняються за своїм забарвленням і прозорістю від навколишнього середовища. Тому, щоб дістати чітке зображення прозорих і безбарвних об'єктів, у мікробіологічній практиці найчастіше застосовують метод фазово-контрастної мікроскопії. Суть його полягає в тому, що за допомогою спеціальних пристроїв фазові коливання, які виникають при проходженні променів через ділянки об'єкта з різною оптичною щільністю, штучно

перетворюються на амплітудні, внаслідок чого фазові ділянки стають контрастними і видимими. Можна застосовувати звичайний біологічний мікроскоп з фазово-контрастним пристроєм (КФ-4), що складається з набору спеціальних фазових об'єктивів і конденсорів з кільцевими діафрагмами та допоміжного мікроскопа – оптичного пристрою, який розміщують у тубусі мікроскопа замість окуляра для фазового контрастування. **Оправу фазових об'єктивів помічено буквою «Ф».** Техніка ФКМ така:

1. Замість звичайного об'єктива в револьвер укручують фазово-контрастний ($\times 40$ Ф).

2. Заміняють звичайний конденсор на фазово-контрастний. Диск револьвера конденсора встановлюють у положенні «0», при цьому діафрагма конденсора має бути відкритою.

3. На предметному столику розміщують досліджуваний мікропрепарат.

4. Настроюють освітлення за Келлером, користуючись об'єктивом малого збільшення $\times 10$ Ф.

5. **Заміняють окуляр на допоміжний мікроскоп** і, переміщуючи його тубус, фокусують фазове кільце об'єктива.

6. Обертаючи **диск револьвера конденсора**, відкривають діафрагму, що відповідає об'єктиву $\times 40$ Ф. При спостереженні через допоміжний мікроскоп у полі зору має бути видно два кільця (темне і світле). Темне кільце – проекція фазової пластинки, світле – кільцевої діафрагми.

7. За допомогою центрувальних гвинтів конденсора поєднують зображення обох кілець.

8. Виймають допоміжний мікроскоп, а на його місце вставляють звичайний окуляр. Препарат фокусують і вивчають.

Фазово-контрастну мікроскопію **найчастіше застосовують для дослідження живих клітин мікроорганізмів, контрастність яких досягається оптичним шляхом без втручання у фізіологічні процеси досліджуваних об'єктів.**

4. Люмінесцентна мікроскопія. Цей метод набув широкого застосування в науково-дослідних і навчальних мікробіологічних лабораторіях, оскільки **він дає змогу вивчати морфологію живих і мертвих клітин мікробів як у поживних середовищах, так і в тканинах тварин.** У разі використання люмінесцентної мікроскопії виявляти і досліджувати клітинні мікроструктури вдається **завдяки вибіркового поглинання ними різних флуорохромів.** Перевагою цього методу перед звичайною мікроскопією є й те, що зображення водночас є контрастним і кольоровим.

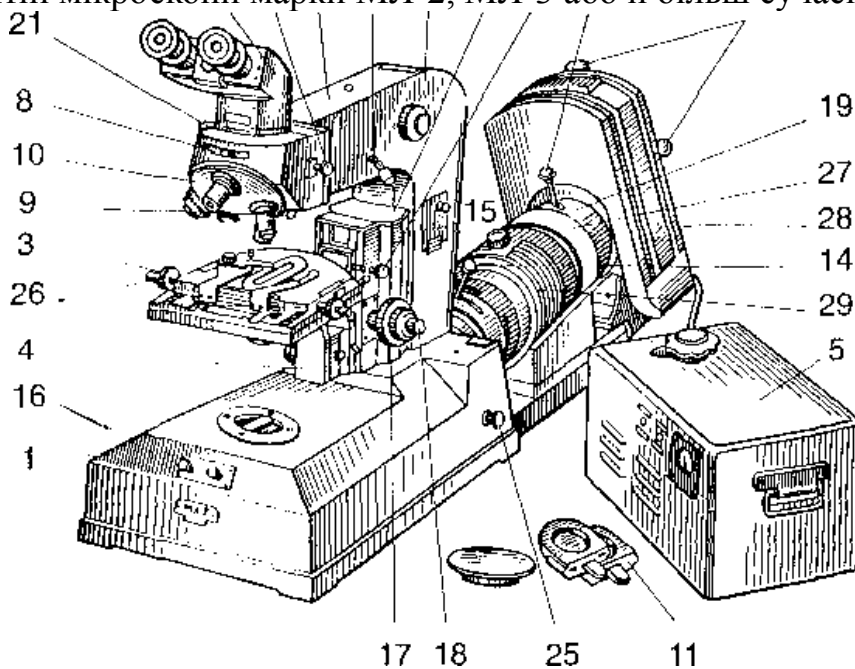
Суть методу стане ясною, коли згадати, що таке **флуоресценція.** Відомо, що **окремі речовини мають здатність світитися під впливом променів світла, які падають на них.** Це явище дістало назву люмінесценції або флуоресценції. Пояснюється воно тим, що частина енергії променів, які потрапляють на об'єкт, поглинається, а випромінювані об'єктом промені мають більшу довжину хвилі.

Люмінесценція буває первинною і вторинною.

Первинна флуоресценція зумовлена речовинами самою об'єкта, які здатні при освітленні короткохвильовими променями відсвічувати. У цьому випадку клітини відсвічують жовто-зеленим або оранжевим світлом.

Вторинна флуоресценція виникає **внаслідок спеціальної обробки об'єктів речовинами**, які мають здатність випромінювати. Ці речовини називаються **флуорохромами** (акредин жовтий і оранжевий, аурамінон, примулін, тіофлавін, хінон та інші).

У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують люмінесцентні мікроскопи марки МЛ-2, МЛ-3 або й більш сучасні.



Люмінесцентний мікроскоп МЛ-2 (схема будови):

1 – основа мікроскопа; 2 – тубусотримач; 3 – предметний столик; 4 – кронштейн із конденсором; 5 – електропульт ПРЛ-5; 6 – рукоятка польової діафрагми; 7 – рукоятка для перемикавання освітлення; 8 – револьверний диск із «запираючими» світлофільтрами; 9 – рукоятка вмикання ахроматичної лінзи; 10 – револьвер об'єктивів; 11 – світлофільтри в оправках; 12 – гвинти для центрування лампи; 13 – рукоятка для переміщення колектора; 14 – рукоятка польової діафрагми; 15 – кришка гнізда світлофільтрів; 16 – гвинти для центрування польової діафрагми; 17 – макрометричний гвинт; 18 – мікрометричний гвинт; 19 – оправа колектора; 20 – коробка з механізмами грубого і тонкого переміщення препарату; 21 – гвинт для закріплення насадки; 22 – гвинти для центрування польової діафрагми; 23 – біокулярна насадка; 24 – рукоятка гальмування грубого руху; 25 – рукоятка для перемикавання освітлення; 26 – рукоятка для переміщення препарату в горизонтальній площині; 27 – захисна втулка; 28 – корпус ртутної лампи; 29 – кювета з дистильованою водою.

5. Електронна мікроскопія. Для дослідження найтонших структур мікробних клітин, вірусів використовують електронні мікроскопи, за допомогою яких можна отримати зображення досліджуваних об'єктів у мільйон і більше разів.

В електронних мікроскопах світлові промені, замінює струмінь

електронів, який при відповідних прискореннях має довжину хвилі майже в сто тисяч разів коротшу від довжини хвилі денного світла. Для біологічних досліджень широко застосовують *просвічуючий (трансмісійний)* електронний мікроскоп. Електрони в ньому рухаються так, як і промені світла в світловому мікроскопі.

Крім трансмісійних, використовують також *скануючі (растрові)* електронні мікроскопи, які дають об'ємне рельєфне зображення досліджуваного об'єкта.

Електронний мікроскоп складається з таких основних частин:

- а) електронної-пушки (джерело електронів);
- б) електромагнітних котушок, які виконують роль конденсорної, об'єктивної і проєкційної лінз;
- в) предметного столика, екрана для зображення;
- г) окуляра;
- д) вакуумного насоса, оскільки рух електронів можливий тільки у вакуумі.

При роботі з електронними мікроскопами необхідно суворо дотримуватися встановлених правил техніки безпеки.

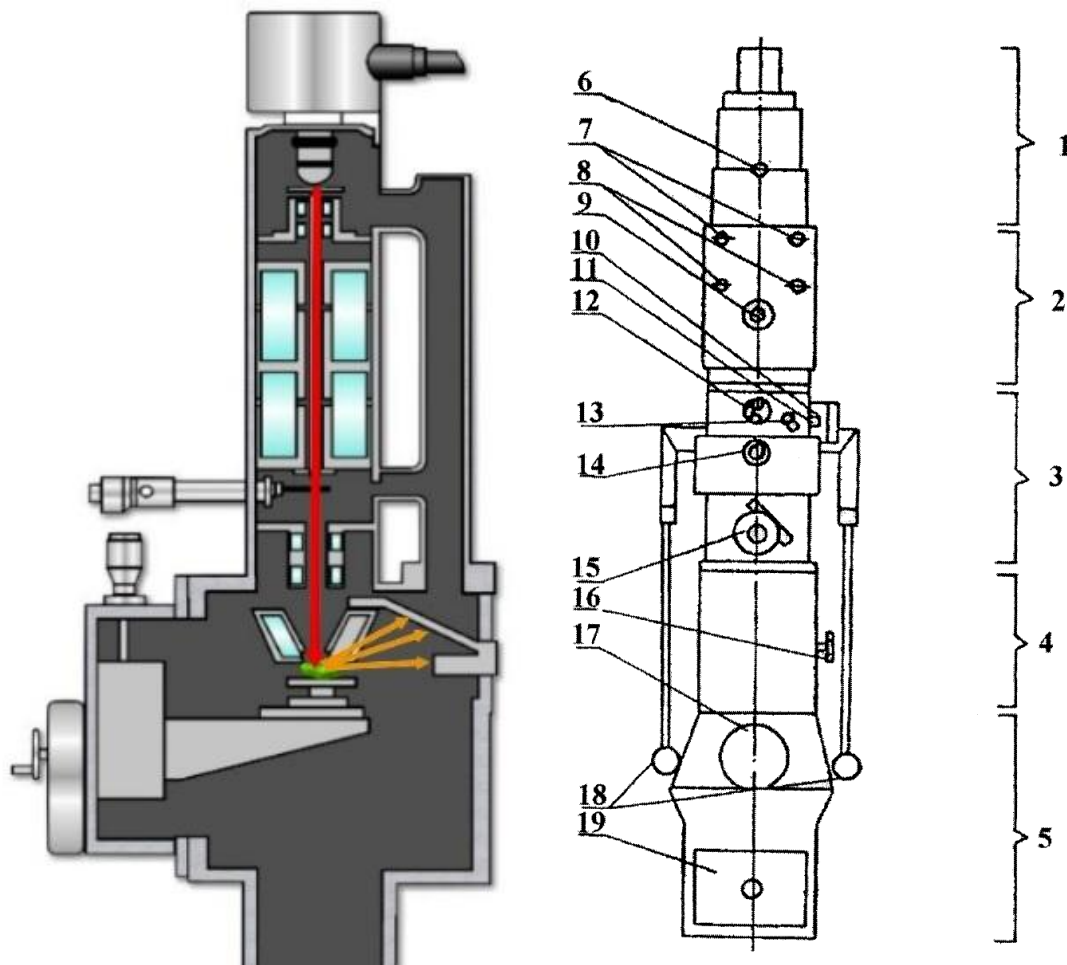


Схема колони електронного мікроскопа УЭМВ-100К:

1 - електронна пушка; 2 - блок конденсорних лінз; 3 - об'єктивна лінза; 4 - проєкційний

блок; 5 - тубус з фотокамерою; 6 - гвинт переміщення електронної пушки; 7- гвинти переміщення першої конденсорної лінзи; 8 - гвинти переміщення другої конденсорної лінзи, 9 - діафрагма другого конденсора; 10 - механізм установки утримувача об'єктів в шлюзовий пристрій; 11 - клапан відкачки шлюзового пристрою; 12 - механізм керування гоніометром; 13 - ручка заглушки шлюзової камери; 14 - апертурна діафрагма; 15 - механізм мікродифракції; 16 - маховик; 17 - оглядове вікно; 18 - ручки керування столиком об'єктів; 19 - люк фотокамери.

ХІД РОБОТИ.

1. Підготовка світлового мікроскопа до роботи.

- Повторити правила користування мікроскопом.
- Поставити мікроскоп на робочому столі навпроти лівого плеча штативом до себе на відстані 5–10 см від краю стола дзеркальцем від себе.
- Перевірити стан корпусу та дзеркала (очистити, якщо вони заповишені або брудні, м'якою серветкою). Щоб отримати якісне зображення, краєм одноразової м'якої паперової серветки, зволоженої 70 % -м етиловим спиртом або іншою спеціальною рідиною для оптики, можна протерти поверхні лінз об'єктивів та окуляра, потім насухо витерти ці поверхні сухою частиною цієї самої серветки.
- Нахилити штатив на 10-20° та переконатися, що мікроскоп не хитається.
- На початку роботи вмикають об'єктив малого збільшення (10-кратний), після налаштування чіткості, за потреби, вмикають об'єктив великого збільшення (40-кратний).

2. Налаштування мікроскопа.

- Покласти мікропрепарат для дослідження на предметний столик таким чином, щоб центральна частина покривного скла розташувалася точно під об'єктивом. Притиснути предметне скло лапками тримачів препарату.
- Спостерігаючи за рухом тубуса збоку, макрогвинтом повільно опустити його так, щоб відстань між об'єктивом та препаратом становила приблизно 2 – 5 мм.
- Налаштувати освітлення: повністю відкрити діафрагму, далі, обертаючи дзеркало в напрямку вікна або яскравої лампи, спрямувати на препарат потік світла, подивитися в окуляр і переконатися, що поле зору освітлено достатньо. ***Категорично забороняється використовувати прямі сонячні промені для освітлення препаратів!***
- При спостереженні в окуляр обидва ока дослідника мають бути відкритими (***в окуляр дивіться одним оком, не закриваючи іншого***).
- Дивлячись в окуляр, за допомогою мікрогвинтів повільно піднімайте тубус, доки не з'явиться чітке зображення об'єкта. Спочатку до двох разів можуть з'являтися та зникати чіткі зображення різних дуже дрібних часточок (першими будуть часточки мікробруду, що лежать на нижньому боці предметного скла, другими – мікробруд на верхньому боці предметного скла, лише за ними – тваринні клітини всередині препарату).

- Спочатку розглянути об'єкт дослідження за малого збільшення мікроскопа.
- Перейти на велике збільшення, для цього обережно повернути револьверну насадку і увімкнути 40-кратний об'єктив (у момент увімкнення чути легке клацання пружини фіксатора об'єктива).
- За допомогою макрогвинта опускайте тубус так, щоб об'єктив майже торкався препарату, при цьому дивіться, як опускається тубус не в окуляр, а збоку.
- Дивлячись в окуляр, повільно піднімайте тубус за допомогою мікрогвинта гвинта, доки в полі зору мікроскопа не з'явиться зображення об'єкта дослідження (гвинтом налаштовується чіткість під око спостерігача, оскільки люди мають різний зір, при тривалому спостереженні через втомленість тимчасово може понизитись зір).
- За допомогою діафрагми збільшити яскравість освітлення препарату.

3. Техніка роботи з люмінесцентними мікроскопами марки МЛ-2 і МЛ-3 така:

1. Підключають блок живлення мікроскопа до електричної мережі.
2. Повертаючи за годинниковою стрілкою, встановлюють рукоятку регулятора напруги біля червоної крапки.
3. Тумблер на лицевому боці блоку живлення переводять у положення «ВКЛ» і вмикають кнопкою лампу мікроскопа. Якщо лампа не увімкнеться, необхідно повернути рукоятку регулятора напруги на кілька міліметрів за годинниковою стрілкою і знову натиснути кнопку.
4. Установити рукоятку регулятора робочого струму на позначці 4 А.
5. Через 10 хв. після вмикання мікроскопа починають вивчати досліджуваний об'єкт.
6. Лабораторія, в якій встановлено люмінесцентні мікроскопи, має бути обладнана вентиляційною установкою і затемненням.
7. Для люмінесцентної мікроскопії виготовляють препарати «роздушена крапля» або препарати-мазки, які обробляються спеціальними флуорохромами.
8. При роботі з імерсійними об'єктивами використовують нефлуоресценуючу олію або диметилфталат.

Контрольні питання:

1. Які види мікроскопії відомі Вам?
2. Що входить до складу механічної системи світлового мікроскопа?
3. Що входить до складу оптичної системи світлового мікроскопа?
4. Як налаштувати роботу світлового мікроскопа?
5. Що собою являє темнопольна мікроскопія і у яких випадках її застосовують?
6. Що собою являє фазово-контрастна мікроскопія і у яких випадках її застосовують?

7. Що собою являє люмінесцентна мікроскопія і у яких випадках її застосовують?
8. Що собою являє електронна мікроскопія і у яких випадках її застосовують?

Додатковий матеріал.

Співвідношення між величинами лінійних одиниць вимірювання:

$$1\text{мм} = 10^{-3}\text{ м} = 10^3\text{ мкм} = 10^6\text{ нм} = 10^7\text{ \AA} \text{ (ангстрем)}$$

$$1\text{мкм} = 10^{-6}\text{ м} = 10^{-3}\text{ мм} = 10^3\text{ нм} = 10^4\text{ \AA}$$

$$1\text{ нм} = 10^{-9}\text{ м} = 10^{-6}\text{ мм} = 10^{-3}\text{ мкм} = 10\text{ \AA}$$

$$1\text{\AA} = 10^{-10}\text{ м} = 10^{-7}\text{ мм} = 10^{-4}\text{ мкм} = 10^{-1}\text{ нм}$$

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Тема: ДЕЗІНФЕКЦІЯ. ВИДИ, МЕТОДИ ТА ЗАСОБИ ДЕЗІНФЕКЦІЇ.

Навчальна мета

Знати:

- Що означають терміни «антисептика» і «асептика», «дезінфекція», «дезінфекційні засоби» і «дезінфекційні заходи»
- Способи дезінфекції;

Уміти:

- правильно продезінфікувати руки; інструменти, робочу поверхню;
- виготовити дезінфікуючі засоби потрібної концентрації.

Матеріали і реактиви: пінцет, вата, скляний посуд, дезінфекційні засоби: 0,1 % розчин дезактину, стериліум, хлорамін, 70° етиловий спирт, 5% розчин йоду та ін.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1 Поняття про асептику та антисептику.

Антисептика – це комплекс лікувально-профілактичних заходів, спрямованих *на знищення мікроорганізмів або пригнічення їх росту* на певному об'єкті (рана, організм).

Вперше (1865 р.) антисептичні засоби (хлорну воду, срібло, йод) для лікування гнійних ран використав **М.І. Пирогов** (1810–1881) і висловив геніальну думку, що нагноєння ран викликають «госпітальні міазми».

Згодом англ. хірург **Джозеф Лістер** (1867 р.) описав основні принципи попередження інфікування ран, відкривши нову «антисептичну» еру в хірургії. А як антисептик він використав карболову кислоту.

З метою запобігання інфікуванню ран застосовують бактерицидні хімічні речовини.

Хімічні речовини, які згубно діють на мікроорганізми, але не впливають негативно на макроорганізм, та які застосовують для лікування

інфекційних хвороб, називають **антисептиками**.

Асептика – система профілактичних заходів (дезінфекція, стерилізація), спрямованих **на запобігання мікробному забрудненню** рани, перев'язочного матеріалу, операційного поля, культури мікроорганізмів та ін. Запропонував і ввів її в хірургію нім. вчений **Е. Бергман** (1897 р.).

Правила асептики мають важливе значення і в мікробіологічній практиці.

Медичним сестрам, лаборантам слід суворо дотримуватись правил асептики, щоб досліджуваний матеріал не забруднити сторонньою мікрофлорою.

Усім працівникам лабораторій необхідно попереджувати забруднення чистих мікробних культур, живильних середовищ, спецодягу. Усі посіви треба проводити в зоні пальника.

Для проведення дезінфекції використовують різні методи залежно від того, який режим знезараження вони забезпечують.

2. Дезінфекція.

Дезінфекція – це сукупність заходів для повного, часткового або селективного знищення потенційно патогенних мікроорганізмів на різних об'єктах довкілля з **метою** попередження передачі збудника від джерела збудника інфекції до сприятливого організму.

Дезінфекція – це знищення вегетативних (інколи і спорових) форм патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі (у приміщенні: підлога, стіни, ручки дверей; на поверхні меблів, апаратів, приладів; на посуді, білизні; у патологічному матеріалі, отриманому від хворих, тощо).

Метою дезінфекції є запобігання передачі збудників від інфікованого організму до неінфікованого через об'єкти навколишнього середовища.

За ступенем чутливості мікроорганізмів до дезінфектантів виділяють 4 ступені дезінфекції: А, В, С, D.

Дезінфекційні заходи ступеня А передбачають знищення аспорогенних форм мікробів, рикетсій, мікоплазм, найпростіших.

Деззаходи ступеня В – для ліквідації грибів, деяких вірусів, бактерій з підвищеною стійкістю (стафілококи, мікобактерії),

Деззаходи ступеня С – для знищення збудників особливо небезпечних інфекцій (чума, холера, сап, меліоїдоз, тиф тощо)

Деззаходи ступеня D – для знищення спорових мікроорганізмів та найпростіших.

Методи проведення дезінфекції наведено у табл. 1.

Таблиця 1. **Методи дезінфекції**

Метод дезінфекції	Принцип методу
Механічний	Миття рук з милом, вологе прибирання приміщення, прання білизни, чистка та миття посуду, поверхонь, провітрювання приміщення тощо

Фізичний	Кип'ятіння, спалювання, оброблення паром, ультрафіолетове опромінювання
Хімічний	Оброблення хімічними засобами (антисептиками та дезінфектантами)

Дезінфекція буває *поточною* і *заключною*.

Поточну дезінфекцію проводять багаторазово протягом дня в лікувально-профілактичних та інших закладах для зменшення контамінації у вогнищах інфекції. Їй підлягають ліжка, постільна білизна, меблі, посуд, інструменти, повітря.

Заключну дезінфекцію проводять з метою знищення збудників інфекції в її осередку. Її здійснюють одноразово наприкінці робочого дня, або в осередку інфекції після госпіталізації хворого, переведення хворого в іншу палату/відділення, або після смерті пацієнта.

Для дезінфекції використовують багато (сотні) різних хімічних препаратів. Більшість із них випускають готовими для використання у вигляді концентрованої рідини, розчинів, таблеток, емульсій, суспензій, аерозолів.

Дезінфекційні засоби, зареєстровані в Україні, застосовують відповідно до режимів, які регламентовані методичними вказівками і в установленому порядку затверджені головним державним санітарним лікарем України.

Дезінфекційні засоби поділяються за **хімічним складом** на групи:

- **Хлоремісні сполуки** (хлорне вапно, хлорамін, гіпохлорит кальцію, сульфохлорантини тощо);
- **окиснювачі** (перекис водню, перманганат калію);
- **феноли та їх похідні** (лізол, карболова кислота);
- **солі важких металів** (мертіолят натрію, сулема);
- **спирти** (етиловий, пропіловий);
- **альдегіди** (формальдегід, глутаровий альдегід).

До усіх груп хімічних дезінфекційних засобів висуваються **певні вимоги**:

- 1) Протимікробний ефект широкого спектру дії;
- 2) Висока розчинність у воді, здатність утворювати з водою активні та стійкі суспензії/емульсії/аерозолі);
- 3) Здатність не втрачати протимікробних властивостей при наявності в середовищі органічних речовин;
- 4) Низька токсичність;
- 5) Відсутність/низька алергізуюча дія;
- 6) Відсутність/низька пошкоджуюча дія на предмети/поверхні;
- 7) Доступність/вартість.

Останнім часом в Україні зареєстровані ефективні дезінфекційні

препарати для проведення поточної і заключної дезінфекції: *МедіДес, Тетралін, КвікДес, Сентамін* та ін. Їх можна використовувати для знезараження поверхні приміщень, твердих меблів, медичних приладів і апаратури, предметів догляду за хворими, лабораторного посуду, забрудненого виділеннями хворих, білизни, прибирального інвентарю, а також кухонного посуду.

Для гігієнічного оброблення шкіри рук медичного персоналу рекомендовано препарати *БактеріоСол, Октенісепт, Стериліум* та ін.

Дезінфекційні засоби можуть негативно впливати на людину, тому під час виготовлення дезінфекційних розчинів слід дотримуватися правил техніки безпеки (працювати в гумових рукавичках, герметичних окулярах, надягати чотиришарову марлеву пов'язку).

ХІД РОБОТИ

Проведення дезінфекції піпеток, робочого місця, патологічного матеріалу, рук

Завдання 1. Ознайомлення з технікою проведення дезінфекції піпеток, інфікованого матеріалу, робочого місця.

Градуйовані, пастерівські піпетки, шпателі, металеві інструменти відразу після використання опускають у посудину з дезінфекційним розчином, яка стоїть на кожному робочому місці.

Відпрацьований патологічний матеріал (кал, сеча, мокротиння, кров, спинномозкова рідина) обробляють сухими дезінфекційними засобами або їх розчинами.

Патологічний матеріал (гній, сеча, кров, мокротиння тощо), посуд, меблі та приміщення знезаражують бактерицидними дезінфекційними засобами. Ці засоби застосовують у комбінації з детергентами та дією високої температури.

Вибір дезінфекційного засобу, його концентрація, експозиція (термін дії) залежать від біологічних властивостей мікроорганізмів і властивостей патологічного матеріалу, в якому містяться ці мікроби.

Так,

для знезараження мокротиння хворого на туберкульоз застосовують 2,5 % розчин дезактину (експозиція – 360 хв.), а

для знезараження випорожнень хворого на дизентерію – 0,5% розчин дезактину (експозиція – 60 хв.) або засипають сухим хлорним вапном із розрахунку 200 г дезінфекційного засобу на 1 кг виділень, перемішують і витримують 1 год.

Посуд опускають в 1 % розчин хлораміну на 30 хв. або 1 % розчин МедіДес чи Тетраліну на 60 хв.

Робоче місце після закінчення роботи протирають ганчіркою, змоченою дезінфекційним розчином (0,2 % розчином Септаміну, 0,75 % розчином МедіДес чи Тетраліну).

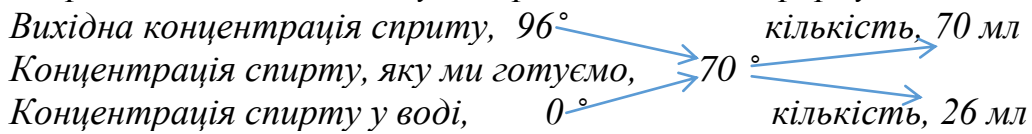
Завдання 2. Проведіть дезінфекцію рук.

Алгоритм “Дезінфекція рук”:

- зробіть із вати дві кульки діаметром 1–2 см;
- візьміть пінцетом одну кульку, змочіть її у розчині дезінфектанту;
- протріть нею руки в такій послідовності: ліва рука – тильна сторона, долонна сторона, між пальцями, нігтьова пластинка, під нігтями; права рука – у такій самій послідовності;
- кульку опустіть у посудину з дезінфекційним розчином;
- візьміть пінцетом другу кульку і все повторіть;
- вимийте руки водою з милом;
- висушіть руки, змастіть їх кремом для рук.

Завдання 3. Виготовлення 70 ° спирту;

Виготовляючи розчин спирту чи іншого дезінфектанту часто застосовують правило «ромба». Воно полягає у використанні такої формули:



Отже, для виготовлення 70 ° спирту беремо 70 мл спирту і додаємо 26 мл дистильованої води.

Завдання 4. Виготовлення 3 % розчину хлораміну.

Відважуємо 3 г хлораміну висипаємо в посудину яка щільно закривається, додаємо 100 мл води, перемішуємо і даємо добу відстоятися. Світлий прозорий розчин зливаємо у чисту посуду і використовуємо як 3 % розчин хлораміну.

Контрольні запитання

1. Що таке асептика й антисептика?
2. Що таке дезінфекція?
3. Дезінфекційні заходи якого ступеня забезпечують знищення спорових форм мікроорганізмів?
4. Назвіть методи дезінфекції
5. Для чого і як часто застосовують поточну дезінфекцію?
6. Які дезінфекційні засоби можуть бути використані в Україні?
7. Назвіть головні вимоги до хімічних деззасобів.
8. Як дезінфекційні засоби впливають на макроорганізм? Як з ними слід поводитися?
9. Як проводять дезінфекцію піпеток, патологічного матеріалу?
10. Як проводять дезінфекцію робочого місця, рук?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема: СТЕРИЛІЗАЦІЯ. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ.

Навчальна мета

Знати:

- способи стерилізації;
- процедуру стерилізації матеріалу

Уміти:

- підготувати лабораторний посуд до стерилізації;
- завантажити, включити і по закінченню сеансу стерилізації виключити автоклав і сушильну шафу;
- здійснювати контроль стерилізаційного процесу.

Ознайомитися із:

методами стерилізації медичного інструментарію, перев'язувального матеріалу, лабораторного посуду, поживних середовищ; правилами безпечної роботи автоклава, сушильної шафи.

Матеріали і реактиви: апаратура для стерилізації: стерилізатор паровий (автоклав), сухожарова шафа, інактиватор, апарат для зсідання й інактивації сироватки; тести для перевірки якості роботи стерилізаторів: максимальний і звичайний ртутні термометри, хімічні тести, біологічні тести, індикатори стерилізації; пінцет, вата, дезінфекційні засоби: 0,1 % розчин дезактину, стериліум, хлорамін, 70 ° етиловий спирт, 5 % розчин йоду та ін.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

1. Стерилізація. Методи стерилізації медичного інструментарію, перев'язувального матеріалу, лабораторного посуду, поживних середовищ. Контроль якості роботи стерилізаторів і якості стерилізації

Стерилізація – це повне знезараження об'єктів навколишнього середовища (знищення вегетативних і спорових форм мікроорганізмів).

Стерилізація дає змогу запобігти занесенню мікробів в організм людини під час медичних втручань; обсіменінню сторонньою мікрофлорою патологічного матеріалу, культур мікроорганізмів, які досліджують, а також поживних середовищ, лікарських і діагностичних препаратів. Способи стерилізації подані на схемі 1.

Фізичний спосіб. Застосовують термічну, механічну та променеву стерилізацію. Термічні способи стерилізації наведено у табл. 2.



Схема 1. Способи стерилізації

Таблиця 2. Термічні способи стерилізації

Спосіб, апаратура	Режим стерилізації	Застосування способу, недоліки, особливості
Фламбування (прожарювання) в полум'ї спиртівки	Кілька секунд	Швидкий та надійний спосіб, але різучі інструменти тупляться. Бактеріологічні петлі, піпетки, предметні/покривні стекла.
Повітряний, сухим жаром у сухожаровій печі	180 °С – 60 хв. 160 °С – 150 хв.	У лікувально-профілактичних закладах і бактеріологічних лабораторіях. Медичний інструментарій – вироби з металу і силіконової гуми, скла. Не відбувається корозії металів, проте потрібна тривала експозиція.
Водяною парою в стерилізаторі паровому (автоклаві) під тиском	132 °С (2 атм.), 60 хв.;	Найнадійніший метод повного знищення мікроорганізмів та їх спор. Інструменти, посуд, забруднений спорогенною культурою.
	127 °С, 1,5 атм., 30–60 хв.;	Вегетативні форми мікроорганізмів.
	120 °С, 1 атм., 20 хв.;	Прості поживні середовища, чистий лабораторний посуд, вата, марля, папір, інструменти, забруднені аспорогенною культурою.
	112 °С, 0,5 атм., 15 хв.;	Поживні середовища, що містять вуглеводи
Стерилізація багаторазова: потоком пари в апараті Коха або в автоклаві з відкритим краном; гарячим повітрям в апараті Коха; Тиндалізація на водяній бані з терморегулятором	100 °С, по 30 хв. 3 доби підряд;	Поживні середовища, що містять вуглеводи, сечовину, желатин, молоко та ін. Середовища, що містять сироватку крові та яєчну масу (стерилізація та згортання). Поживні середовища, що містять не денатурований білок.
	90 °С, по 60 хв. 2 доби підряд;	
	56–58 °С, по 60 хв. 5 діб підряд;	
Кип'ятіння у воді	100 °С, 30-40 хв.	Вироби медичного призначення (шприци, голки, трубки, в тому числі інструменти).
Кип'ятіння у 2% розчині натрію гідрокарбонату	100 °С, 15 хв.	У мікробіологічній практиці – предметні стекла. Метод не забезпечує знищення спор мікроорганізмів.

Пастеризація	65 °С, 30 хв.; 72–75 °С, 15–30 хв. одноразово з подальшим охолодженням	Харчові продукти: молоко, вино, пиво, плодові соки
Гласперленова стерилізація	190–250 °С, занурення в середо-вище нагрітих скляних кульок	Цільнометалічні стоматологічні інструменти

Стерилізація кип'ятінням є неповною, оскільки спори бактерій та деякі віруси не знищуються. Тому цей вид стерилізації часто відносять до дезінфекції.

Під час пастеризації гинуть переважно вегетативні форми бактерій (наприклад, молочнокислі бактерії). Дріжджі, спорові форми та деякі вегетативні форми бактерій не гинуть.

Ознайомлення з апаратурою для термічної стерилізації та тестами контролю якості роботи стерилізаторів.

Стерилізацію паром під тиском проводять у паровому стерилізаторі (*автоклаві*), основними частинами якого є стерилізаційна камера, парогенератор, система трубопроводів, крани керування, манометр електроконтактний та мановакуумметр (манометр). Матеріал вміщують у стерилізаційну камеру, температура в якій залежить від тиску пари:

- при 0 атм. – 100 °С,
- 0,5 атм. – 112 °С,
- 1 атм. – 121 °С,
- 1,5 атм. – 127 °С,
- 2 атм. – 132 °С.

Температура і термін стерилізації визначаються якістю матеріалу і властивостями мікроорганізмів, якими він забруднений.

Сухожарова шафа використовується для висушування лабораторного посуду за температури 100–105 °С, а також для стерилізації медичного інструментарію за 160 °С протягом 150 хв. або за 180 °С – 60 хв.

Інактиватор використовують для інактивації сироватки крові (комплемента сироватки крові переходить у неактивний стан за температури 56 °С протягом 30 хв.), а також для багаторазової стерилізації – *тиндалізації*.

Апарат для зсідання, інактивації сироватки крові, зсідання яєчних і сироваткових поживних середовищ використовують одночасно і для їх стерилізації за температури 90 °С по 60 хв. 2 доби поспіль.

Контроль температури в стерилізаційній камері проводять: за допомогою **трьох видів тестів**: фізичного, хімічного та біологічного.

Фізичний метод полягає у використанні максимального термометра в

паровому стерилізаторі (автоклаві) і звичайного ртутного термометра в сухожаровій шафі та інактиваторах.

Хімічний метод – використання кристалічних хімічних речовин з певною температурою плавлення: бензонафтол – 110 °С, антипірин – 113 °С, резорцин, сірка – 119 °С, бензойна кислота, бета-нафтол – 120 °С, сечовина, фенацетин, манноза – 132 °С, саліцилова кислота, стрептоцид – 160 °С, тіосечовина, альбуцид – 180 °С.

Одну з цих речовин змішують із невеликою кількістю барвника (фуксину або метиленового синього) і вміщують у трубочку, яку потім запаюють. Ці трубочки вміщують у стерилізаційні коробки разом із матеріалом, що стерилізується. Якщо температура в стерилізаційній камері сягає певного рівня, то хімічна речовина в трубочці розплавляється, змішується з барвником і забарвлюється в його колір.

Нині випускають паперові **індикатори стерилізації (ІС)**, які змінюють забарвлення за певної температури: ІС – 120 °С, ІС – 132 °С та ін.

Біологічний метод – використання біотестів (від грец. *bios* – життя і англ. *test* – проба, дослідження). Біотести виготовляють відповідно до методичних рекомендацій «Лабораторный контроль качества дезинфекционных мероприятий в ЛПУ» (Харків, 1988). Для їх виготовлення використовують тест-культуру (спорові мікроорганізми з роду *Bacillus*, які витримують кип'ятіння протягом 25–30 хв. і вплив текучої пари температурою 100 °С протягом 4–6 хв.) або зразки ґрунту, що містять спори термостабільних сапрофітів (витримують температуру 120 °С протягом 2–3 хв.). У стерилізатор вміщують щонайменше 5 біотестів (у різних його місцях) та 1 (контрольний тест) залишають за кімнатної температури. Після стерилізації змиви з біотестів засівають на поживні середовища. У змивах з тих біотестів, що перебували в стерилізаторах, росту культури не повинно бути, у змивах з контрольного тесту – рясний ріст культури. Якщо з'являється ріст культури у змивах, взятих із тестів, що перебували в стерилізаторі, перевіряють технічний стан апарата. Здебільшого біотести використовують у парових стерилізаторах і дезінфекційних камерах. На кожному індикаторі вказують тип стерилізації, для якої розроблено індикатор.

З метою профілактики внутрішньолікарняних інфекцій контролюють не тільки режим роботи стерилізаторів, а й **якість стерилізації**.

Для цього стерильний матеріал відбирають в асептичних умовах. Від великих об'єктів (бинти, простирадла, шовний матеріал) відрізають стерильними ножицями шматочки; серед дрібних предметів – відбирають по декілька штук стерильним пінцетом з різних місць біксу; з хірургічного інструментарію, іншого обладнання роблять змиви стерильними серветками, змоченими стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду.

Дослідження проводять у стерильному боксі в асептичних умовах. Змиви з усіх відібраних об'єктів засівають на поживні середовища, дрібні об'єкти занурюють у поживне середовище.

З метою самоконтролю посів проводять на одне поживне середовище

у дві паралельні пробірки. **Для виявлення анаеробів** використовують тіогліколеве середовище, яке інкубують за 32 °С протягом 8 діб. **Для виявлення грибів** використовують середовище Сабуро, яке інкубують за 22 °С протягом 8 діб. Матеріал вважають стерильним, якщо в усіх посівах відсутні ознаки росту мікроорганізмів.

Механічна (холодна) стерилізація застосовується за умов, коли підвищена температура може зруйнувати субстрати (сироватка крові, білки, антибіотики). Метод можна застосовувати для очищення бактеріальних токсинів, бактеріофагів від мікроорганізмів.

Механічна стерилізація проводиться з допомогою фільтрування через дрібнопористі антибактеріальні чи антивірусні фільтри. Існують два види фільтрів: мембранні та глибинні. **Ця стерилізація неповна, оскільки у фільтраті зберігаються віруси**, тому її використовують також для відокремлення вірусів від бактерій, у тому числі і фагів.

Променева стерилізація. Використовують: гамма-промені, ультрафіолетові променів, радіочастотне випромінювання.

Ультрафіолетовим випромінюванням, зокрема бактерицидними лампами знезаражують повітря, поверхні приміщень (операційної, пологових залів, боксів), предметів, обладнання, воду, харчові продукти.

Радіаційне випромінювання використовують для знезараження шприців, систем для переливання крові, посуду та інших предметів одноразового використання.

Надвисокочастотне випромінювання (НВЧ) використовують для швидкої стерилізації у мікрохвильовому автоклаві.

Ультразвукову стерилізацію використовують для стерилізації медичних інструментів і лікарських препаратів.

Хімічний спосіб. Хімічну допоміжну стерилізацію застосовують тоді, коли неможливо використати термічну (табл. 3).

Таблиця 3. Хімічні способи стерилізації

Хімічні речовини	Режим стерилізації	Призначення стерилізації
1 % розчин дезоксону-1	18 °С, 45 хв.	Вироби з полімерів, гуми, скла, корозійностійких металів
Хлороформ, толуол, ефір, фенол, формалін, етиловий спирт та ін.	Консервування	Ендоскопічний інструментарій, кетгут, апарат для штучного кровообігу, поживні середовища, вакцини, лікувальні та діагностичні сироватки
Гази або суміші газів: озон, оксид етилену, суміш ОБ (оксиду етилену і бромиду метилу)	18–80 °С	Вироби медичного призначення із полімерів, скла, металу

Короткий опис (аббревіатура) способу та процесу стерилізації може позначатися так:

STEAM – усі процеси стерилізації паром,
DRYHEAT – усі процеси стерилізації сухим теплом,
EO – усі процеси стерилізації етилену оксидом,
IRRAD – усі процеси радіаційної стерилізації,
FORM – усі процеси стерилізації паром формальдегіду.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Стерилізація лабораторного посуду в сухожаровій шафі.

Алгоритм стерилізації лабораторного посуду для бактеріологічних цілей передбачає такі операції:

1. Миття лабораторного посуду. Дозвіл на миття лабораторного посуду в мікробіологічній лабораторії дає старший лаборант. Посуд, що був задіяний у бактеріологічній роботі, спочатку знезаражується автоклавуюванням і лише після цього його можна мити. Після миття посуд двічі ополіскується дистильованою водою і відправляється на сушіння.

2. Сушка лабораторного посуду проводиться на лабораторних сушках за кімнатної температури розташований дном доверху, щоб всередину випадково не потрапили сторонні механічні рештки (пил, пісок тощо).

3. Сухий посуд (колби, циліндри, стакани) обмотують горловину пергаментним папером і обв'язують шпагатом. Чашки Петрі по 2 або 3 обгортають пергаментним папером. Пробірки закривають ватно-марлевими корками, збирають по 10 шт. і обгортають пергаментним папером. Подібними чином поступають із скляними піпетками та іншими скляними виробами.

4. Обмотаний пергаментним папером і обв'язаний відповідним чином скляний лабораторний посуд поміщають у сухо жарову шафу, встановлюють температуру 160 С і вмикають напругу. Тривалість стерилізації за 160 °С – 150 хв., за 180 °С – 60 хв.

Завдання 2. Стерилізація середовищ автоклавуюванням.

Більшість живильних середовищ зазвичай стерилізують в автоклаві за 1 атм. (121 °С) протягом 20 хв.

Зважаючи на те, що автоклави це прилади, що працюють під високим тиском, до роботи з ними потрібно мати спеціальний допуск, який видає відповідна служба після 2-тижневого навчання. Тому ми ознайомимося поверхнево із роботою автоклава.

Проте, крім всього іншого, нас як майбутніх мікробіологів, цікавитимуть певні особливості стерилізації живильних середовищ та їх інгредієнтів. Зокрема, як можна контролювати якість стерилізації живильних середовищ, знезараження відпрацьованих культур.

При стерилізації матеріалів у вертикальних автоклавах типу ВК-33, ВК-75 часто через недосвідченість персоналу може у робочій камері автоклава може виникати так звана «мертва зона», яка являє собою прошарок холодного повітря внизу камери, що не було своєчасно видаленим у процесі запуску автоклава.

В теоретичній частині роботи описані всі методи контролю стерилізації.

Ми на занятті розглянемо окремі з них, а саме: фізичний, хімічний та біологічний.

Контрольні запитання

1. Що таке стерилізація?
2. Які існують способи стерилізації?
3. Перерахуйте види фізичної стерилізації?
4. Що таке пастеризація і коли вона застосовується?
5. Чи забезпечує повну стерилізацію медичних інструментів кип'ятіння у 2% розчині натрію гідрокарбонату? Чому?
6. Перерахуйте апарати (прилади), які використовують для термічної стерилізації?
7. Який найнадійніший метод термічної стерилізації? Чому?
8. При яких умовах стерилізації в автоклаві гинуть спори (температура, тиск, час)?
9. Що таке «мертва зона» коли вона виникає і чим вона небезпечна?
10. Якими тестами контролюють режим роботи стерилізаторів?
11. В якому випадку і як проводять механічну стерилізацію?
12. Який пристрій застосовується для стерилізації ультрафіолетовим випромінюванням і де?
13. Що означає знак про стерилізацію «EO», «FORM», «STEAM»?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Тема: ВИГОТОВЛЕННЯ ЖИВИХ І ФІКСОВАНИХ МІКРОСКОПІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ. ФАЗОВО-КОНТРАСТНА МІКРОСКОПІЯ І МІКРОСКОПІЯ У ТЕМНОМУ ПОЛІ У РОБОТІ БАКТЕРІОЛОГА.

Навчальна мета

Знати:

- Основні способи виготовлення мікропрепаратів;
- Основні способи фіксації препаратів;
- Застосування мікроскопії нативних (живих) мікропрепаратів.

Уміти:

- виготовляти мікроскопічні препарати методами відбитків; з бульйонних та агарових культур.

- фіксувати мікроскопічні препарати;
- здійснити мікроскопію мазків, препаратів;
- трактувати результати мікроскопічного дослідження.

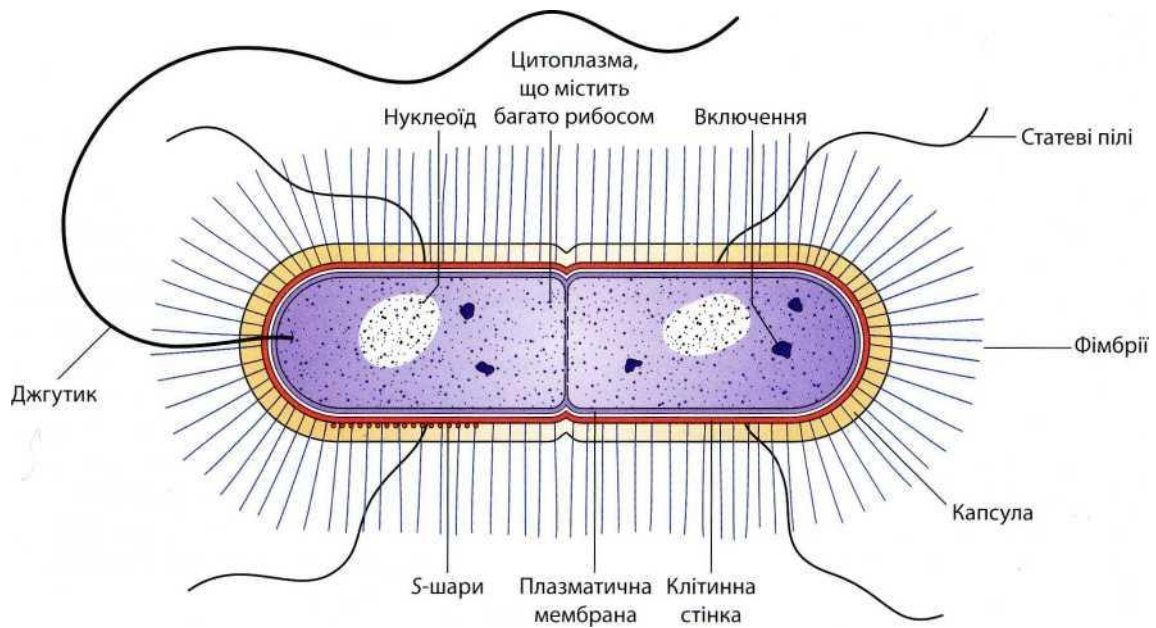
Ознайомитися із:

- методами виготовлення живих і фіксованих мікроскопічних препаратів та мазків із агарових та бульйонних культур;
- методами фіксації мікроскопічних препаратів.

Матеріали і реактиви: світловий мікроскоп з звичайним конденсором та конденсором темного поля, імерсійна олія, шматочок м'язової тканини (свині), бульйонна культура ешерихій, агарова культура стафілокока, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні стекла (звичайні, з лункою), пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, 96° етиловий спирт, фільтрувальний папір для висушування препаратів, пуста чашка Петрі, гумові рукавички, мікроскоп з звичайним конденсором та конденсором темного поля .

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Бактерії розподіляються на рухомі (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і нерухомі (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*). До руху здатні бактерії, що мають джгутики (**плаваючий рух**) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (**ковзаючий рух**). Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур – **нитки**, **гачка** та **базального тільця**. Нитка джгутика складається із білка флагеліну виступає над поверхнею бактеріальної клітини, далі біля поверхні клітини вона приєднується до крюка, який з'єднується з **базальним тільцем**, що повністю занурене в клітинні покриви та частково – у цитоплазму.

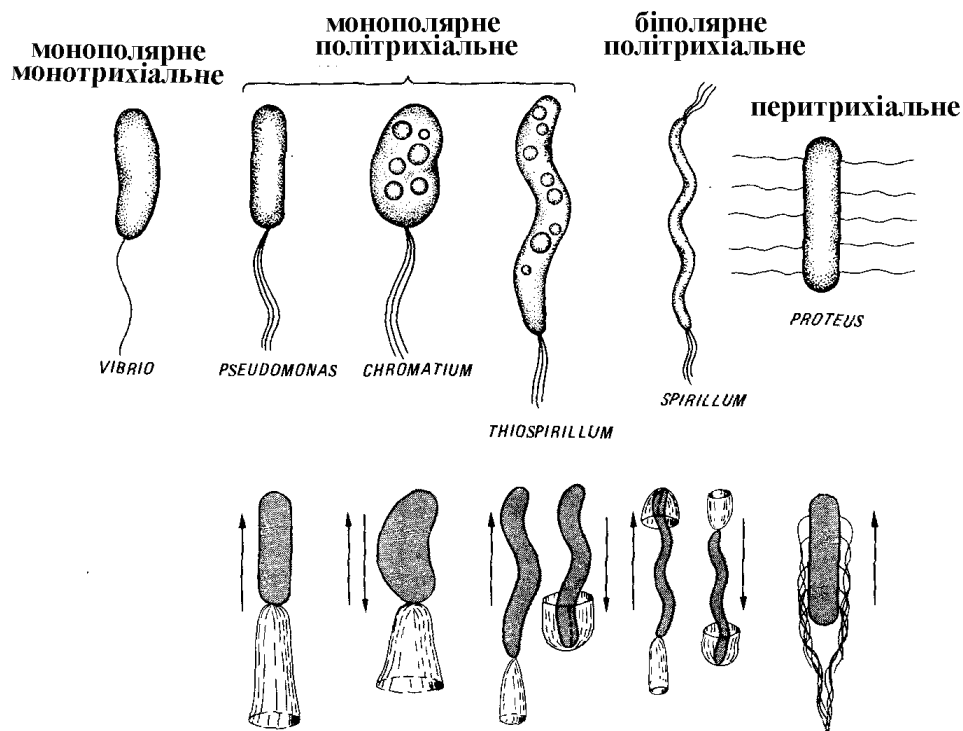


Мал. 1. Схематична будова бактеріальної клітини

До поверхневих бактеріальних структур, відносяться джгутики, війки (статеві та загальні або фібриї), та капсула)

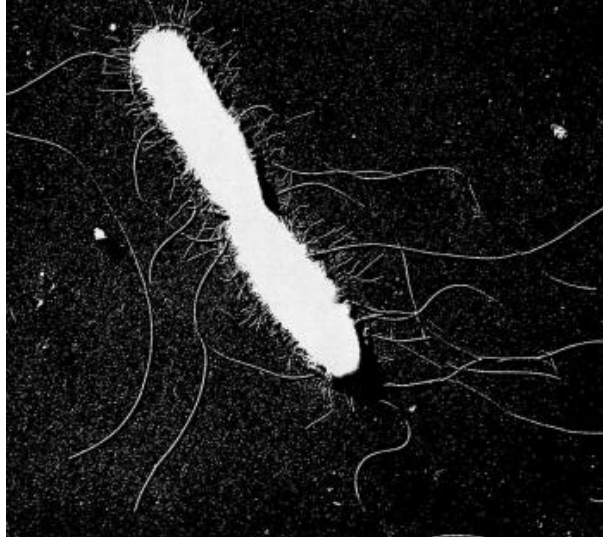
За характером розташування джгутиків бактерії поділяють на:

- монотрихи – бактерії з одним джгутиком на кінці (синьогнійна паличка);
- амфітрихи – бактерії, що мають 2 полярно розташовані джгутики або по кілька джгутиків на полюсах клітини (спірили);
- лофотрихи – бактерії, що мають по пучку джгутиків на одному або по обох полюсах бактеріальної клітини (палички синьозеленого молока);
- перитрихи – бактерії з великою кількістю джгутиків по всій поверхні клітини (кишкова паличка, сальмонели).



Мал. 2. Основні типи джгутиків і типи руху бактерій

Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина - до 15 мкм, а діаметр – 0,02 мкм). Тонку структуру джгутиків вивчають з допомогою електронного мікроскопа (мл. 3).



Мал. 3. *Salmonella enterica* серотип Typhi. Бактерії, які діляться в логарифмічній фазі росту, мають близько 15 довгих хвилястих джгутиків і понад 100 коротких фімбрій. Зверніть увагу на щільний [білий] протопласт, який відрізняється від клітинної стінки. Сухий мазок, бактерії контрастуються. Електронна мікрофотографія, x16 000 (За: Duguid J.P., Wilkinson J.F. (1961).

Простіше розглядати їх рух у мікропрепаратах «роздушена крапля» та «висяча крапля».

Для фарбування джгутиків розроблено ряд методів. Їх можна поділити на звичайні світлові та імунофлуоресцентні. До перших відносять методи за Греєм, за Лейфсоном, за Леффлером. Для виявлення джгутиків імунофлуоресцентним методом потрібно мати мічені ФІТЦ (флуоресцеїну ізотіоціанатом) антивидові глобуліни, люмінесцентний мікроскоп.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Виготовлення живих мікроскопічних препаратів

Виявлення мікроорганізмів в біологічному матеріалі за допомогою мікроскопа називається *мікроскопічним* методом лабораторної діагностики. Мікроскопічні препарати бувають двох видів:

1. *Живі (нативні)*. Вивчення мікроорганізмів у живому стані найчастіше проводять на мікроскопічних препаратах 1.1.«Роздушена *крапля*» або 1.2.«*Висяча крапля*».

2. **Фіксовані або вбиті.** Вивчення мікроорганізмів у фіксованому стані проводять під імерсійним збільшенням мікроскопа на мікропрепаратах, які готують у такій послідовності:

- виготовлення мазка з культури або мазка-відбитка;
- підсушування мазка на повітрі до сухого стану;
- фіксація мазка, яку здійснюють високою температурою (на полум'ї спиртівки або газового пальника) або хімічними речовинами (метанолом, етанолом, ацетоном, спирт-ефіром та іншими речовинами); *фіксацією мазка досягаємо*: а) знезараження бактерій; б) денатурації білку бактерій, що полегшує сприймання бактеріальною клітиною барвників; в) кращого прилипання мікробів до поверхні предметного скла.

- фарбування, яке може бути

2.1. *простим*, коли застосовують лише один барвник, і

2.2. *складним*, коли застосовують два і більше барвників (фарбування бактерій за Грамом, мікобактерій за Ціль-Нільсенном, спор за Пешковим і т.д.);

- промивання;

- підсушування;

- розглядання під великим збільшенням мікроскопа.

1.1. Виготовлення мікропрепарату «роздушена крапля».

На чисте знежирене скло наносимо краплю огіркового розсолу або крапельку 18-годинної культури кишкової палички. Накриваємо покривним скельцем; надлишок рідини збираємо фільтрувальним папером і розглядаємо під об'єктивом $\times 40$.

1.2. Виготовлення мікропрепарату «Висяча крапля»

На покривне скельце наносимо краплю досліджуваної культури. Краї ямки на предметному склі змазуємо вазеліном або якоюсь олією (можна імерсійною). Предметне скло обережно накладаємо на покривне скельце таким чином, щоб крапля досліджуваної культури розмістилась по центру ямки предметного скла, але не торкалася країв ямки. Предметне скло із прикріпленим до нього покривним скельцем обережно перевертаємо, кладемо на предметний столик мікроскопа і розглядаємо під об'єктивом $\times 40$ або наносимо краплю імерсійної олії на покривне скельце і розглядаємо під імерсійним об'єктивом.

Завдання 2. Виготовлення мазків із культур мікроорганізмів

Мазки з культури мікроорганізмів виготовляють для вивчення їх морфології та тинкторіальних властивостей.

Увага! Під час роботи з живими культурами ретельно дотримуйтеся правил техніки безпеки.

Завдання 2.1. Виготовлення мазка із бульйонної культури.

Алгоритм “Виготовлення мазка із бульйонної культури

- підготуйте предметне скло, нанесіть контури майбутнього мазка;
- переверніть скло (нанесений контур знизу);
- у лівому верхньому куті скла поставте свій номер;
- зафламбуйте скло у полум'ї спиртівки (скло тримати пінцетом);
- покладіть скло у кришку чашки Петрі;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю, візьміть бульйонну культуру;
- нанесіть краплю культури на предметне скло, розітріть;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- залишіть мазок для висихання.

Увага! Висушувати мазки слід на повітрі. Під впливом високої температури структура мікробної клітини порушується.

Завдання 2.2. *Виготовлення мазка з агарової культури.*

Алгоритм «Виготовлення мазка з агарової культури»

- підготуйте предметне скло, нанесіть контури майбутнього мазка;
- переверніть скло нанесеним контуром знизу;
- у лівому верхньому куті скла поставте свій номер;
- зафламбуйте скло у полум'ї спиртівки (скло тримати пінцетом);
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- нанесіть краплю стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду на предметне скло;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- відкрийте лівою рукою чашку Петрі з ростом культури мікроорганізмів;
- притуліть бактеріологічну петлю до стінки чашки Петрі (для охолодження петлі);

Увага! Слід брати колонію мікроорганізмів, а не агар!

- візьміть петлею матеріал з однієї колонії;
- закрийте чашку Петрі;
- нанесіть матеріал на суху поверхню скла поряд із краплею ізотонічного розчину натрію хлориду, розітріть;
- рівномірно розмішайте матеріал із краплею ізотонічного розчину натрію хлориду;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- залишіть мазок для висихання.

Завдання 3. *Фіксація мазків мікропрепаратів.*

Мазки фіксують для: закріплення матеріалу на склі, знезараження, кращого фарбування (вбиті мікроби краще поглинають барвник).

Для фіксації мазків використовують два способи: фізичний і хімічний.

Фізичний спосіб. Фіксацію проводять у полум'ї спиртівки протягом 6 с.

Для цього скло беруть пінцетом або I і II пальцями правої руки і проводять тричі повільно через верхню частину полум'я мазком догори. Правильність фіксації перевіряють, торкаючись нижньою поверхнею скла тильної сторони лівої руки. Мазок повинен бути гарячим, але не обпікати руку.

Цим методом фіксують мазки, виготовлені з культури мікроорганізмів, за умови, що під час нагрівання не змінюється структура мікробної клітини.

- **Хімічний спосіб.** Для фіксації використовують хімічні речовини: безводний метиловий спирт – фіксують протягом 5 хв.,
- спирт етиловий 96 % – 10–15 хв.,
- суміш Нікіфорова – 10–15 хв.,
- ацетон – 5 хв.,
- суміш парів хлоридної кислоти і формаліну – декілька секунд.

Хімічним способом фіксують мазки, виготовлені із патологічного матеріалу, а також з культури в тому разі, коли під час нагрівання може порушитися структура бактеріальної клітини (капсульні форми бактерій, спірохети).

Зафіксований мазок називається мікропрепаратом.

Зафіксуйте мазки, виготовлені з агарової і бульйонної культури, фізичним способом.

Алгоритм “Фіксація мазка фізичним способом

- візьміть пінцетом предметне скло з висušеним мазком;
- проведіть тричі через верхню частину полум'я спиртівки;
- доторкніться нижньою поверхнею скла до тильної сторони лівої руки (перевірка правильності фіксації).

Контрольні запитання

1. Види/типи руху у бактерій.
2. Поділ бактерій за кількістю та місцем розташування джгутиків на мікробній клітині.
3. Опишіть методи виявлення джгутиків бактерій.
4. Які є види мікроскопічних препаратів?
5. Розкажіть хід виготовлення препарату «роздушена крапля».
6. Розкажіть хід виготовлення препарату «висяча крапля».
7. Що ми досягаємо, фіксуючи мікропрепарати?
8. Яка різниця у виготовленні мазків з бульйонної та агарової культури?
9. Які є способи фіксації мазків?
10. У яких випадках застосовують фізичний метод фіксації, а в яких хімічний?
11. Чим відрізняється мікропрепарат від мазка?
12. Чи дозволяється залишати на відкритих місцях незафіксовані мазки? Чому?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Тема: МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ЗА ГРАМОМ: СУТЬ І МЕТОДИКА ФАРБУВАННЯ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ФАРБУВАННЯ ЧИСТИХ І ЗМІШАНИХ КУЛЬТУР.

Навчальна мета

Знати:

- прості методи фарбування мікропрепаратів;
- суть і методику фарбування препаратів за Грамом;
- будову клітинної стінки бактерій.

Уміти:

- виготовляти мікроскопічні препарати;
- фіксувати мікроскопічні препарати;
- фарбувати препарати з Грамом;
- здійснювати мікроскопію мазків, препаратів;
- трактувати результати мікроскопічного дослідження.

Матеріали і реактиви: світловий мікроскоп з звичайним конденсором та конденсором темного поля, імерсійна олія, бульйонна культура ешерихій, агарова культура стафілокока, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні стекла (звичайні, з лункою), пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, барвники по Граму: папірці, пофарбовані за Синьовим, розчин Люголя, 96° етиловий спирт; фільтрувальний папір для висушування препаратів, пуста чашка Петрі, гумові рукавички, мікроскоп з звичайним конденсором.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Виявлення мікроорганізмів в біологічному матеріалі за допомогою мікроскопа називається **мікроскопічним** методом лабораторної діагностики.

Мікроорганізми мають настільки малі розміри, що вивчати їх у незабарвленому вигляді під світловим мікроскопом неможливо, до того ж вони прозорі. Тому частіше їх вивчають у забарвленому стані. Вивчення мікроорганізмів у пофарбованому препараті дає змогу не тільки вивчити їх форму, розміщення, а й виявити деталі структури клітини (спору, капсулу), а також хімічний склад, через те, що різні хімічні речовини проявляють різну спорідненість до барвників і після фарбування мають різний колір або різну інтенсивність забарвлення.

Здатність мікроорганізмів сприймати барвники називають **тинкторіальною** (від лат. *tinctoria* – настоянка) властивістю.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Фарбування мікропрепаратів

1.1. Простий метод фарбування мікропрепаратів.

Під час простого методу фарбування використовують один барвник.

Цей метод ще називається *орієнтовним*, оскільки його використовують тільки для виявлення мікробів у досліджуваному (біологічному, патологічному, культурі тощо) матеріалі, визначення їх кількості, форми, взаємного розташування.

Алгоритм «*Фарбування препарату простим методом*»

- помістіть фіксований мікропрепарат на підставку в посудину для фарбування;
- нанесіть барвник піпеткою так, щоб він закрити весь препарат;
- проконтролюйте термін дії барвника (фуксин Пфейффера – 1–2 хв., метиленовий синій – 3–5 хв., фарба Ребігера (мікропрепарат не фіксуємо, експозиція фарби становить 15–20 с.);
- промийте препарат водою;
- висушіть препарат фільтрувальним папером.

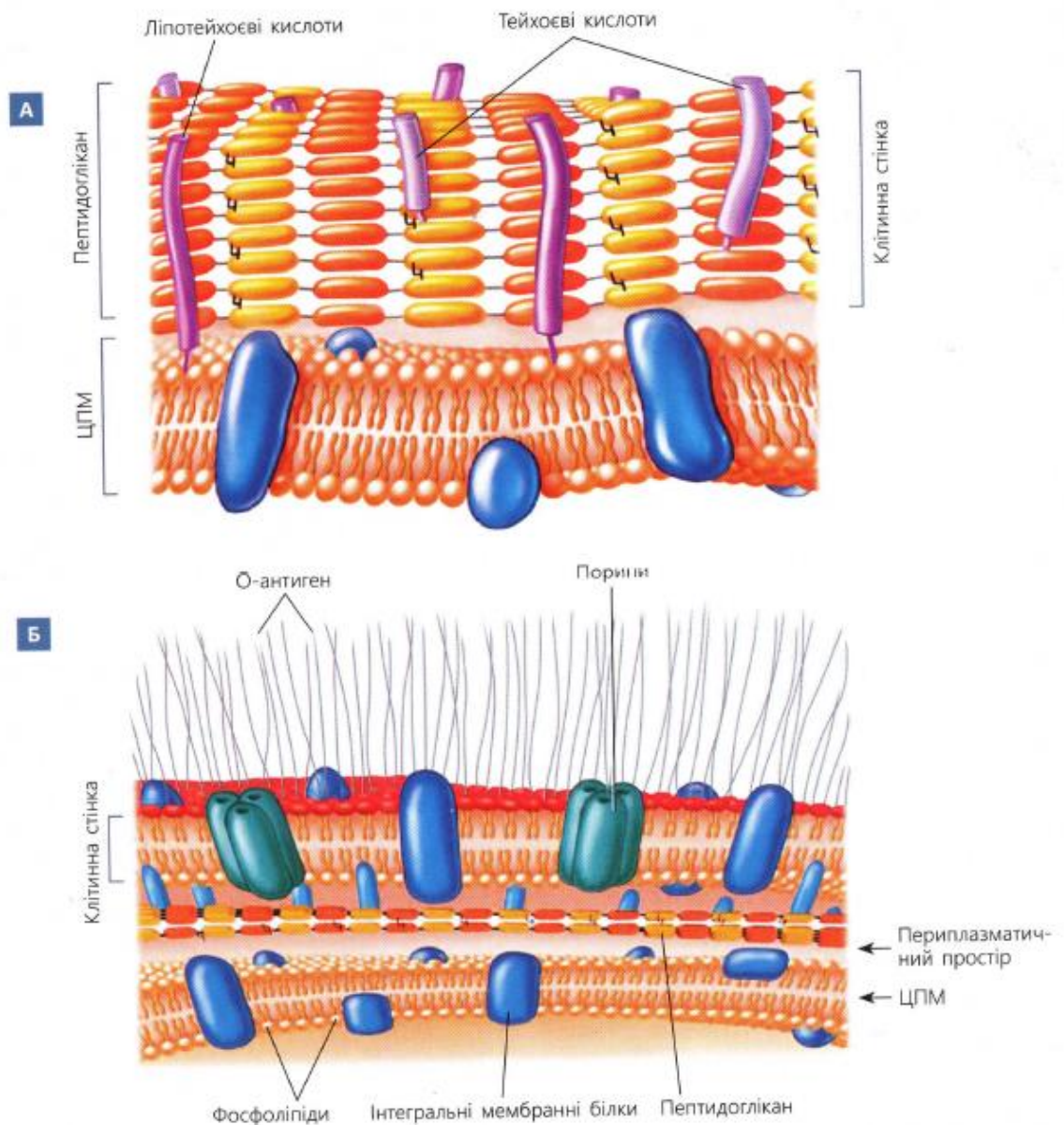
1.2. Складні методи фарбування мікропрепаратів. Фарбування за Грамом.

Метод фарбування мазків-препаратів за Грамом належить до складних методів, тому що на мазок наносять два барвники, один з яких є основним, а інший – додатковим. Ці методи називають ще диференціальними, оскільки вони дають змогу розрізнити окремі групи бактерій, а також виявити хімічний склад і структуру бактеріальної клітини.

Під час фарбування за Грамом бактерії поділяють на 2 групи: *грампозитивні* (забарвлюються в фіолетовий колір) та *грамнегативні* (забарвлюються в червоний колір). Різний колір забарвлення пояснюється різною будовою їх клітинної стінки.

Основну частину клітинної стінки **грампозитивних бактерій** складає *пептидоглікан* – понад 90 %. Він має форму сітки. У грампозитивних бактерій він утворює 5–6, а інколи до 40 шарів. Коли бактерії фарбують генціановим фіолетовим, а потім розчином Люголя, то утворюється нерозчинний у спирті і воді *комплекс йоду з барвником*. Цей комплекс не вимивається спиртом і водою через слабку проникність клітинної стінки (пептидоглікану). Грампозитивні бактерії залишаються забарвленими у *фіолетовий колір*. Дофарбовування препарату фуксином Пфейффера (фарба червоно кольору) не змінює фіолетового кольору клітин мікроорганізмів.

У **грамнегативних бактерій** пептидоглікан утворює переважно один шар, зрідка – два. Тому комплекс генціанового фіолетового з йодом легко вимивається спиртом і водою, внаслідок чого бактерії знебарвлюються. Знебарвлені бактерії забарвлюються фуксином Пфейффера у *червоний колір*.



Мал. 1. Схема будови клітинної стінки грамозитивних (А) і грамнегативних (Б) бактерій.

Алгоритм “Фарбування за Грамом”:

- покладіть на мазок папірець, пофарбований генціановим фіолетовим, змочіть його водою – 2–3 краплі, витримайте 2 хв.;
- або нанесіть фарбу генціановий фіолетовий на фільтрувальний папірець на мазку також на 2 хв.
- зніміть папірець пінцетом,
- не промиваючи препарат, нанесіть розчин Люголя – 2 хв. (до почорніння);
- нанесіть 96 % етиловий спирт – 20–30 с або йодований спирт – на 1 хв.
- промийте водою;
- нанесіть фарбу фуксин Пфейффера на 1–2 хв.;
- промийте водою;
- висушіть препарат фільтрувальним папером.

Мікропрепарати розглядають під імерсійним об'єктивом

Контрольні запитання

1. Які властивості мікроорганізмів називають тинкторіальними?
2. Що таке прості методи фарбування?
3. Які барвники використовують для простого фарбування мікропрепаратів?
4. Які методи фарбування називають складними? Чому їх називають диференціальними?
5. На які групи поділяють бактерії у разі фарбування за Грамом?
6. Чому під час фарбування за Грамом грампозитивні бактерії забарвлюються у фіолетовий колір?
7. Чому під час фарбування за Грамом грамнегативні бактерії забарвлюються у червоний колір?
8. Назвіть алгоритм фарбування за Грамом.
9. Як побудована клітинна оболонка грампозитивних бактерій?
10. Як побудована клітинна оболонка грамнегативних бактерій?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Тема: МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ КАПСУЛ і ДЖГУТИКІВ.

Навчальна мета

Знати:

- Основні способи виявлення капсул;
- Основні способи виявлення джгутиків;

Уміти:

- виготовляти мікроскопічні препарати для фарбування з метою виявлення капсул та джгутиків .
- фарбувати відповідним методами бактеріальні капсули та джгутики
- трактувати результати мікроскопічного дослідження.

Ознайомитися із:

- особливостями хімічного складу та функціями капсул у бактерій;
- будовою джгутиків та типами бактерій за типом розміщення джгутиків.

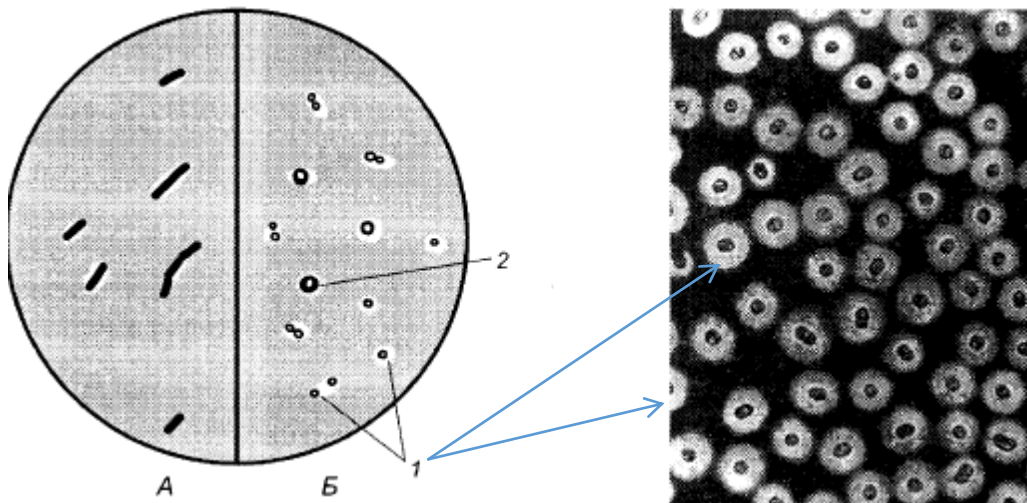
Матеріали і реактиви: світловий мікроскоп з звичайним конденсором, бульйонна культура *Azotobacter chroococcum*, бульйонна культура *Pseudomonas fluorescens*, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні скельця, покривні скельця, туш, фуксин Ціля, імерсійна олія, пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, 96° етиловий спирт, фільтрувальний папір для висушування препаратів, чашки Петрі, гумові рукавички, дезрозчин (3% хлорамін).

Хід заняття:

1. Опитування та оцінка засвоєння студентами матеріалу попередньої лабораторної роботи.
2. Коротке роз'яснення матеріалу по темі лабораторної роботи.
3. Практичне проведення лабораторної роботи.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Капсулоутворення. *Капсула* – це поверхнева структура багатьох видів бактерій. Вона не є життєво необхідна – якщо її немає, то клітина не втрачає життєздатності. Найчастіше капсула синтезується бактеріальною клітиною або в макроорганізмі або під час культивування бактерій на середовищах багатих вуглеводами. **Хімічний склад капсул** різноманітний: низка видів бактерій утворюють слизисті капсули, які на **98 % складаються із води**, а решта **2 % – полімерні сполуки** – гомополісахариди, гетеро полісахариди, екзополіпептиди. Особливості складу капсульних полісахаридів визначають антигенну структуру бактерій, різні серологічні типи (серотипи) бактерій, що належать до одного виду. Великі капсули утворюють бактерій родів *Azotobacter*, *Azotomonas*, *Azetobacter* та деякі інші (Мал. 1.).

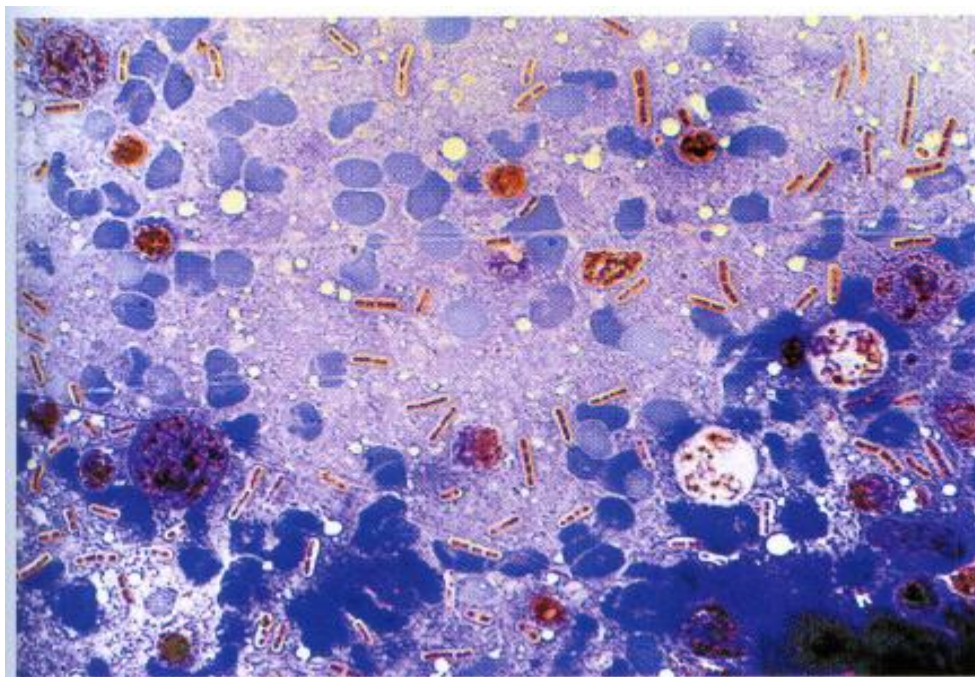


Мал. 1. Капсули у бактерій: А – *Bacillus subtilis*; Б – *Azotobacter chroococcum* (1 – капсули; 2 цисти).

Капсули відіграють захисну роль, зокрема:

- від висихання,
- від проникнення токсичних речовин і солей важких металів,
- від фагоцитозу (в організмі).

Для багатьох видів бактерій капсули є **детермінантами** (або свідчать про) **вірулентності**, оскільки вони **блокують фагоцитоз**, беруть участь в **адгезії мікроорганізмів до тканин організму**.



Мал. 2. Капсули збудника сибірки у мазку-відбитку із селезінки (фарбування за методом Ребігера)

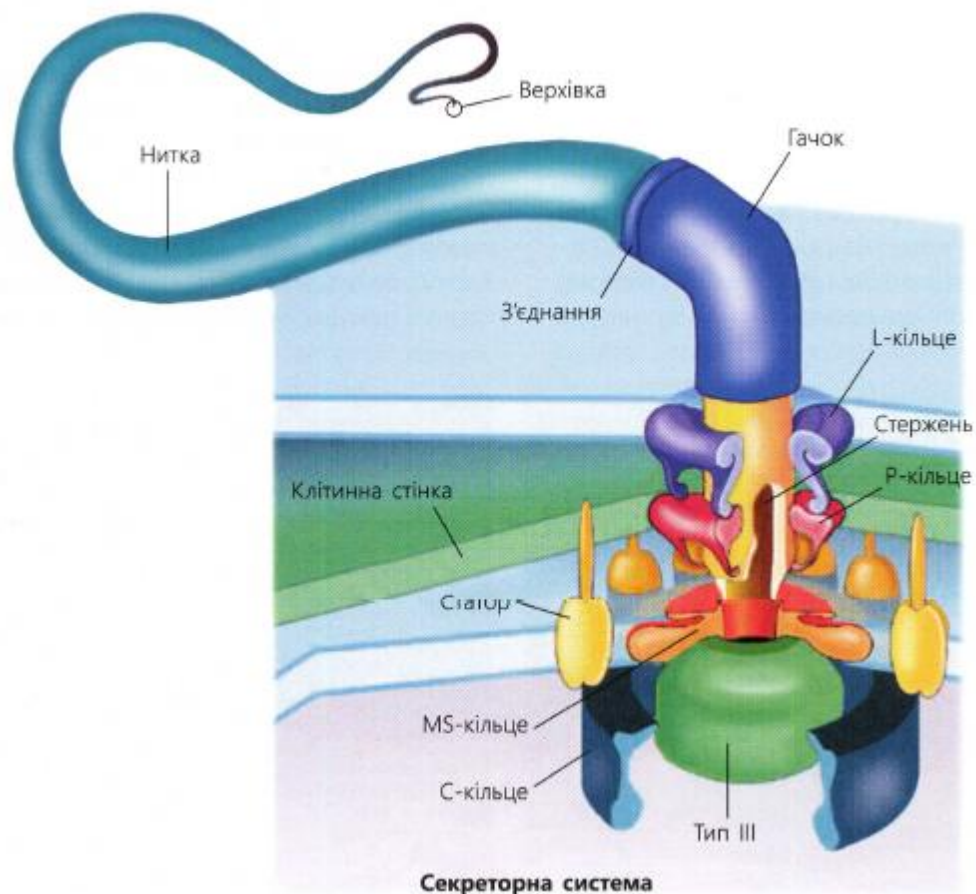
Для виявлення капсул застосовують різні методи, зокрема:

- метод Романовського-Гімза
- метод Ольта
- метод Ребігера
- метод Бурі-Гінса
- метод Міхіна
- метод Гісса
- метод Омелянського
- метод Антоні
- метод Іоне

Рух бактерій. Бактерії розподіляються на *рухомі* (представники родів *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirochaeta*) і *нерухомі* (наприклад, види родів *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*).

До руху здатні бактерії, що мають джгутики (*плаваючий рух*) і бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні пересуватися іншим способом, наприклад, при контакті зі щільним субстратом (*ковзний тип руху*). Джгутиковий апарат бактерій складається з білкових структур – нитки, крюка та базального тільця (мал. 3).

За характером розташування джгутиків бактерії поділяють на: монотрихи, амфитрихи, лофотрихи, перитрихи. Число, характер розміщення та розмір джгутиків є постійними ознаками певного оvidу бактерій.



Мал. 3. Схематичне зображення будови джгутика бактерій.

Фарбування джгутиків – одна з найскладніших методик. Дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно, це пов'язано з їхнім розміром (довжина – до 15 мкм, а діаметр – 12–18 нм).

Для виявлення джгутиків існує ряд методів. Їх можна поділити на:

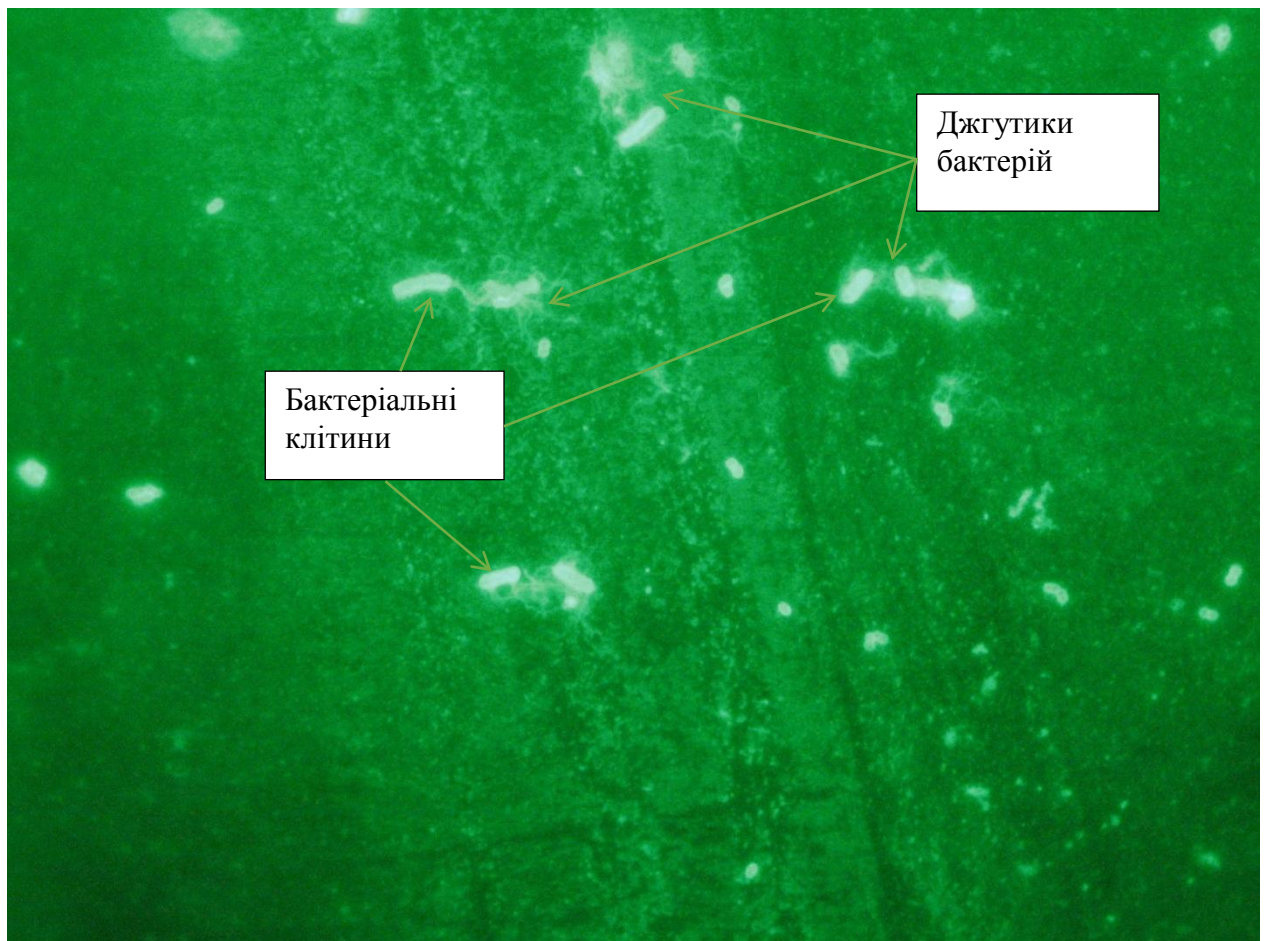
1. **Непрямі** (при цьому ми спостерігаємо за рухом бактерій у мікропрепаратах «роздушена крапля» та «висяча крапля»).

2. **Прямі**. При прямих джгутики забарвлюють барвниками або солями важких металів, застосовують спеціальні протрави, аби більшими їх діаметр.

При цьому застосовують 3 типи мікроскопії: електронну, світлову, люмінесцентну.

Методи забарвлення джгутиків: за Греєм, за Лейфсоном, за Леффлером, Морозова, Уварова, Беніньєтті, Валенті.

Добре виявляються джгутики за допомогою імунофлуоресцентного методу. Для цього потрібно мати: *імунофлуоресцентний діагностикум – мічені ізотіоціанат флуоресцеїну специфічні антитіла до того чи іншого мікроорганізму та молоду у фазі активного росту досліджувану культуру, яка має джгутики* (Мал. 4).



Мал. 4. Джгутики бактерій *Clostridium chauvoei* (прямий варіант методу флуоресціюючих антитіл)

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Виготовлення мікроскопічних препаратів та фарбування капсул.

Алгоритм “Фарбування капсул за Ребігером”:

— На приготований нефіксований мазок *Azotobacter chroococcum*, нанесіть фарбу Ребігера на 15–20 с.

— промийте водою;

— висушіть препарат фільтрувальним папером.

Мікропрепарати розглядають під імерсійним об’єктивом

Тіло бактерій – темно фіолетового укольну, капсула – світло-фіолетового.

Алгоритм “Фарбування капсул за Бурі”:

— На предметне скло нанесіть краплю профільтрованої і розведеної туші, змішайте її з краплею суспензії культури *Azotobacter chroococcum*, накрийте препарат покривним склом;

— висушіть препарат на повітрі;

Мікропрепарат розглядають під імерсійним об’єктивом

На темному фоні видно диплококи азотобактера, оточені незафарбованими капсулами.

Завдання 2. Виготовлення мікроскопічних препаратів та фарбування джгутиків

Важливою умовою для успішного зафарбування джгутиків є виготовлення мазків із «молодої» 12–18-годинної культури мікроорганізмів на ідеально чистих знежирених скельцях

Алгоритм “Фарбування джгутиків за Валенті”:

— На предметне скло наносимо 5-6 крапель водопровідної води і бактеріологічною петлею наносимо бульйонну культуру *Pseudomonas fluorescens*, не емульгуємо її, а залишаємо петлю доти, доки бактерії самі розійдуться в рідині. Висушуємо мікропрепарат на повітрі.

— приготований нефіксований мікропрепарат обробляємо 20 % розчином таніну при підігріванні над полум'ям, промиваємо дистильованою водою.

— Фарбуємо карболовим фуксином протягом 10 хв. при підігріванні 15–20 с.

— Промиваємо водою;

— Висушуємо препарат на повітрі.

Мікропрепарати розглядають під імерсійним об'єктивом

Тіло бактерій і джгутики – темно-червоного кольору.

Оформіть щоденник. Замалюйте в щоденнику кольоровими олівцями вигляд мікроорганізмів з капсулами та джгутиками під мікроскопом.

Контрольні запитання

1. Що таке капсула бактерій? Чи можуть існувати безкапсульні види бактерій?
2. В яких випадках запускається синтез капсули?
3. Для чого бактеріальна клітина синтезує капсулу (роль капсул)?
4. Назвіть три методи фарбування бактеріальних капсул
5. З яких структур складається джгутик бактерії?
6. Чим характеризуються перитрихи? Назвіть представників перитрихів?
7. Чим характеризуються монотрихи? Назвіть представника монотрихів?
8. Чому дослідити джгутики бактерій у світловий мікроскоп досить складно?
9. Чи може кількість і спосіб розміщення джгутиків змінюватись в бактерій одного виду?
10. Назвіть два методи виявлення джгутиків?
11. Назвіть кілька способів фарбування джгутиків?
12. Які види мікроскопії можна застосувати для виявлення джгутиків?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Тема: МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ ЕНДОСПОР ТА ВКЛЮЧЕНЬ

Навчальна мета

Знати:

- Основні способи виявлення ендоспор;
- Основні способи виявлення включень;

Уміти:

- виготовляти мікроскопічні препарати з метою фарбування ендоспор та включень;
- фарбувати відповідними методами ендоспори та включення;
- трактувати результати мікроскопічного дослідження.

Ознайомитися із:

- особливостями хімічного складу та функціями спор у бактерій;
- та поділом бактерій за будовою спор на бацили та клостридії.
- особливостями хімічного складу та функціями включень у бактерій;

Матеріали і реактиви: світловий мікроскоп з звичайним конденсором, бульйонна культура сінної палички *Bacillus subtilis*, культура пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні скельця, покривні скельця, туш, фуксин Ціля, імерсійна олія, пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, 96° етиловий спирт, фільтрувальний папір для висушування препаратів, чашки Петрі, гумові рукавички, дезрозчин (3% хлорамін).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Цитоплазматичні включення утворюються шляхом агрегації речовин, які можуть бути або *органічними*, або *неорганічними*.

До включень, які виконують **роль запасних поживних речовин**, належать полісахариди, ліпіди, поліпептиди, поліфосфати тощо.

Із включень **полісахаридної** природи в клітинах найчастіше можна виявити **глікоген**, **крохмаль** і крохмалеподібну речовину **гранульозу**. За несприятливих умов ці сполуки використовуються мікроорганізмами як джерело вуглецю і енергії.

Ліпіди накопичуються в клітинах у вигляді гранул та краплинок **жиру**; зокрема, таким включенням часто є **полімер поліоксималярної кислоти**. У **мікобактерій** у вигляді запасних речовин відкладаються **воски**.

Полісахариди, ліпіди є для бактерій джерелом вуглецю й енергії.

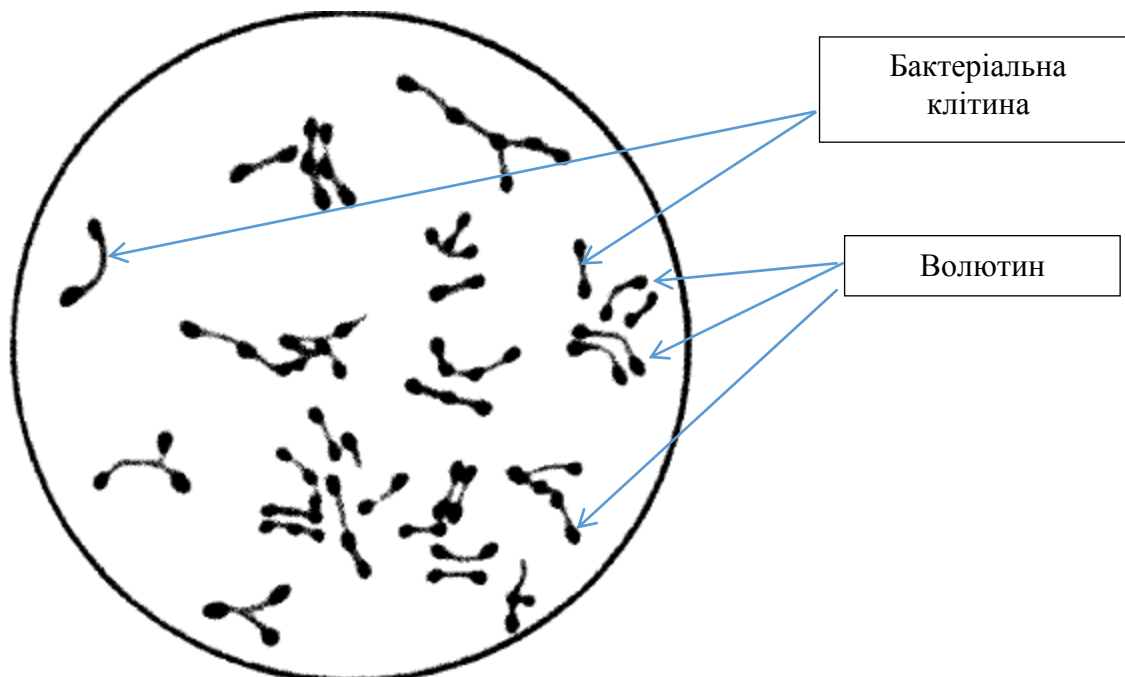
Включення можуть мати форму: **гранул**, **кристалів** або **глобул**; деякі - **аморфні**.

Дуже поширеними запасними речовинами у багатьох бактерій і ціанобактерій є **поліфосфати**, які дістали назву **волютин**. Уперше волютин

було виявлено у *Spirillum volutans*, звідки й походить їх назва. Цей вид запасних речовин використовується клітинами як джерело фосфору й енергії.

Наявність включень має діагностичне значення для ідентифікації деяких бактерій (наприклад, наявність включень волютину дає можливість відрізнити збудників дифтерії від непатогенних представників тієї ж родини, що подібні за морфологією).

Зерна волютину – це комплекс РНК та неорганічних фосфатів; іноді їх називають **метахроматичними тільцями** (мал. 1).



Мал. 1. Включення волютину у збудника дифтерії.

Спори (ендоспори) у бактерій.

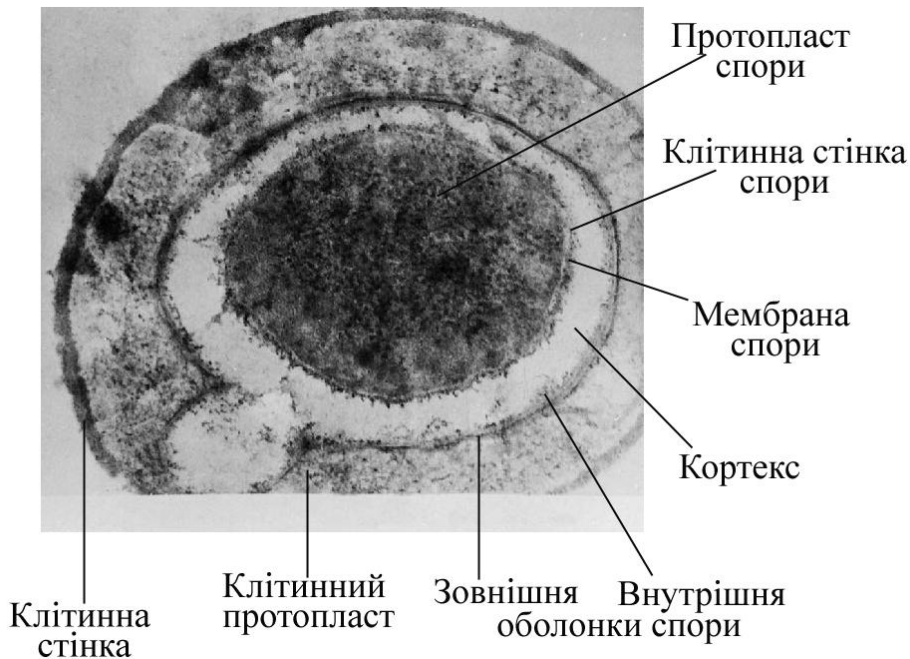
У бактерій, які належать до родів *Bacillus*, *Clostridium* та деяких інших, всередині клітини утворюються округлі або еліптичні тільця, які дістали назву **ендоспор**.

Уперше існування спор у бактерій виявив **К. Еренберг** у 1838 р., а докладно вивчив їх **Л. Пастер**. Спороутворення зустрічається переважно у паличкоподібних бактерій як сапрофітних, так і паразитарних форм. Серед кулястих бактерій воно буває дуже рідко. У кожній клітині може утворитися тільки одна спора. Тому **спороутворення у бактерій**, на відміну від грибів, розглядається не як спосіб розмноження, а як **захисне пристосування до несприятливих умов середовища**.

Утворення спор – це одна із стадій циклу розвитку певних бактерій, яка виробилась у процесі еволюції в боротьбі за збереження виду.

Електронні мікрофотографії показують, що спора складається з **серцевини**, оточеної кількома шарами, які значно відрізняються за складом. **Серцевина (ядро спори)** має такі клітинні структури, як **рибосоми** і **нуклеоїд**, але містить дуже **низький вміст води**. Ядро оточене **внутрішньою мембраною** (1 шар), яка у свою чергу покрита **стілкою серцевини** (2 шар),

що містить **пептидоглікан**, який утворюватиме стінку вегетативної клітини, що виростає зі спори після проростання. Далі йде **кортекс** (3 шар), який може займати аж половину об'єму спори і складається з **пептидоглікану**. Кортекс оточений **фосфоліпідною двошаровою оболонкою** (4 шар), яка називається **зовнішньою мембраною**. Поверх зовнішньої мембрани розташовується **шуба** (5 шар) – складна структура, утворена з кількох шарів, які містять понад 70 різних білків, які міцно зшиті один з одним. Багато бактерій додатково утворюють оболонку з глікопротеїнів – **екзоспориум** (мал. 2).



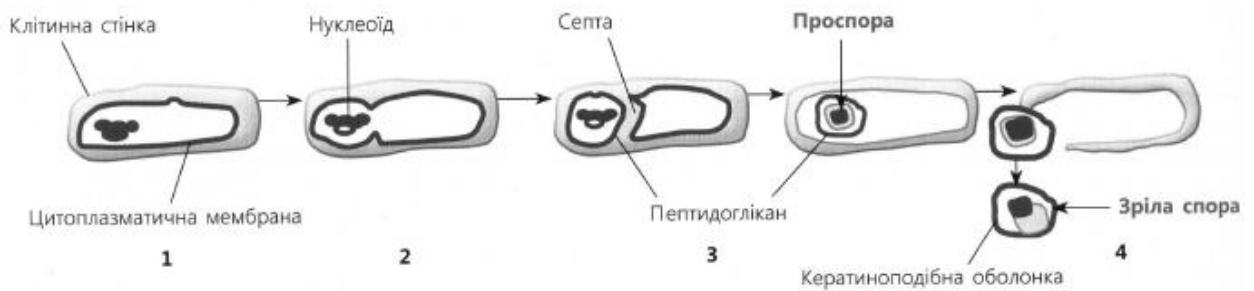
Мал. 2. Будова спори.

Найчастіше **спороутворення** у бактерій **спричиняється**:

- нестачею поживних речовин у середовищі,
- нагромадженням у ньому шкідливих продуктів обміну,
- несприятливою температурою,
- зміною *pH* тощо.

Вважають, що утворення спор не є обов'язковою стадією циклу розвитку бацил. За сприятливих умов вони можуть тривалий час рости і розмножуватися як вегетативні клітини.

Процес спороутворення в клітині може тривати від кількох годин до доби. Є чотири стадії утворення спори: підготовча, стадія передспори (проспори), утворення оболонки, дозрівання (мал. 3).



Мал. 3. Стадії утворення спори.

Коли спора дозріває, вона може зберігати свою життєздатність протягом *сотень і навіть тисяч років*. В літературі є дані, що життєздатні спори бактерій було виділено із трупів мамонтів і єгипетських мумій, вік яких обчислюється тисячоліттями.

Спори бактерій *дуже стійкі* до висушування, низької і високої температури, хімічних дезінфекційних речовин та інших факторів. Так, спори сінної палички (*Bacillus subtilis*) витримують кип'ятіння протягом двох годин. Описано також спори бактерій, які залишалися живими при кип'ятінні в концентрованій соляній кислоті протягом 20 хв. Спори гинуть від автоклавування при температурі 121–125° С протягом 30 хв. або у сухожаровій шафі при 150–170°С протягом 3 год.

Форма, розмір та локалізація спор є характерними видовими ознаками, які використовуються при ідентифікації бактерій.

Здатність бактерій до спороутворення використовується у систематиці та діагностиці захворювань.

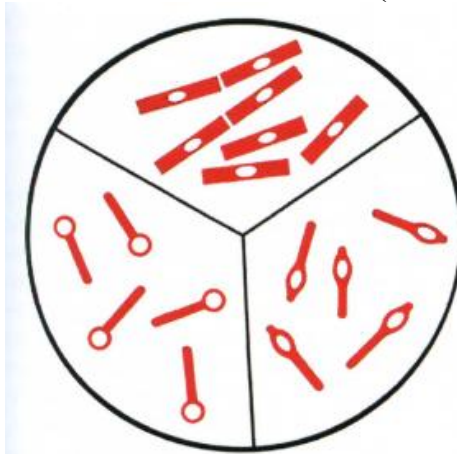
Спори можуть бути овальної або округлої форми.

У бацил розмір спор не перевищує діаметр вегетативних клітин, тому спори не змінюють їхньої форми;

у клостридій діаметр спор значно більший, ніж діаметр вегетативної клітини, а тому форма бактеріальної клітини сильно змінюється і вона має вигляд лимона, груші, тенісної ракетки, барабанної палички.

У тілі різних бактерій спори можуть розташовуватися (мал. 3):

- центральнo (*Bacillus anthracis*);
- субтермінальнo, тобто ближче до одного кінця (*Clostridium botulinum*);
 - термінальнo – на кінці клітини (*Clostridium tetani*).



Мал. 4. Розміщення спор у бактеріальній клітині.

Потрапляючи в сприятливі умови, спора проростає і перетворюється на вегетативну клітину. За сприятливих умов спора може прорости за кілька годин. Проростання починається з інтенсивного поглинання води і набухання спори. В цей час різко зростає активність ферментів, підвищується інтенсивність дихання, відбуваються зміни у хімічному складі спори. Під впливом тиску, спричиненого ростом, оболонка спори розривається і з'являється **ростова трубка**. Проростання спори може відбуватися **полярно**, рідше біполярно, а також між полюсом і центром.

Якщо є поживні речовини, з пророслої спори утворюється вегетативна клітина, яка виходить з оболонки спори, видовжується і починає ділитися.

Наявність спор у бактерій поряд з іншими ознаками має важливе значення для діагностики та визначення їхнього виду (**ідентифікації**).

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Виявлення спор у нативних препаратах.

Готуємо препарат «роздушена крапля» з 24-годинної або старішої культури спороутворювальних бактерій (**Bacillus subtilis, B. mycoides, B. brevis чи B. mesentericus**).

Розглядаємо їх під мікроскопом (об'єктив $\times 40$); відмічаємо наявність у клітинах світлозаломлюючих тілець – ендоспор.

Завдання 2. Виготовлення мікроскопічних препаратів та фарбування спор.

Існує ряд методів пофарбування для виявлення спор: за Ожешко, Пешковим, Меллером, Дорнером, Шеффера-Флутоном, Ауескі, Трухільо.

Алгоритм **“Фарбування ендоспор за методом Пешкова”**:

— На предметному склі готуємо мазок 72-годинної бульйонної культури *Bacillus subtilis*.

— Висушуємо мікропрепарат на повітрі.

— Фіксуємо на полум'ї.

— Фарбуємо лужним метиленовим синім або синькою Леффлера протягом 30 с при підігріванні (до кипіння фарби) мазка;

— Фарбу змиваємо водою;

— Фарбуємо 0,5% водним розчином нейтрального червоного протягом 30–40 с.

— Промиваємо водою;

— Висушуємо препарат на повітрі.

Мікропрепарати розглядають під імерсійним об'єктивом.

Спори – сині або голубі, **цитоплазма бактерій** – червона.

Завдання 3. Виготовлення мікроскопічних препаратів та фарбування цитоплазматичних включень.

Існує ряд методів фарбування бактерій для виявлення включень, зокрема за Леффлером, П'ю, Раскіною, Мейером, Альбертом тощо.

Алгоритм **“Фарбування включень за методом Леффелера”**:

— На предметному склі готуємо мазки з 5-годинної культури *Saccharomyces cerevisiae*.

— Висушуємо мікропрепарат на повітрі.

— Фіксуємо на полум'ї.

— Фарбуємо спиртово-водним розчином метиленового синього протягом 4–5 хв.

— Промиваємо водою;

— Висушуємо препарат на повітрі.

Мікропрепарати розглядають під імерсійним об'єктивом

Волютинові включення (зерна) – темно-сині, **цитоплазма бактерій** – блідо-голуба.

Контрольні питання

1. Яку роль виконують і як утворюються цитоплазматичні включення?
2. Перелічіть 4 основні типи включень за біохімічним складом.
3. Із включень полісахаридної природи можна назвати.... перерахуйте сполуки.
4. Із включень ліпідної природи можна назвати..... перерахуйте сполуки.
5. Чому поліфосфатні включення названо волютином і яка їх роль?
6. У чому діагностичне значення включень?
7. Для чого бактерії утворюють спори?
8. Скільки спор може утворити одна бактерія?
9. Спороутворення характерне для паразитичних видів бактерій чи сапрофітних?
10. Що знаходиться в ядрі спори?
11. Назвіть основні шари, з яких складається спора?
12. Яку роль відіграє пептидоглікан як складова оболонки спори?
13. В яких випадках бактерія «запускає» спороутворення? І чи може вона (бактерія) не запускати цього процесу?
14. При яких умовах спора проростає? Коротко опишіть процес проростання спори.
15. Що виходить з пророслої спори? Чи є спороутворення видовою ознакою?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Тема: МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ФАРБУВАННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ.

Навчальна мета

Знати:

- Основні способи виявлення кислотостійких бактерій;

Уміти:

- виготовляти мікроскопічні препарати з метою фарбування кислотостійких бактерій.

Ознайомитися із:

- особливостями хімічного складу кислотостійких бактерій;

Матеріали і реактиви: світловий мікроскоп з звичайним конденсором, агарова культура *Mycobacterium scrofulaceum*, комплект фарб для фарбування за методом Ціля-Нільсена, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні скельця, покривні скельця, імерсійна олія, пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, 96° етиловий спирт, фільтрувальний папір для висушування препаратів, чашки Петрі, гумові рукавички, дезрозчин (3% хлорамін).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Важливою діагностичною ознакою клітин мікобактерій, деяких нокардій, коринебактерій та актиноміцетів є **кислотостійкість** – здатність утримувати барвники *після оброблення їх розчинами кислот, лугів, спиртів*.

Ця здатність зумовлена особливостями хімічного складу клітинної стінки цих бактерій, а саме *наявністю великої кількості ліпідів*, які надають поверхні клітини *гідрофобних властивостей* (деякі бактерії навіть не змочуються водою). Завдяки цьому *бактерії дуже стійкі до дії* розчинених у воді токсичних речовин (*спирти, луги, різні хіміотерапевтичні препарати, секрету організму людини тощо*). Ця властивість бактерій ускладнює виготовлення з них зафарбованих препаратів, оскільки більшість барвників проникає у клітину лише за умови підвищення температури.

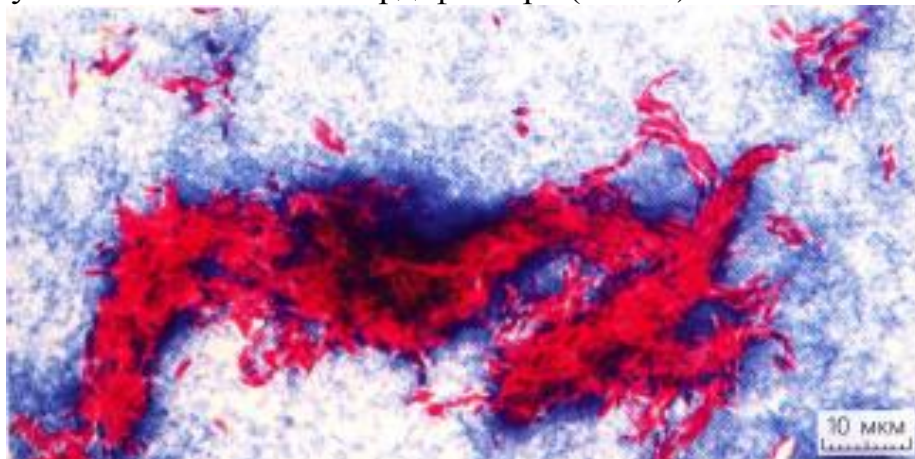
Ліпіди клітинної стінки кислотостійких бактерій представлені головню *міколовими кислотами*, що є розгалуженими жирними β -гидрокси кислотами з великим вуглецевим ланцюгом: *від 28 до 90 атомів карбону*.

У коринеформних бактерій цей показник коливається у межах 28—36, *у нокардій* – 40–60 і *у мікобактерій* 60–90 атомів карбону.

Встановлено: чим більше атомів карбону у міколовій кислоті, тим більшою кислотостійкістю характеризується бактерія.

Міколові кислоти утворюють із вуглеводом трегалозою так званий *корд-фактор* (6,6'-диміколаттрегалоза), з яким пов'язують вірулентність

збудника туберкульозу. У мікроколоніях *Mycobacterium tuberculosis* і у рідких середовищах утворюються структури, які нагадують джгути, – ознака, яка обумовлена наявністю корд-фактора (мал. 1).



Мал. 1. Ріст мікобактерій у вигляді джгутів, що свідчить про наявність корд-фактору. Фарбування за Ціль-Нільсеном

Більшість характеристичних ознак збудника туберкульозу пов'язані з особливостями будови клітинної стінки (рис. 2), що містить багато ліпідів та восків (10–40 %), з яких найважливішими є гліколіпіди (наприклад, ліпоарабінозогалактан), міколова кислота, віск Д та ін.

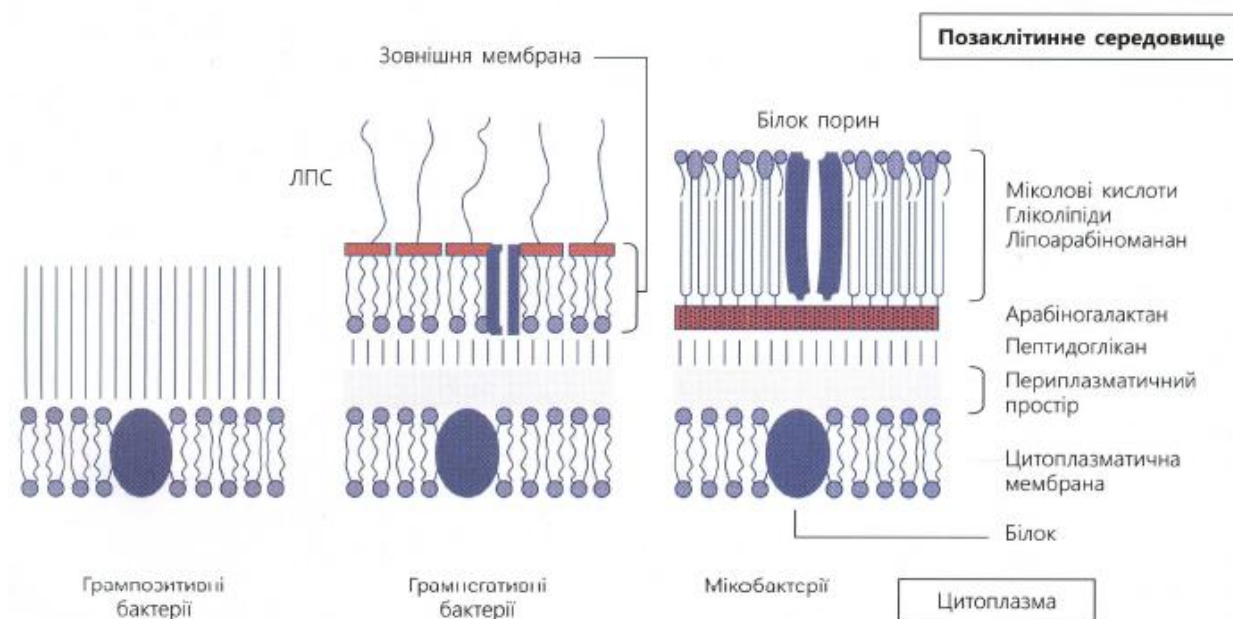


Рис. 2. Особливості структури клітинної стінки мікобактерій (за Williams, 2010).

Кислотостійкість – важлива діагностична ознака бактерій роду *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*. Представники цих родів мають цю властивість, але найбільше вона виражена у представників роду *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* та інші).

Метод виявлення кислотостійкості був розроблений двома німецькими лікарями **Ф. Цілем** і **Ф. Нільсеном** і названий за їхніми прізвищами – **метод Ціля-Нільсена**. Цей метод використовується для диференціації кислотостійких від некислотостійких бактерій, зокрема у разі виявлення

збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) у мокротинні, де часто присутні й інші бактерії.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Фарбування мазків за Ціль-Нільсенем.

Алгоритм «Забарвлення кислотостійких бактерій за методом Ціля-Нільсена»

1. На чистому предметному склі виготовити фіксований препарат зі суміші кислотостійких і некислотостійких бактерій.
2. Накласти на препарат смужку фільтрувального паперу і нанести на неї кілька крапель карболового фуксину Ціля.
3. Нагріти препарат над полум'ям пальника до появи пари, але не до кипіння фарби. Час від часу препарат охолоджувати і додавати фарбу. Ця процедура триває 5 хв. Після цього папір зняти пінцетом, а препарат промити водою.
4. Препарат знебарвити до слабо рожевого кольору, занурюючи його дві-три рази у склянку з 5 % H₂SO₄. Після цього швидко і добре промити водою. (У клінічних дослідженнях у разі виявлення збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* після оброблення препарату кислотою ще здійснюють диференціацію 95° етанолом протягом 2 хв.).
5. Додатково зафарбувати препарат метиленовою синькою (3–5 хв.) для виявлення некислотостійких бактерій.
6. Фарбу змити водою, препарат висушити і розглянути під об'єктивом $\times 100$.

У полі зору мікроскопа видно забарвлені **у червоний колір** клітини кислотостійких і **у синій колір** – клітини некислотостійких бактерій.

Завдання 2. Порівняти кислотостійкість *Mycobacterium scrofulaceum* і *Escherichia coli*, *Pseudomonas floescence* (за вибором).

Контрольні запитання

1. Що таке кислотостійкість бактерій?
2. З чим вона пов'язана кислотостійкість бактерій?
3. Для яких родів бактерій є характерною кислотостійкість?
4. Чи кислотостійкість з'являється у інших видів?
5. Чим проявляється кислотостійкість (до яких речовин вони стають стійкими)?
6. Які особливості побудови клітинної стінки визначають кислотостійкість?
7. Хто розробив метод виявлення кислотостійкості у бактерій?
8. До збудників яких захворювань характерна кислотостійкість?
9. Як побудована клітинна стінка мікобактерій?
10. В чому полягає відмінність будови клітинної стінки мікобактерій та грампозитивних бактерій?
11. В чому полягає відмінність будови клітинної стінки мікобактерій та грамнегативних бактерій?
12. В чому полягає суть фарбування за Ціль-Нільсенем?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

Тема: МЕТАБОЛІЗМ БАКТЕРІЙ. ВИДИ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ. ВИГОТОВЛЕННЯ ПРОСТИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.

Навчальна мета

Знати:

- основні компоненти поживних середовищ для мікроорганізмів,
- основні мінерали та мікроелементи, які необхідні для мікробів, та шляхи їх надходження;
- що таке фактори росту мікроорганізмів.
- класифікацію поживних середовищ,
- вимоги до поживних середовищ

Уміти:

- приготувати м'ясну і печінкову воду;
- приготувати м'ясо-пептонний бульйон (МПБ);
- приготувати м'ясо-пептонний агар (МПА);
- простерилізувати поживне середовище

Ознайомитися із:

- методами приготування основних живильних середовищ;
- методами стерилізації, пастеризації та регенерації живильних середовищ.
- техніками розливу та умовами зберігання поживних середовищ

Матеріали і реактиви: м'ясо яловичина, печінка яловича, м'ясорубка, емальована каstrуля на 3–5 л, марля фільтрувальний папір, електроплитка, автоклав, сухо жарова шафа, МПБ (поживний бульйон), МПА (м'ясо-пептонний агар), колби, спиртівка, сірники, маркер, гумові рукавички.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Для отримання чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх морфологічних і фізіологічних властивостей, а також для визначення кількості мікроорганізмів в об'єктах довкілля (грунті, воді, повітрі), біологічному матеріалі (змиви з поверхні шкіри, слизових оболонок та мигдаликів, вміст шлунка, виділення з організму тощо) їх вирощують на поживних (живильних) середовищах.

Будь-який організм для росту та розвитку повинен отримувати з оточуючого середовища речовини та компоненти, що необхідні йому для синтезу складових клітини й отримання нею енергії. Мікроорганізми не є винятком з цього. Тому у культуральному середовищі, в якому вирощуються мікроорганізми, повинні бути усі поживні речовини в достатній кількості для росту та розмноження мікроорганізмів з урахуванням потреб щодо кожного елемента. В першу чергу це стосується **води**, оскільки вона становить **до 85%**

маси клітини. Також необхідними компонентами поживного середовища для мікроорганізмів є **вуглець, азот, фосфор, сірка**, оскільки на долю цих елементів приходиться до **95% сухої маси** клітин.

Майже усім мікроорганізмам потрібні **кальцій, калій, залізо, магній, хлор, цинк, залізо** та інші елементи, які у рецептах живильних середовищ називають **макроелементами**. Потреба мікроорганізмів в інших хімічних елементах, до яких відносять **мідь, кобальт, нікель, натрій, йод, бор, селен, марганець** та ін. (**мікроелементи**) дуже мала

В залежності від способу життєдіяльності мікроорганізми повинні отримувати **вуглець, азот і сірку** у певній хімічній формі. Так, для **автотрофів** вуглець необхідно давати у вигляді *питтєвої соди* NaHCO_3 , продувати повітря, збагачене CO_2 , для **гетеротрофів** – у вигляді певних органічних сполук.

Азот і сірку – у вигляді амінокислот або продуктів первинного розпаду білків – пептонів, а для окремих груп мікроорганізмів – азот і сірка повинні поставлятися у вигляді неорганічних сполук – молекулярного азоту, нітратів (KNO_3), амонію гідроксиду (NH_4OH), сульфатів ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), сірководню (H_2S) тощо.

Для окремих груп мікроорганізмів необхідні **фактори росту** (органічні сполуки, які використовуються як попередники синтезу інших речовин, компонентів клітини) – амінокислоти, пурини та піримідини, вітаміни.

Оскільки організми поділяються на **аеробні** й **анаеробні**, для перших необхідна присутність у середовищі кисню, а для других, навпаки, необхідно скласти безкисневі умови вирощування.

Нормальним розвиток мікроорганізмів може бути лише за умов, якщо живильне середовище, на якому їх вирощують, містить усі необхідні елементи. До складу живильного середовища мають входити і такі компоненти, що зумовлюють оптимальні окисно-відновні умови, необхідну **реакцію середовища** (рН), осмотичний тиск тощо.

Факторами, що забезпечують розвиток мікроорганізмів на живильному середовищі, є **вологість, температура, аерація**.

Деякі прокаріоти виявляють потребу в одній якій-небудь органічній речовині з групи амінокислот, вітамінів чи азотистих основ, які самі не здатні синтезувати. Такі органічні речовини потрібні у дуже малих кількостях. Тому вони дістали назву **факторів росту**, а організми, які їх потребують, названо **автотрофами**.

Прототрофи – мікроорганізм, які на відміну від ауксотрофів, синтезують самі усі необхідні їм органічні сполуки.

Фактори росту (вітаміни, пурини, піримідини, амінокислоти та ін..) додають до синтетичного середовища у вигляді чистих сполук або у складі дріжджового екстракту, ґрунтової витяжки, сироватки крові, ферментативного гідролізату казеїну, крові, тощо).

Тому одне й те ж живильне середовище може бути відмінним субстратом для одних мікроорганізмів та абсолютно непридатним для

культивування інших.

Таким чином, для виділення та вивчення властивостей мікробів застосовують велику кількість середовищ, різних *за походженням, консистенцією, складом та призначенням*.

Залежно від походження, середовища поділяють на *природні* та *штучні*. Серед останніх виділяють в особливу групу *синтетичні* середовища.

Природними живильними середовищами називаються такі, що являють собою натуральний продукт – молоко, яйця, овочі або природний субстрат – згорнута сироватка крові, жовч тощо.

Штучні живильні середовища готують за певними рецептами з різних настоїв або відварів тваринного чи рослинного походження із додаванням неорганічних солей, вуглеводів та азотистих сполук.

Синтетичні середовища готують із хімічно чистих речовин (солей, вуглеводів, амінокислот, вітамінів та ін.) у певних співвідношеннях.

За *консистенцією* розрізняють середовища *рідкі, напіврідкі* та *щільні* (тверді).

Рідкі живильні середовища складаються з води та розчинених у ній речовин (м'ясна вода, м'ясо-пептонний бульйон, бобово-пептидний бульйон, триптон-соєвий бульйон, середовище Кітта-Тароцці – для виділення збудників анаеробних інфекцій (ботулізму, правцю, газової гангрені), та ін.).

Щільні живильні середовища готують додаванням до рідкого середовища ущільнюючих речовин – агару ($2,5 \pm 0,5\%$) або желатину ($12 \pm 2\%$). До них відносяться м'ясо-пептонний агар (МПА), кров'яний глюкозний м'ясо-пептонний агар (КГМПА), м'ясо-пептонна желатина (МПЖ), середовище Ленштейна-Йенсена, агар Плоскірева та ін.

Напіврідкі середовища містять ті ж самі складники за винятком ущільнюючих речовин, яких додають у наполовину меншій кількості, ніж до складу щільних. Так, коли у щільних поживних середовищах вміст агару становить 2,5 %, то у напіввільних – 1–1,5 %.

За *призначенням* живильні середовища поділяються на звичайні, спеціальні, елективні та диференційно-діагностичні, консервування і транспортування (наприклад гіпертонічний розчин Тіга), збагачення (для нагромадження достатньої для дослідження кількості мікроорганізмів – тіогліколеве середовище), культивування (універсальні, прості та складні, для токсинування тощо).

Звичайні середовища застосовують для вирощування більшості мікроорганізмів (м'ясо-пептонний бульйон та м'ясо-пептонний агар, бобовий агар, та ін). для їх приготування використовують як білкову основу м'ясну воду, бобовий або картопляний відвар, гідролізати казеїну, крові, риби або інших високобілкових субстратів, кухонну сіль у концентрації не вище 0,5%, якийсь вуглевод (сахароза, глюкоза тощо). рН середовища нейтральне або дещо лужне (7,2–7,4).

Спеціальні середовища застосовують для вирощування та

культивування окремих груп мікроорганізмів, наприклад,

- ✓ *середовище Чапека* – для культивування грибів,
- ✓ *середовище Ешбі* – для виділення азотофіксаторів та інші. Вони містять набір мінімально необхідних солей деяких лімітуючих елементів та/чи енергетичний субстрат – якийсь вуглевод (маніт, глюкозу або сахарозу).

Елективні середовища придатні для розвитку одного виду мікробів, пристосованого до певних умов існування, інші організми або зовсім не ростуть на таких середовищах, або їх розвиток сильно затримується. Крім цього вони можуть мати у своєму складі певні речовини, що вибірково пригнічують ріст деяких видів мікроорганізмів, в той же час не впливаючи негативно на ріст і розмноження тест-мікроба.

Різні елективні середовища використовують з метою виділення та певних видів мікроорганізмів, зокрема: *1% лужна пептонна вода* є елективним середовищем для холерних вібріонів.

Диференційно-діагностичні середовища застосовують для ідентифікації певних видів мікробів *за їх біохімічними властивостями*, що чітко виявляються за умови їх вирощування на таких середовищах. Вони дозволяють виявляти ензими, що виділяють мікроби, одні з яких розщеплюють по-різному білки й вуглеводи, а інші здійснюють реакції окислення та відновлення, що проявляється відповідною зміною кольору середовища навколо колоній культур.

До складу цих середовищ крім поживних речовин входять *певні цукри*, які розщеплюють своїми ферментами тест-мікроби, утворюючи при цьому кислоти, що змінюють рН середовища, та *індикатори*, які реагують на зміну рН середовища зміною кольору навколо колоній. До таких відносять:

- ✓ середовище Ендо, середовище Клігера – для виділення та ідентифікації кишкової палички,
- ✓ селенітовий бульйон, ксилозо-лізин-дезоксихолатне середовище (КЛД), вісмут-сульфітний агар, середовище Раппапорта-Василіадіса, Плоскірева – для виділення та ідентифікації сальмонел,
- ✓ глюкозо-гліцериновий печінково-м'ясний бульйон та Оксфорд-агар, Палкам-агар – для виділення та ідентифікації лістерій,
- ✓ середовище Левенштейна-Йенсена – для виділення туберкульозної палички.
- ✓ напіврідкі середовища *Гісса з моноуглеводами* – для вивчення цукролітичних властивостей мікроорганізмів.

Середовища збагачення – середовища, в яких відбувається розмноження та накопичення бактерій-збудників, які належать до певного роду чи виду, тобто збагачення ними досліджуваного матеріалу, зокрема:

- ✓ селенітовий бульйон – для виділення сальмонел,
- ✓ 10% жовчний МПБ – для збудника черевного тифу;
- ✓ молочно-сольовий агар – для виділення стафілококів та ін.

Транспортні (консервуючі) середовища для забезпечення вживання бактерій під час транспортування біоматеріалу у бактеріологічну

лабораторію, зокрема:

- ✓ середовище Стюарта – для нейсерій,
- ✓ сахарозо-2-фосфатний глютаміновий бульйон – для хламідій та ін..

Зберігання живильних середовищ.

1. Сухі живильні середовища зберігають у закритих шафах, які встановлені у сухих приміщеннях за кімнатної температури.
2. Готові рідкі і щільні живильні середовища зберігають у холодильниках, але не в морозильниках.
3. Тривалість зберігання середовищ є різною в залежності від:
 - ✓ Терміну, що обумовлений виробником середовища;
 - ✓ Умовами зберігання;
 - ✓ Станом середовища в процесі терміну його зберігання (відсутність пересихання, росту плісневих грибів, інших видів псування середовища).

Вимоги до живильних середовищ:

1. Мають містити необхідні для мікроорганізмів поживні речовини.
2. Мати реакцію рН оптимальну для вирощування даного виду мікроорганізмів.
3. Мати достатню вологість (достатню кількість), оскільки мікроби живляться за законами осмосу та дифузії.
4. Бути ізотонічними, тобто мати таку концентрацію солей і живильних речовин, яка створювала б оптимальний осмотичний тиск.
5. Бути стерильними, забезпечуючи тим самим можливість вирощувати чисті культури мікроорганізмів.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Ознайомлення з формою випуску, умовами зберігання сухих поживних середовищ. Сухі поживні середовища випускаються у флаконах із темного скла, пластика або у непрозорих пакетах, зроблених із щільного паперу, алюмінієвої фольги (середовища світлочутливі). Посуд, у якому випускають ці середовища, щільно закривають, пробки додатково заливають парафіном, пакети запаюють (середовища гігроскопічні). На флаконах і пакетах обов'язково має бути етикетка, на якій зазначено: назву середовища, призначення, склад, спосіб приготування, термін і умови зберігання, серію. Готують поживні середовища згідно з інструкцією, зазначеною на етикетці.

Завдання 2. Виготовлення м'ясної води із яловичини. З цією метою свіжу телятину або яловичину звільняють від жиру, сухожилків, фасцій і пропускають через м'ясорубку. До 0,5 кг фаршу додають 1 л колодязної води, розмішують і настоюють протягом 2 год. за температури 37–39°C. Одержаний настій проціджують через марлю і кип'ятять 20 хв. до зсідання білків. Потім його фільтрують через паперовий фільтр і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв. при температурі 121°C (1 атм.).

Завдання 3. Виготовлення печінкової води. З цією метою свіжо відібрану печінку від забитої клінічно здорової молоді (до 1 року) великої рогатої худоби звільняють від товстих судин, нарізають великими шматками

розміром 15×10×5 см, промивають водопровідною водою, зважують, кладуть в емальовану каструлю, заливають подвійною кількістю водопровідної води і кип'ятять на легкому вогні протягом 1 години. Проціджують через 4–6 шарів стерильної марлі, потім фільтрують і розфасовують у конічні колби. Стерилізують в автоклаві протягом 30 хв. при температурі 121°C. Печінкову воду зберігають при 0–4 °С.

Шматки відвареної печінки складаємо у стерильні стакани закриваємо двома шарами пергаментного паперу і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв. при температурі 121°C. Приготовані таким чином шматки печінки використовують для виготовлення середовища Кітта-Тароці.

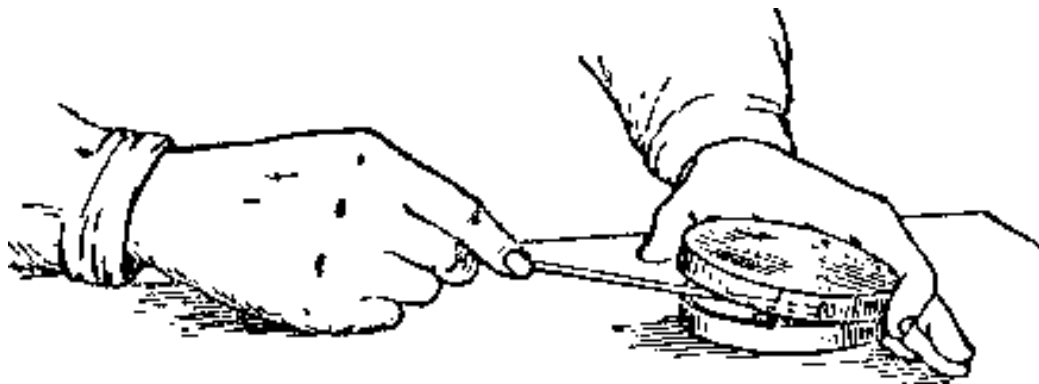
Завдання 4. Виготовлення МПБ та МПА із м'ясної води та інших інгредієнтів. До 1 л м'ясної води додають 5 г кухонної солі, 10 г пептону і кип'ятять до повного розчинення пептону. Вимірюють рН і з допомогою насиченого розчину бікарбонату натрію доводять рН до 7,6 (слабо лужна реакція) і знову кип'ятять протягом 20 хв. Потім доливають водою до початкового об'єму і фільтрують, розливають в колби і пробірки та стерилізують протягом 20 хв. в автоклаві при 121°C. Готовий бульйон є прозорий і має янтарно-жовтий колір.

Завдання 5. Виготовлення кров'яного м'ясо-пептонного агару. До розплавленого і охолодженого до 45–50°C м'ясо-пептонного агару додають 5–10 % дефібринованої крові барана, старанно змішують круговими рухами в розливають у чашки Петрі по 15±2 мл. Зберігають у холодильнику протягом тижня.

Завдання 6. Виготовлення середовища Кітта-Тароці. У м'ясній воді відварюють до готовності печінку великої рогатої худоби, взяту від молодої здорової не обробленої антибактеріальними препаратами введеної тварини; співвідношення печінки до м'ясної води 1:2. Отриману м'ясо-печінкову воду використовують після фільтрування.

Тоді печінку виймають, підсушують чистим фільтрувальним папером і нарізають кусочками довжиною 4±1 см і товщиною 0,5×0,5 см; кусочки печінки вставляють у стерильні бактеріологічні пробірки, заливають профільтрованою м'ясо-печінковою водою (9 мл у пробірку), а зверху нашаровують стерильну вазелінову олію. Стерилізують протягом 20 хв. при 121°C. Зберігають в холодильнику.

Завдання 7. Розливання поживних середовищ. Для проведення лабораторних занять у навчальних лабораторіях поживні середовища виготовляють, як правило, про запас і зберігають у великих колбах. Перед або на початку заняття середовища розливають у пробірки або чашки Петрі (залежно від мети занять). Тверді поживні середовища перед розливанням



необхідно розплавити в автоклаві з відкритим вентиляем, на водяній бані або у мікрохвильовій печі.

Після розплавлення твердих (щільних) поживних середовищ їх розливають у чашки Петрі, пробірки або інший посуд (залежно від мети роботи), дотримуючись умов стерильності.

Для цього на полум'ї спиртівки або газового пальника обпалюють горла колб, пробірок, корки тощо.

Посуд із середовищем піддають стерилізації за одним із методів, які наводяться далі.

Завдання 8. Визначення рН живильних середовищ або інших рідин, що використовуються в роботі, проводять такими методами:

1. **З допомогою рН-метра** – спеціального приладу, який визначає точно рН з допомогою електродів.
2. **Колориметричним методом** з допомогою індикаторів та компаратора – пристрою, для порівняння кольорів контрольних і досліджуваних розчинів.
3. **З допомогою універсальних індикаторних смужок.**

Рецепти поживних середовищ та спосіб їх приготування.

М'ясо-пептонний бульйон. Для виготовлення найуживаніших поживних середовищ – м'ясо-пептонного бульйону (МПБ), м'ясо-пептонного агару (МПА), м'ясо-пептонного желатину (МПЖ) та інших – насамперед треба приготувати *м'ясну воду*, оскільки вона є основою всіх цих середовищ.

М'ясо-пептонний агар виготовляють із м'ясо-пептонного бульйону, додаючи 2–2,5% агару. Суміш, постійно помішуючи, щоб не пригоріло, кип'ятять до повного розчинення агару. Потім гарячий розчин фільтрують через ватно-марлевий фільтр і **стерилізують** у колбах або пробірках, закритих ватними корками, **протягом 20 хв. за 121°С.**

Бобовий агар. 100 г білої квасолі або бобів заливають 1 л водопровідної води і обережно кип'ятять, уникаючи розтріскування бобів і перетворення крохмалю на клейстер. Гарячий відвар фільтрують і додають 2 % агару. Агар розплавляють в автоклаві, осаджують колоїдні частинки. Одержане середовище фільтрують і стерилізують так само, як і при виготовленні інших агарових середовищ.

Картопляне поживне середовище. З неушкоджених бульб картоплі вирізають плоскі шматочки, поверхню яких натирають крейдою для нейтралізації кислої реакції клітинного соку, і розкладають їх у чашки Петрі на зволожений фільтрувальний папір. У разі застосування пробірок краще вирізувати із бульб циліндричні шматочки за допомогою коркового свердла. Чашки і пробірки з картопляним середовищем стерилізують в автоклаві протягом 10 хв. при тискові 0,5 атм. На цьому середовищі добре вирощуються картопляна паличка та інші гетеротрофні мікроорганізми.

Поживне середовище із молока. Збиране молоко розливають у пробірки приблизно по 10 см³, закривають ватними тампонами і стерилізують текучим паром методом тиндалізації. В молочному середовищі містяться всі поживні речовини, необхідні для гетеротрофних мікроорганізмів.

Контроль якості стерилізації живильних середовищ проводять за допомогою **трьох видів тестів:**

- **фізичного** (з допомогою термометра),
- **хімічного** (з допомогою ампул із запаяними в них хімічними сполуками, що мають різну температуру плавлення – від 96 до 125 °С) та
- **біологічного** (шляхом висіву автоклавованих культур на свіжі живильні середовища з наступною їх інкубацією за оптимальної температури).

Контрольні питання:

1. Які потреби мікробів у поживних речовинах?
2. Які сполуки можуть бути джерелом вуглецю для мікроорганізмів?
3. Які сполуки можуть бути джерелом нітрогену для мікроорганізмів?
4. Фактори росту? Які сполуки можуть виступати як фактори росту?
5. Розкажіть хід приготування м'ясної води.
6. Розкажіть хід приготування МПБ.
7. Методи стерилізації поживних середовищ.
8. Методи контролю якості стерилізації живильних середовищ.
9. Дайте визначення терміну «поживне середовище».
10. Як поділяються живильні середовища за призначенням?
11. Як поділяються живильні середовища за консистенцією?
12. Як поділяються живильні середовища за походженням?
13. Що таке спеціальні живильні середовища?
14. Що таке селективні живильні середовища?
15. Що таке диференційно-діагностичні живильні середовища?
16. Принципи зберігання поживних середовищ.
17. Методи контролю рН середовищ.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

Тема: ПРАВИЛА РОБОТИ З ЧИСТИМИ КУЛЬТУРАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ. ТЕХНІКА ПОСІВУ НА ТВЕРДІ І РІДКІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА.

Навчальна мета

Знати:

- способи висіву біологічних матеріалів на живильні середовища (ЖС) з метою виділення чистих культур мікроорганізмів;
- умови та принципи культивування мікробів;
- характеристики росту мікробів на рідких і твердих живильних середовища

Уміти:

- зробити посів матеріалу на ЖС пастерівською піпеткою;
- зробити посів матеріалу на ЖС бактеріологічною петлею;
- зробити пересів із рідкого ЖС на рідке ЖС;
- зробити пересів із рідкого ЖС на щільне ЖС;
- зробити пересів із щільного ЖС на рідке ЖС

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, шпателі, груші для посівів, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, культури кишкової палички на МПБ і МПА (в пробірках, в чашках і розплавлений та охолоджений до 50 в колбах по 100 мл), пів рідкий МПА або тіогліколеве середовище, водяна баня, термостат, холодильник, МПБ у пробірках, МПА у пробірках і чашках Петрі, дезінфекційний розчин (3 % розчин хлораміну) у високих стаканах.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Бактеріологічний метод дослідження є найважливішим у практичній діяльності будь-якої мікробіологічної лабораторії. Від правильного його виконання залежить визначення етіологічного чинника, що викликав захворювання, і, відповідно, вибір тактики лікування інфекційного хворого. Важливість цього методу пояснюється тим, що в багатьох випадках лікарі мають справу з мікробними асоціаціями; тоді необхідно встановлювати роль кожного з цих мікробів у виникненні хвороби.

Тому перед освоєнням основних принципів і методів виділення чистих культур необхідно оволодіти технікою посівів і пересівів бактерій в рідкі й на щільні поживні середовища.

Тому, ця лабораторна робота, в першу чергу, стосується вивчення *фізіології мікроорганізмів* – науки, яка вивчає процеси життєдіяльності мікроорганізмів, зокрема їх живлення, дихання, розмноження та інші фізіологічні властивості, вплив факторів довкілля на них.

Вивчення фізіології мікробів дає можливість:

- керувати їх життєдіяльністю,
- ефективно використовувати їх у різних галузях, а також

- розробляти засоби та заходи боротьби з тими мікробами, які приносять шкоду.

Принципи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів

Умови, необхідні для культивування мікроорганізмів у мікробіологічній лабораторії, забезпечуються в *термостаті*.

Ознайомлення з будовою термостату.

Термостат призначений для підтримання у внутрішній частині робочої камери стабільної температури, необхідної для проведення бактеріологічних і серологічних досліджень.

Основними частинами термостату є: корпус, металеві дверцята, прозорі дверцята, робоча камера, блок управління. Корпус виготовлений із тонколистового металу. В середині корпусу встановлена робоча камера, в нижній частині якої закріплені два нагрівальних елементи. Простір між корпусом і камерою заповнений теплоізоляційними прокладками, зробленими з гофрованого картону. Корпус закривається металевими дверцятами.

Металеві дверцята зроблені у вигляді двохстінної коробки з тонколистового металу. Простір між двома стінками заповнений ізоляційними прокладками. По периметру дверцят укріплена гумова магнітна прокладка для ущільнення між дверцятами і корпусом термостата.

На дверцятах і корпусі є два гвинти з отворами для проволочки, на яку вішають пломбу.

Прозорі дверцята дають змогу спостерігати за процесом у робочій камері, не відкриваючи їх і не порушуючи температурний режим.

Прозорі дверцята по периметру обклеєні прокладкою з гуми для ущільнення між дверцятами і робочою камерою.

Робоча камера має прямокутну форму, її стінки виготовлені з латуні. У верхній частині камери встановлено датчик температури. Для усунення місцевого перегрівання бічні стінки і дно камери обклеєні азбестовим папером. Температурний режим у робочій камері контролюється термометром, який встановлюється через отвір, що розміщений у блоці керування. В середині камери встановлено металеві полички з отворами для полегшення циркуляції повітря.

Блок керування призначений для автоматичного регулювання та підтримання температури в робочій камері. На панелі блоку керування встановлено тумблер, запобіжники, кнопковий вмикач, сигнальну лампу включення в електромережу і одночасно для підсвічування шкали термометра; сигнальну лампу включення нагрівальних елементів термостата, ручки резисторів для встановлення температурного режиму.

Увага! Чашки Петрі розміщують на поличках і дні робочої камери глибоко оптимально не більше ніж по 3 штук, нещільно, що забезпечує циркуляцію повітря і рівномірне нагрівання всіх чашок. Чашки обов'язково ставлять догори дном. Це забезпечує добру аерацію чашок і запобігає потраплянню конденсаційної води з кришки чашки на посів, яка

перешкоджає утворенню ізольованих колоній.

Для успішного культивування мікроорганізмів у лабораторних чи промислових умовах потрібно:

- правильно підібрати поживні середовища,
- старанно виконати посів і
- створити належні умови для культивування, зокрема:
 - ✓ оптимальну температуру,
 - ✓ відсутність світла,
 - ✓ вологість,
 - ✓ аерацію або
 - ✓ відсутність повітря (за умови культивування анаеробів),
 - ✓ витримати певний термін культивування.

Оптимальну температуру створюють у термостаті. Більшість патогенних мікробів є мезофіли, а тому ростуть за температури 37 °С.

Для більшості мікроорганізмів, у тому числі і патогенних, світло не потрібне, тому їх культивують у темряві (термостат має непрозорі стінки).

Вологість – неодмінна умова розвитку мікроорганізмів, тому їх краще висівати на свіжо виготовлені середовища.

Аерація необхідна для культивування облигатних аеробів і факультативних анаеробів. У пробірки кисень разом із повітрям проникає через ватно-марлеві пробки, у чашки Петрі – через щілину між кришкою і дном чашки.

Облігатні анаероби культивують в умовах повної відсутності кисню в поживних середовищах і навколишньому просторі. Для цього використовують **різні методи для видалення кисню із середовища** і запобігання насиченню середовища киснем.

В умовах лабораторії рідкі поживні середовища **регенерують** – кип'ятять для видалення кисню, різко охолоджують, засівають і заливають на висоту 1 см стерильним вазеліновим маслом або роблять посів уколom у високий стовпчик агару, інколи агаром з посівом заповнюють трубки і запаюють їх на кінцях.

Анаеробні умови можна створити **в анаеростаті**, де культивують мікроби у вакуумі або атмосфері іншого газу (азоту, пропану тощо), а також в ексикаторі. З повітря, що міститься в ексикаторі, кисень поглинають хімічні речовини або запалена свічка.

Примітка: Техніку виділення анаеробних мікроорганізмів будемо вивчати на лабораторних роботах з вивчення збудників газової гангрені, ботулізму та правцю.

Деякі мікроорганізми краще культивуються **в атмосфері, що містить 5–10 % вуглекислого газу**. Це **капнофільні** мікроорганізми (бруцели, менінгококи).

Примітка: Техніку виділення капнофільних мікроорганізмів будемо вивчати на лабораторних роботах з вивчення збудників бруцельозу.

Термін культивування для різних мікробів різний. Більшість патогенних мікробів культивують протягом 18–24 год., але деякі ростуть повільніше: бордетели – 3–4 доби, спірохети – 7–12 днів, мікобактерії туберкульозу – до 3 міс.

Поряд із вивченням:

морфологічних ознак (форма, розміри, наявність поверхневих структур і внутріклітинних включень) і

тинкторіальних властивостей (здатність сприймати ті чи інші фарби) для дослідження *фізіологічних (біохімічних) властивостей* (здатність розщеплювати цукри, засвоювати білкові сполуки, виробляти токсини чи інші біологічні речовини) мікроорганізмів,

їх культивують (виращують) у лабораторних умовах на живильних середовищах.

Під час виконання лабораторних робіт, якими передбачено роботу із культурами мікробів, необхідно дотримуватися певних ПРАВИЛ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ З ЖИВИМИ КУЛЬТУРАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ, а саме:

1. не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
2. відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
3. під час виготовлення препарату ватно-марлевий корок необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати корок між ними;
4. відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати над полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором вверху;
5. під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
6. скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника;
7. залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
8. після закінчення роботи ватною, змоченою 70° етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

Засвоєння техніки посіву та пересіву з метою виділення та отримання чистих культур є:

- **запорукою успішної роботи мікробіолога**, а дотримання техніки безпеки при роботі із чистими культурами гарантує :
- **особисту безпеку** від ймовірного інфікування та
- **недопущення розсіювання** потенційних збудників інфекції у навколишнє середовище.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Техніка посіву на тверді і рідкі живильні середовища.

1.1. Посів матеріалу на ЖС пастерівською піпеткою. Твердий біологічний матеріал (тканини, органи тощо) припікають розігрітим на полум'ї металічним шпателем. Тоді з допомогою стерильної пастерівської піпетки із відламаним кінцем в місці припікання роблять прокол і набирають в пастерівську піпетку матеріал і вносять його у рідке ЖС (МПБ). Пастерівська піпетка повинна мати гнучкий шланг із гумовою грушею.

1.2. Посів матеріалу на ЖС бактеріологічною петлею, зазвичай проводять, коли приходить ся проводити посів із рідкого біоматеріалу (кров, сеча, інші біологічні рідини, культури мікробів). Для цього бактеріологічну петлю, попередньо профламбувавши над полум'ям пальника, вводимо у горловину посудини із біоматеріалом, охолоджуємо, і після цього торкаємося матеріалу, набираємо і обережно переносимо у ЖС, на яке проводимо посів.

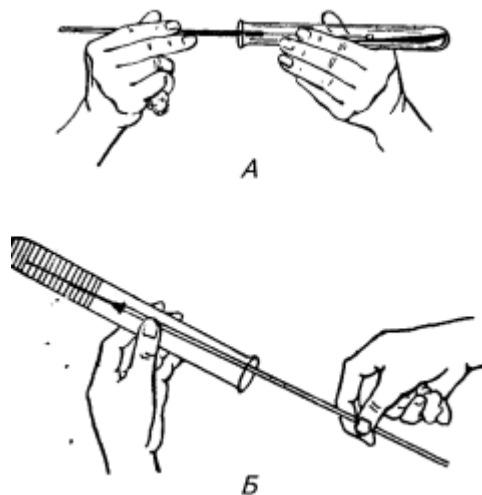
1.3. Пересів із рідкого ЖС на рідке ЖС можна проводити з допомогою як пастерівської піпетки, такі бактеріологічної петлі. Вибір засобу для пересіву залежить від мети пересіву та об'єму середовища, з якого або на яке проводиться пересів. Зазвичай пересів *із рідкої культури у пробірці* на ЖС *у пробірці* проводять з *допомогою петлі*, а пересиви на ЖСМ *у флаконах* – з допомогою пастерівської піпетки або мірної піпетки чи шприца.

1.4. Пересів із рідкого ЖС на щільне ЖС (в пробірці або чашці) зазвичай проводять з допомогою бактеріологічної петлі. Для цього після фламбування петлі відкривають мізинцем правої руки корок із пробірик із культурою на рідкому ЖС, обережно набираємо культуру із поверхні культури (якщо ж плівка) чи з дна пробірки (якщо потрібно зробити висів із осаду) і обережно, не торкаючись петлею стінки пробірки, переносимо культуру у поверхню щільного у пробірці чи у чашці з подальшим її втирання у вигляді зигзагу (на поверхні «косячка») або у вигляді паралельних смуг (на поверхні ЖС у чашці).

1.5. Пересів із щільного ЖС (культура на ЖС в чашці Петрі або на скошеному ЖС у пробірці) **на рідке ЖС** (у пробірці) проводять лише з допомогою бактеріологічної петлі.

1.6. Глибинний посів. Перед посівом вміст досліджуваної суспензії (матеріалу) ретельно перемішують. Потім стерильною піпеткою набирають 1 мл суспензії і перенести на дно стерильної чашки Петрі і заливають 20 мл розплавленого та охолодженого до 45°C МПА. Обережними круговими рухами перемішують вміст чашки. Після застигання агару чашку поміщають вверх дном у термостат на 24–48 год..

1.7. Поверхневий посів. Досліджувану суспензію (матеріал) ретельно перемішують, стерильною піпеткою набирають 0,2 см³ і наносять на поверхню твердого живильного середовища (МПА) у чашці Петрі; стерильними шпателем суспензію рівномірно втирають в поверхню агару. Чашки з посівами поміщають вверх дном у термостат на 24–48 год..



Мал. 2. Методи посіву мікроорганізмів: А – на скошений МПА в пробірках;
Б – уколом в стовпчик МПА.

Всі студенти повинні вміти працювати у латексових рукавицях, проводити пересіви і при цьому правильно тримати грушу із пастерівською піпеткою, правильно зафламбувати бактеріологічну петлю, вміти відкривати і закривати пробірки над полум'ям спиртівки, дезінфікувати відпрацьовані петлі та піпетки!

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Провести пересів культури кишкової палички із МПБ (в пробірці) на МПБ (в пробірці і в колбі).

Завдання 2. Провести пересів культури кишкової палички із МПБ (в пробірці) на МПА (в чашках);

Завдання 3. Провести пересів культури кишкової палички із МПА (в чашці) на МПА (в чашках)

а) поверхневим і

б) глибинним способами.

Всі три завдання повинен виконати кожний студент!

Контрольні питання:

1. Що вивчає наука про фізіологію мікроорганізмів?
2. Що дає вивчення фізіології мікробів?
3. Для чого призначений термостат? Опишіть коротко будову термостату.
4. Правила розташування чашок із посівами у термостаті.
5. Назвіть основні умови успішного культивування мікроорганізмів у лабораторних чи промислових умовах.
6. Які мікроби називають облигатними анаеробними, а які капнофільними?
7. Назвіть основні правил з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів.

8. Що дає засвоєння техніки посіву та пересіву з метою виділення та отримання чистих культур?
9. Як провести посів з допомогою пастерівської піпетки?
10. Як провести посів із допомогою бактеріологічної петлі?
11. Як провести посів матеріалу на ЖС пастерівською піпеткою?
12. Як провести посів матеріалу на ЖС бактеріологічною петлею?
13. Як провести пересів із рідкого ЖС на рідке ЖС?
14. Як провести пересів із рідкого ЖС на щільне ЖС?
15. Як провести пересів із щільного ЖС на рідке ЖС?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

Тема: ПРИНЦИПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Навчальна мета

Знати:

- способи виділення чистих культур мікроорганізмів;
- способи біохімічної ідентифікації чистих культур мікроорганізмів.

Уміти:

- охарактеризувати ріст мікробів на рідких живильних середовищах (ЖС);
- описати колонії мікроорганізмів на твердих ЖС;
- провести оцінку біохімічної активності чистих культур мікроорганізмів на диференційно-діагностичних середовищах (кольоровому ряді).

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, шпатели, груші для посівів, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, чисті культури антракоїдів, стафілококів та кишкової палички на МПБ і МПА, МПБ і МПА (в пробірках, в чашках і розплавлений та охолоджений до 50 в колбах по 100 мл), культури антракоїдів, стафілококів та кишкової палички на кольоровому ряді, Кольоровий ряд середовищ для біохімічної ідентифікації чистих культур мікроорганізмів, водяна баня, термостат, скальпель, холодильник, МПБ у пробірках, МПА у пробірках і чашках Петрі, дезінфекційний розчин (3 % розчин хлораміну) у високих стаканах.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

В організмі людей, тварин, у навколишньому середовищі патогенні мікроорганізми змішані з умовно-патогенними та сапрофітами, тому виділення чистої культури мікроорганізмів є обов'язковим етапом бактеріологічного (культурального) дослідження. Це дає змогу ідентифікувати її за певними властивостями.

Принципи виділення чистих культур мікроорганізмів.

Розрізняють два види методів виділення чистих культур:

1. Методи, основані на механічному принципі;
2. Методи, основані на біологічному принципі;

До методів, заснованих на механічному принципі, відносять:

1. **Метод послідовних розведень**, запропонований **Л. Пастером**, був одним із найперших, який застосовувався для механічного роз'єднання мікроорганізмів. Він полягає в проведенні послідовних серійних розведень матеріалу, який містить мікроби, в стерильному **рідкому** поживному середовищі. Цей прийом достатньо кропіткий і недосконалий у роботі, оскільки не дозволяє контролювати кількість мікробних клітин, які потрапляють у пробірки при розведеннях.

2. **Метод Коха (метод пластинчастих розведень)**. **Р. Кох** використовував щільні поживні середовища на основі желатину або агару. Матеріал з асоціаціями різних видів бактерій розводився у кількох пробірках з розтопленим і дещо охолодженим желатином, вміст яких пізніше виливався на стерильні скляні пластини. Після застигання середовища воно культивувалось при оптимальній температурі, а в його товщі утворювались ізольовані колонії мікроорганізмів, які легко могли бути перенесені на свіже поживне середовище за допомогою платинової петлі для одержання чистої культури бактерій.

3. **Метод Дригальського** є більш досконалим методом, який широко розповсюджений у повсякденній мікробіологічній практиці. Спочатку на поверхню середовища в чашці Петрі піпеткою або петлею наносять досліджуваний матеріал. За допомогою металевого або скляного шпателя його ретельно втирають у середовище. Чашку під час посіву тримають привідкритою і обережно обертають, щоб рівномірно розподілити матеріал. Не стерилізуючи шпателя, проводять ним посів матеріалу в іншій чашці Петрі, при потребі - в третій. Тільки після цього шпатель занурюють у дезінфікуючий розчин або прожарюють у полум'ї пальника. На поверхні середовища в першій чашці спостерігаємо, як правило, суцільний ріст бактерій, у другій - густий ріст, а в третій - ріст у вигляді ізольованих колоній.

4. **Метод штрихових посівів** сьогодні використовується в мікробіологічних лабораторіях найчастіше. Матеріал, який містить мікроорганізми, набирають бактеріологічною петлею і наносять на поверхню поживного середовища біля краю чашки. Знімають надлишок матеріалу і проводять посів його паралельними штрихами від краю до краю чашки. Через добу інкубації посівів при оптимальній температурі на поверхні чашки виростають ізольовані колонії мікробів.

До методів, заснованих **на біологічному принципі**, відносять:

1. **За спороутворенням**. Відомо, що деякі мікроби (бацили і клостридії) здатні до спороутворення. Серед них *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*. Спори стійкі до дії факторів зовнішнього середовища. Отже, досліджуваний матеріал може бути підданий дії термічного фактора, а потім інокулятивно перенесений на

поживне середовище. Через деякий час у ньому виростуть саме ті бактерії, які здатні до спороутворення.

2. **За типом дихання.** Всі мікроорганізми за типом дихання поділяються на дві основні групи: **аеробні** (*Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* тощо) та **анаеробні** (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* та ін.). Якщо матеріал, з якого слід виділити спороутворюючі анаеробні збудники, попередньо прогріти, а потім культивувати в анаеробних умовах, то виростуть саме ці бактерії.

3. **Стійкість мікробів до дії кислот і лугів.** Деякі мікроби (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*) внаслідок особливостей їх хімічної будови стійкі до дії кислот. Ось чому матеріал, який їх містить, наприклад, харкотиння при туберкульозі, попередньо обробляють рівним об'ємом 10 % розчину сірчаної кислоти, а потім висівають на поживні середовища. Стороння флора гине, а мікобактерії, внаслідок їх резистентності до кислот, виростають.

4. **Рухомість бактерій.** Деякі мікроби (*Proteus vulgaris*) мають тенденцію до повзучого росту і здатні швидко розповсюджуватись по поверхні дещо вологого середовища. Для виділення таких збудників їх засівають у краплинку конденсаційної рідини, яка утворюється при охолодженні стовпчика скошеного агару. Через 16–18 год. вони розповсюджуються на всю поверхню середовища. Якщо взяти матеріал з верхньої частини агару, будемо мати чисту культуру збудників.

5. **Чутливість мікробів до дії хімічних речовин, антибіотиків та інших протимікробних засобів.**

Внаслідок особливостей метаболізму бактерій вони можуть мати різну чутливість до деяких хімічних чинників. Відомо, що стафілококи, аеробні бацили, які утворюють спори, стійкі до дії 7,5–10 % хлориду натрію. Ось чому для виділення цих збудників використовують елективні поживні середовища (жовтково-сольовий агар, маніт-сольовий агар), які містять саме цю речовину. Інші бактерії при такій концентрації хлориду натрію практично не ростуть.

6. **Здатність мікроорганізмів проникати через неушкоджені шкірні покриви.** Деякі патогенні бактерії (*Yersinia pestis*) внаслідок наявності великої кількості ферментів агресії здатні проникати через непошкоджену шкіру. Для цього шерсть на тілі лабораторної тварини голять і в цю ділянку втирають досліджуваний матеріал, який містить збудника і велику кількість сторонньої мікрофлори. За деякий час тварину забивають, а з крові або внутрішніх органів виділяють мікроби.

7. **Чутливість лабораторних тварин до збудників інфекційних захворювань.** Окремі тварини проявляють високу чутливість до різних мікроорганізмів. Наприклад, при будь-якому способі введення *Streptococcus pneumoniae* білим мишам у них розвивається генералізована пневмококова інфекція. Аналогічна картина спостерігається при зараженні гвінейських свинок збудниками туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*), а у кроликів -

при зараженні *Mycobacterium bovis*.

У повсякденній практиці бактеріологи користуються такими поняттями, як **штам** і **чиста культура** мікроорганізмів.

Під **штамом** розуміють мікроби одного виду, які виділено з різних джерел, або з одного й того ж самого джерела, але в різний час.

Чиста культура бактерій - це мікроорганізми одного виду, нащадки однієї мікробної клітини, які виростили на (в) поживному середовищі.

На щільних поживних середовищах мікроорганізми утворюють колонії.

Колонія – це видиме скупчення мікроорганізмів, які виростили з однієї клітини, тому чисту культуру виділяють шляхом посіву матеріалу з однієї ізольованої колонії.

Виділення чистої культури та її ідентифікацію проводять у декілька етапів:

1-й етап – посів біологічного матеріалу на поживні середовища з метою отримання ізольованих колоній (вибір методу культивування, склад поживного середовища залежить від типу живлення і дихання мікроорганізмів);

2-й етап – визначення характеру росту мікроорганізмів на поживних середовищах (культуральних властивостей), відбір характерних колоній;

3-й етап – визначення морфології і тинкторіальних властивостей мікроорганізмів;

4-й етап – пересівання підозрілих колоній з метою виділення чистої культури мікробів;

5-й етап – перевірка чистоти виділеної культури;

6-й етап – визначення ферментативних властивостей мікроорганізмів;

7-й етап – визначення точних маркерів мікроорганізмів:

- антигенної структури,
- фагочутливості,
- коліциногенності,
- антибіотикограми тощо.

Характер росту мікроорганізмів на поживному середовищі визначає їх культуральні властивості. Ці властивості **постійні для кожного виду** мікроорганізмів, тому є важливою ознакою під час їх ідентифікації.

У рідких поживних середовищах мікроорганізми можуть утворювати помутніння (*каламуть*), *осад*, *плівку*, *пристінковий ріст*.

На щільних поживних середовищах вивчають колонії неозброєним оком, через лупу або під мікроскопом, результати відмічають у робочому журналі.

Характеризують колонії за розміром, формою, контуром краю, прозорістю, рельєфом, характером поверхні, кольором, структурою, консистенцією.

За розміром колонії бувають: *точкові* (діаметр менший ніж 1 мм), *дрібні* (діаметр 1–2 мм), *середнього розміру* (діаметр 2–4 мм), *великі* (діаметр 4–6 мм і більше).

Форма колоній буває: *правильна* – кругла, *неправильна* – амебоподібна, *ризоїдна* (нагадує переплетене коріння дерева).

Контур краю визначають неозброєним оком або під мікроскопом. Він може бути *рівний* і *нерівний*. Нерівний край буває: *фестончастий* – утворює великі заокруглені зубці правильної форми; *хвилястий* – великі заокруглені зубці виражені нечітко; *зазубрений* – зубці гострі, різної величини і форми; *бахромчастий* – має ніжні ворсинки; *розпливчастий* – важко відрізнити межу між колонією і поживним середовищем.

За прозорістю колонії бувають: *прозорі*, *напівпрозорі*, *непрозорі*, *прозорі* або *напівпрозорі* з *непрозорим центром*.

Рельєф колоній вивчають неозброєним оком або через лупу, *розглядаючи колонію згори і збоку*. За рельєфом колонії бувають: *капелоподібні* і *куполоподібні* – мають правильну округлу форму у вигляді сегмента кулі, можуть бути *слабовипуклі* і *випуклі*; *плосковипуклі* – випуклі з плоскою верхівкою, у вертикальному розрізі нагадують трапецію; *конусоподібні* – у вертикальному розрізі нагадують трикутник; *плоскі* або *випуклі* з центром у вигляді сосочка; *випуклі* з вдавненим центром; *плоскі* – розстилаються по поверхні середовища.

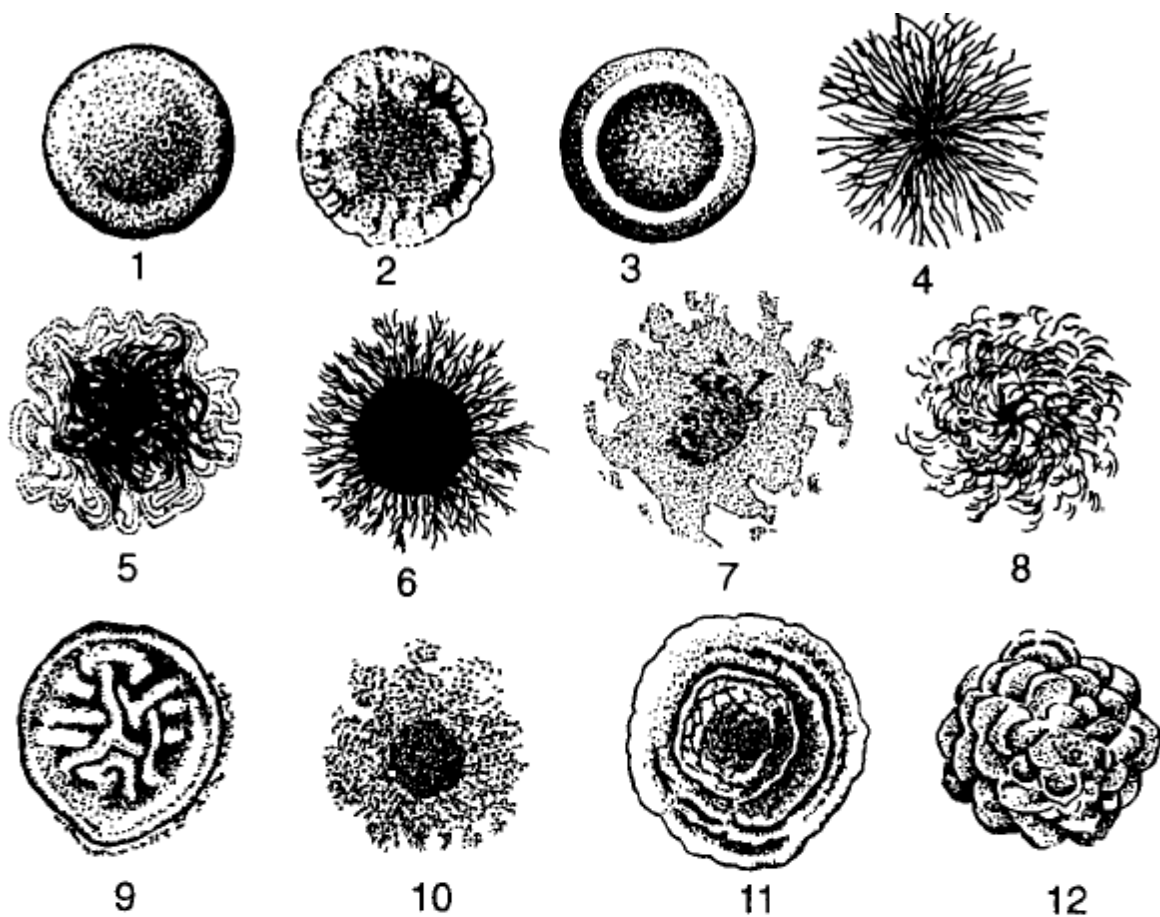
Поверхня буває *матовою* або *блискучою*, *сухою* або *вологою*, *гладенькою* або *шорсткою*. Колонії з гладенькою поверхнею позначають буквою S (від англ. *smooth* – гладенький), з шорсткою – буквою R (від англ. *rough* – шорсткий).

Колір колоній зумовлений пігментом, який продукує культура мікроорганізмів. Переважна більшість патогенних мікробів не утворюють пігмент, тому їх колонії *безбарвні*, у проникаючому світлі вони *прозорі*, *напівпрозорі* або *непрозорі*. Колонії пігментоутворюючих мікроорганізмів мають різний колір: *жовтий*, *оранжевий*, *червоний*, *чорний*, *фіолетовий* тощо. Так, синьогнійна паличка утворює колонії синьо-зеленого кольору, а стафілококи – білого і жовтого.

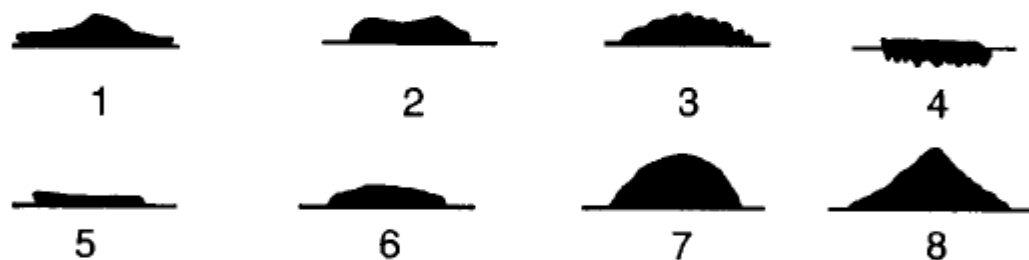
Структура колоній визначається під мікроскопом. У непрозорих колоній вона не визначається. За структурою розрізняють такі види колоній: *гіалінові* – без видимої певної структури; *зернисті* – залежно від розміру зерен можуть бути дрібно- і грубозернистими; *волокнисті* – наявність волокон усередині колонії.

Колонії також можуть бути *однорідні* і *неоднорідні*. В однорідних будова колонії у всіх її частинах однакова, у неоднорідних центральна частина або сектор відрізняється від іншої частини колонії.

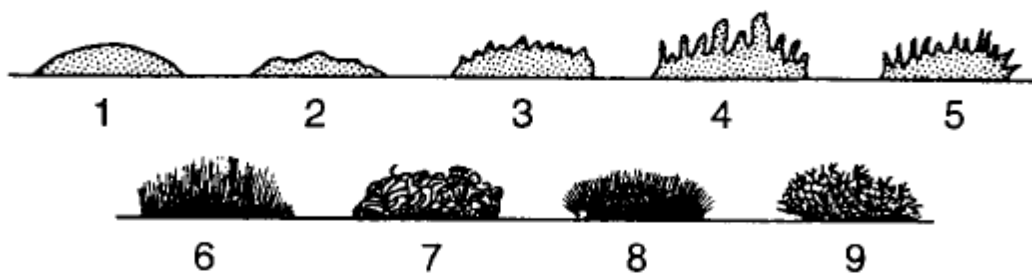
Консистенція – це фізичний стан колонії. Її визначають за допомогою бактеріологічної петлі. За консистенцією колонії бувають: *пастоподібні* (нагадують вершкове масло), легко знімаються; *в'язкі* або *слизькі*, прилипають і тягнуться за петлею; *волокнисті*, *шкірясті*, *щільні* – знімаються з поверхні поживного середовища у вигляді плівки, відповідно до розміру і форми колонії; *крихкі*, *сухі* – розсипаються у разі торкання петлею.



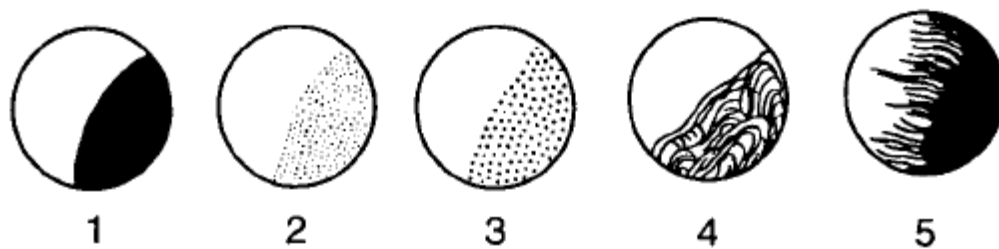
Форма



Профіль



Край



Структура

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Провести пересів культури чистих культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея із МПБ (в пробірці) на МПБ (в пробірках);

Завдання 2. Провести пересів культури чистих культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея із МПБ (в пробірці) на МПА, середовище Ендо, агарі Макк-Конкі (в чашках);

Завдання 3. Провести пересів культури чистих культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея із МПБ (в пробірці) на кольоровий ряд;

Завдання 4. Дати характеристику росту чистих культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея на МПБ (в пробірках);

Завдання 5. Дати характеристику росту культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея на кольорову ряді;

Завдання 6. Дати характеристику росту культур антракоїдів, стафілокока, кишкової палички і протея на МПА, середовищі Ендо, агарі Макк-Конкі в чашках;

Контрольні питання

1. Назвіть основні методи виділення чистих культур, що основані на механічному принципі.
2. Назвіть основні методи виділення чистих культур, що основані на біологічному принципі.
3. Чим відрізняється метод послідовних розведень, запропонований Л. Пастером, від методу пластинчастих розведень, запропонований Р. Кохом?
4. Чим відрізняється метод виділення чистих культур, запропонований Дригальським, від методу штрихових посівів?
5. В чому полягає відмінність у виділенні чистих культур за здатністю мікроорганізмів до спороутворення та за типом дихання?
6. В чому полягає відмінність у виділенні чистих культур за стійкістю мікробів до дії кислот і лугів та за рухливістю бактерій?
7. В чому полягає відмінність у виділенні чистих культур за чутливістю мікробів до дії хімічних речовин, антибіотиків та інших протимікробних засобів?
8. В чому полягає відмінність у виділенні чистих культур за чутливістю лабораторних тварин до збудників інфекційних захворювань?
9. Дайте визначення термінам «чиста культура», «штам», «колонія».
10. За якими ознаками характеризують ріст мікробів у рідких поживних середовищах?

11. Які бувають колонії мікробів за розміром і формою?
12. Які бувають колонії мікробів за контуром краю і прозорістю?
13. Які бувають колонії мікробів за рельєфом?
14. Які бувають колонії мікробів за поверхнею та кольором?
15. Які бувають колонії мікробів за кольором і структурою?
16. Які бувають колонії мікробів за консистенцією?
17. Як вивчають біохімічні (цукролітичні, протеолітичні та окисно-відновні) властивості чистих культур мікроорганізмів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

Тема: БІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕНЬ (БІОПРОБА). ВИДИ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН. СПОСОБИ ЗАРАЖЕННЯ. ЕТАПИ РОЗТИНУ ТРУПІВ ПІДДОСЛІДНИХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Навчальна мета

Знати:

- способи зараження експериментальних тварин;
- способи визначення екзотоксинів бактерій.

Уміти:

- вміти провести мікробіологічне дослідження трупа піддослідної тварини);
- зробити посіви на ЖС із паренхіматозних органів трупа білої миші;
- визначити вірулентність досліджуваної культури за методом Ріда і Менча.

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, шпателі, груші для посівів, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, чисті культури *B. subtilis* та *St. spp.* на МПБ і МПА, МПБ і МПА (в пробірках, в чашках і розплавлений та охолоджений до 50 в колбах по 100 мл), білі миші, гвінейські свинки (мурчаки), кріль, термостат, скальпель, ножиці і пінцети очні, ефір, одноразові шприци різних об'ємів, вата, дошка для розтину трупів дрібних тварин, голки, холодильник, дезінфекційний розчин (3 % розчин хлораміну) у високих стаканах.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Як було відзначено у попередній лабораторній роботі, для ідентифікації виділених чистих культур використовують низку мікробіологічних методів, зокрема:

➤ **мікроскопічний**, з допомогою якою вивчають морфологічні ознаки (форму – кулясті, паличковидні, звивисті, нитчасті тощо, розміри, рухливість), тинкторіальні властивості (відношення до барвників – грампозитивні чи грамнегативні, кислотостійкі тощо);

➤ **культуральний**, з його допомогою ми вивчаємо *ростові властивості культури* (інтенсивність та швидкість росту), *біохімічні* (здатність розщеплювати або утилізувати білки – протеолітичні властивості; здатність

розщеплювати цукри – цукролітичні властивості); культуральні (форма, розмір, колір, структура, краї колоній – на щільних живильних середовищах; наявність каламуті, осаду, плівки – на рідких живильних середовищах);

➤ **імунологічний**, за допомогою імунологічних реакцій, зокрема реакції аглютинації на склі вивчають антигенну структуру мікроорганізмів; за допомогою реакції нейтралізації встановлюють наявність токсину та його типу у культурі;);

➤ **біологічний**, з допомогою цього методу на лабораторних піддослідних тваринах відтворюємо експериментальну інфекцію, виділяємо чисту культуру збудника інфекції;

➤ **молекулярно-генетичний**, з допомогою якого визначаємо геном мікроорганізмів чистої культури, тобто на основі встановлення специфічності геному ідентифікуємо збудник у культурі або досліджуваному матеріалі.

Сьогодні ми розглянемо **біологічний метод**, який часто використовують в мікробіологічних, вірусологічних та імунологічних лабораторіях для вирішення спеціальних задач, зокрема таких:

1. Встановлення етіологічного діагнозу інфекційної хвороби, особливо в тих випадках, коли збудник не можна або важко виявити чи виділити іншим способом (пневмококи, туляремійні бактерії, віруси сказу, енцефалітів та ін.).

2. Виділення або ідентифікації чистої культури, визначення її токсигенності чи токсичності.

3. Визначення вірулентності мікроорганізмів, встановлення мінімальних смертельних доз мікробів, екзотоксинів та ендотоксинів.

4. При наукових дослідженнях для вивчення механізму розвитку інфекційної хвороби, формування імунітету, специфічного лікування і профілактики.

5. На біофабриках з метою контролю імуногенності, токсичності, стерильності, нешкідливості, пірогенності біологічних медичних препаратів (вакцин, анатоксинів, ліків тощо).

6. Для отримання діагностичних імунних сироваток, коли піддослідних тварин використовують як донорів.

Визначення вірулентності мікроорганізмів.

Патогенність – видова якісна ознака, яка передається по спадковості, закріплена в геномі мікроорганізму в процесі еволюції, тобто це **генотипова ознака, що відображає потенційну можливість мікроорганізму проникати в макроорганізм і розмножуватися у ньому, викликати комплекс патологічних процесів, що спричиняють захворювання**. За цією ознакою виділяють патогенні, умовно-патогенні та непатогенні види мікроорганізмів.

Вірулентність – ступінь (міра) патогенності певного штаму патогенного мікроорганізму і є кількісною ознакою їх патогенності. Вона також спадково закодована, але її прояв залежить від впливу різних факторів, тобто **це фенотипова ознака** того чи іншого штаму мікроорганізму.

За цією ознакою виділяють високовірулентні, слабковірулентні і невірулентні (авірулентні) варіанти патогенного виду мікроорганізмів.

До факторів патогенності відносять:

- здатність мікроорганізмів прикріплюватися до клітин (*адгезія*),
- розміщуватися на їх поверхні (*колонізація*),
- проникати в клітини (*інвазія*) і
- протистояти факторам захисту організму (*агресія*).

Лабораторні тварини. Найчастіше в лабораторній практиці використовують білих мишей, гвінейських свинок, білих щурів і кролів.

Деякі спеціальні лабораторні дослідження проводять на мавпах, собаках, котах, хом'яках, ховрах, тхорах, бавовняних щурах, мишах-полівках, а також на птахів (голуби, кури, папуги та ін.).

Білі миші високочутливі до пневмококів, клебсієл, деяких видів сальмонел, збудників сибірки, чуми, туляремії, лістеріозу, меліоїдозу, правця, ботулізму, газової анаеробної інфекції, коклюшу, орнітозу, висипного тифу, сказу, лейшманіозу, токсоплазмозу. Новонароджені миші чутливі до арбовірусів, коксакі-вірусів. На білих мишах визначають силу екзо- й ендотоксинів.

Гвінейські свинки чутливі до збудників туберкульозу (*M. hominis*), псевдотуберкульозу, дифтерії, чуми, туляремії, бруцельозу, сапу, холери, сибірки, лептоспірозу, меліоїдозу, лістеріозу, орнітозу, ботулізму, правця, газової гангрені, кашлюка, висипного тифу, ящуру.

Кролі чутливі до стафілококів, стрептококів, деяких видів сальмонел, збудника туберкульозу, сибірки, пастерельозу, лістеріозу, ботулізму, правця, сифілісу, амебіазу, токсоплазмозу, вірусів сказу й простого герпесу.

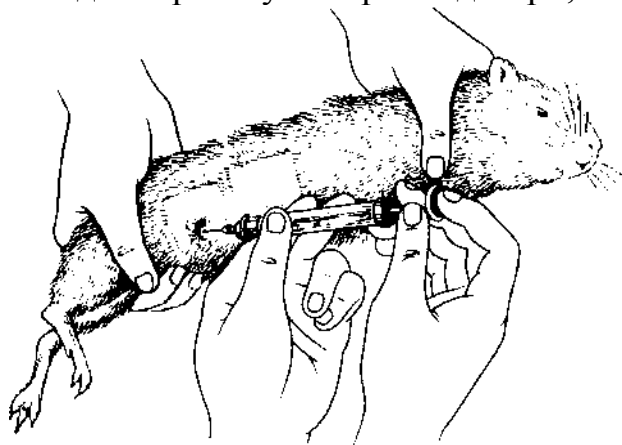
Для отримання високостандартних і легковідтворюваних стабільних результатів, а також у наукових дослідженнях, особливо вірусологічних, у лабораторній практиці використовують генетично стандартизованих **лінійних (гомозиготних) тварин**. Їх отримують у спеціальних віваріях шляхом багаторазового близькоспорідненого схрещування (інбридингу).

У лабораторних тварин можуть виникати спонтанні захворювання бактеріальної чи вірусної природи, латентні інфекції. Вони також мають свою нормальну мікрофлору. Все це ускладнює виділення чистих культур від заражених тварин і визначення їх етіологічної ролі. Цього недоліку позбавлені **безмікробні лабораторні тварини - гнотобіонти**, а також тварини, вільні від спеціальних патогенних збудників (*SPF-тварини – specific pathogens free animals*).

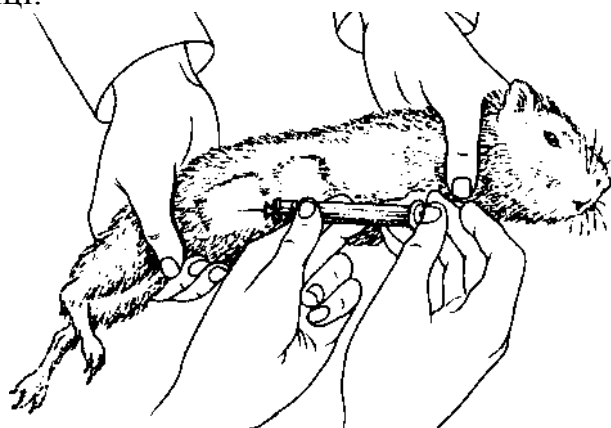
Способи зараження експериментальних тварин.

Для постановки біологічної проби або відтворення інфекційного захворювання у лабораторних тварин використовують різні методи введення мікроорганізмів, їх токсинів або іншого досліджуваного матеріалу: **нашкірний, внутрішньошкірний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньоочеревинний**. Матеріал можна ввести в носові ходи, рот, шлунок, пряму кишку, серце, мозок, піхву, яєчко, кон'юнктиву,

порожнину суглобів. Спосіб зараження залежить від типу матеріалу, ймовірних збудників чи їх токсинів і виду тварин. **Внутрішньошкірний спосіб** часто використовують при введенні екзотоксинів (стафілококовий, дифтерійний) для виявлення їх дермонекротичної дії, або при постановці алергічних проб. Матеріал вводять в об'ємі 0,1–0,2 мл тонкою голкою, користуючись туберкуліновим шприцом. Шкіру, позбавлену шерсті, протирають спиртом, розтягують великим і вказівним пальцями, голку вводять під гострим кутом зрізом догори, матеріал треба вводити повільно.



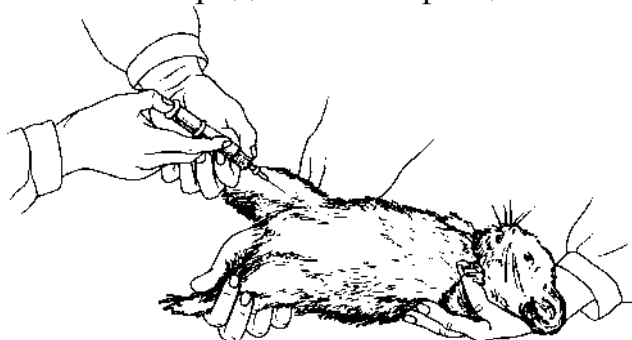
Підшкірний спосіб використовується найчастіше. Місце введення після депіляції шкіру обробляють спиртом, захоплюють і підіймають двома пальцями лівої руки і в основу утвореної складки правою рукою вколюють голку шприца. Пройшовши голкою кілька міліметрів, її відхиляють в один чи другий бік, проходять глибше і повільно вводять матеріал, що міститься в шприці.



Найзручніше місце для підшкірного введення матеріалу в мишей і щурів - на спині біля кореня хвоста, а у гвінейських свинок та кроликів - у ділянці спини чи живота. Мишам вводять 0,5-1,0 мл матеріалу, щурам і свинкам - 1,0-1,5 мл, кролям - не більше 3,0 мл.

Внутрішньом'язове зараження проводять у ділянку тіла з найбільш розвиненим м'язовим шаром. У кролів, гвінейських свинок, щурів і мишей - це м'язи верхньої третини задньої лапи, у курей і голубів - грудний м'яз. Ділянку шкіри в місці ін'єкції обробляють так само, як і при підшкірному введенні. Потім великим і вказівним пальцями лівої руки захоплюють товсту

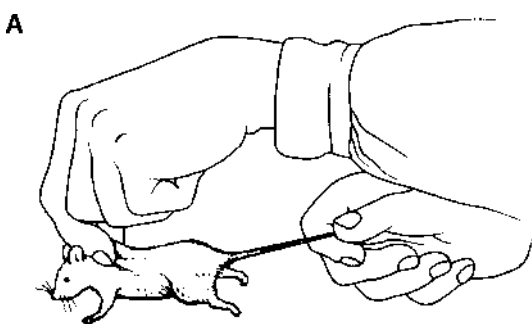
м'язову складку і вводять голку майже під прямим кутом в глибину м'язів. Часто цим методом користуються для експериментального відтворення анаеробних клостридіальних інфекцій.



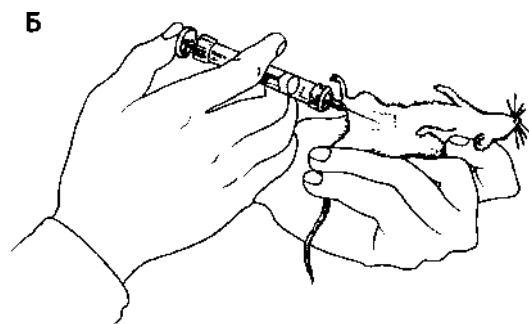
Внутрішньоочеревинне зараження. Спочатку вистригають шерсть на животі в нижній його третині, протирають спиртом або розчином йоду. Для попередження ушкоджень кишечника тварину тримають вниз головою.

З цією ж метою використовують короткі голки з притупленим кінцем. У кроликів і гвінейських свинок роблять маленький надріз шкіри (2-3 мм) у нижній третині живота збоку від середньої лінії. Під гострим кутом вводять голку між шкірою і м'язами, потім переводять її в перпендикулярне положення до очеревини, буравлячим рухом проколюють її, відчуваючи ніби “провал” у черевну порожнину, і вводять досліджуваний матеріал. На місце розрізу накладають шов або хірургічну скрепку. При зараженні мишей і щурів шерсть не голять і надріз не роблять

Максимальні дози досліджуваного матеріалу для введення білим мишам – 1 мл, щурам – 3 мл, гвінейським свинкам – 5 мл і кролям – 10 мл. Цей метод застосовують для швидкого відтворення інфекційного процесу.

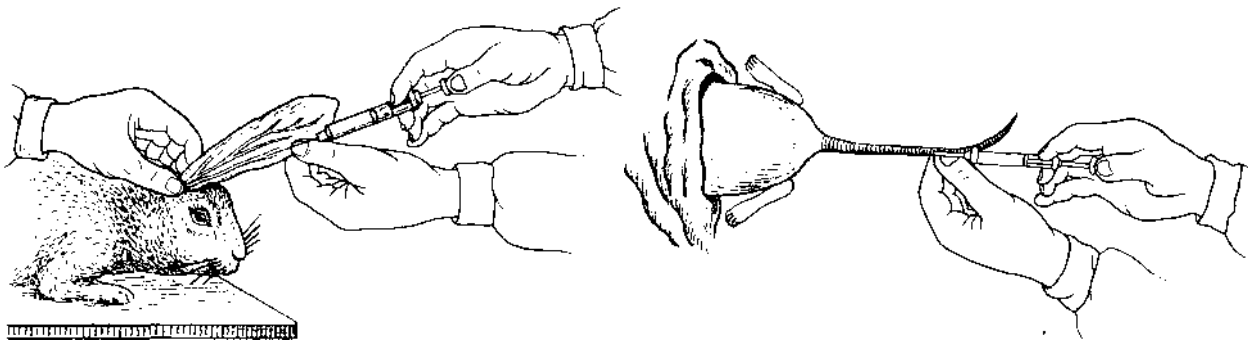


А – фіксація;



Б – уведення.

Внутрішньовенний спосіб введення. У різних видів тварин при цьому користуються різними венами: кролів заражають у крайову вену вуха, мишей і щурів - у вену хвоста, гвінейських свинок - у вену стегна, попередньо надрізавши шкіру та відсепарувавши її. Для внутрішньовенних ін'єкцій використовують голки з довгим косим зрізом. Найлегше цей спосіб здійснюється на кролях завдяки поверхневому розташуванню вушних вен. Перед введенням матеріалу тварину фіксують у спеціальному боксі.

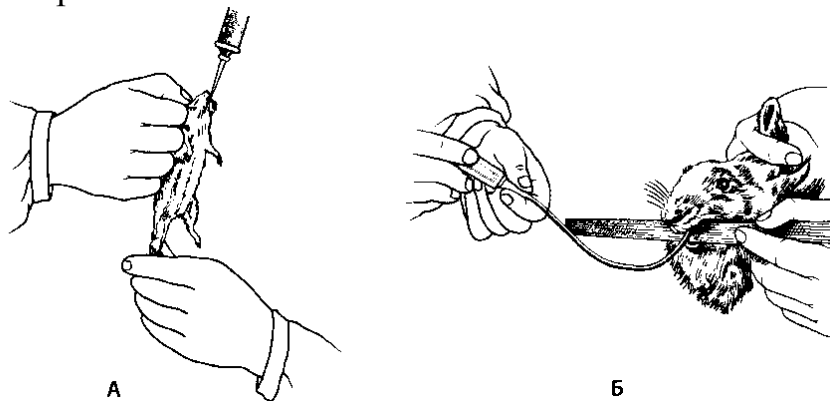


При внутрішньовенному зараженні щурів і мишей користуються тонкими короткими (туберкуліновими) голками з косим зрізом. Перед введенням матеріалу хвіст тварини занурюють у теплу воду (50 °С), щоб викликати гіперемію.

У курей і голубів зручно використовувати вени, які розташовані на внутрішній поверхні крил (підкрильцеву вену).

Ентеральне зараження. Найпростіше провести зараження через рот природним шляхом, добавляючи інфекційний матеріал до корму тварин. Але при цьому досить важко точно визначити інфікуючу дозу. У зв'язку з цим частіше зараження проводять примусово. **Мишу чи щура** тримають вертикально. Культуру бактерій або інший заразний матеріал вводять за допомогою шприца, голка якого має незначну кривизну й напаяну на кінці олово. Рот відкривають пінцетом. Кількість матеріалу, який вводять у шлунок мишей, становить 0,5–0,7 мл, для щурів – 2–3 мл.

Кролям і гвінейським свинкам заразний матеріал вводять через рот спеціальним катетером або гумовою трубкою довжиною 7-8 см і шириною 0,3–0,5 см. Перед введенням трубки в рот вставляють дерев'яну планку з отвором посередині. Через цей отвір обережно вводять у стравохід катетер, змазаний вазеліном. Щоб полегшити його проходження по стравоходу, в рот тварини піпеткою вливають декілька крапель фізіологічного розчину хлориду натрію. Це викликає ковтальні рухи, під час яких трубка легко рухається по стравоходу й потрапляє до шлунка. Зовнішній кінець катетера приєднують до шприца, наповненого певною дозою заразного матеріалу. Його повільно вводять безпосередньо у шлунок в об'ємі 2,5–3,5 мл гвінейським свинкам і 3,5–5,0 мл кролям.



Інтраназальне зараження. Існує декілька способів зараження тварин через дихальні шляхи, при яких матеріал вводять або за допомогою інгаляції, або спеціальними зондами безпосередньо в трахею чи бронхи. Однак їх використовують рідко. Найпростішим способом, який можна відтворити в будь-якій баклабораторії, є закапування заразного матеріалу або культури бактерій в носові ходи тварин під легким ефірним наркозом. За допомогою шприца матеріал вводять краплями в носові ходи мишей на глибину 1,0–1,5 мм, білих щурів – 2–3 мм, кролів і гвінейських свинок - 3,5–4,0 мм. Щоб не пошкодити слизову оболонку, використовують абсолютно тупі голки. За допомогою цього методу можна заражати мишей збудником коклюшу, міксовірусами, гвінейських свинок – рикетсіями та ін. Максимальний об'єм матеріалу, що вводиться, становить для мишей 0,03-0,05 мл, для щурів - 0,05-0,1 мл, для кролів і гвінейських свинок - до 2 мл.

Інтрацеребральне зараження. Кролям і гвінейським свинкам роблять трепанацію черепа й заразний матеріал вводять через трепанаційний отвір безпосередньо в мозок або під тверду мозкову оболонку (субдурально).

Зараження в передню камеру ока. При цьому способі матеріал вводять на кон'юнктиву або в передню камеру ока.

Обидва методи є порівняно складними у виконанні, тому ми на них не будемо зупинятися детально.

Утримання заражених тварин. Після зараження лабораторні тварини називаються “піддослідними”. Їх утримують в ізолюваному приміщенні (ізоляторі), окремо від розплідника, де розміщені здорові тварини. Приміщення для піддослідних тварин повинно бути теплим (10–15 °С) і сухим. Слід пам'ятати, що кролі чутливі до вогкості, білі миші до холоду, а гвінейські свинки – і до вогкості, і до холоду. Дрібних тварин після зараження вміщують у високі скляні банки, які закривають металевими сітками, а кролів і свинок – у клітки. Банки і клітки повинні мати етикетки з позначенням дати зараження або номера експерименту, під яким він записаний в лабораторному журналі. Тварини повинні регулярно отримувати корм із достатнім вмістом вітамінів, воду або молоко. При спостереженні за ними відзначають в'ялість, відсутність апетиту, діарея, які є ранніми симптомами захворювання. При огляді тварин змушують рухатись, щоб не допустити паралічів. Щоденне спостереження дає змогу своєчасно відібрати захворілих тварин для розтину і подальших досліджень.

Мікробіологічне дослідження трупа. Розтин і мікробіологічне дослідження загиблих тварин має велике, часом вирішальне діагностичне значення. Воно проводиться з метою виявлення і визначення локалізації збудника інфекційного захворювання. Трупний матеріал досліджують за допомогою бактеріоскопічних (вірусоскопічних) і бактеріологічних методів. Досліджуваний матеріал беруть під час розтину трупа, який проводять, дотримуючись встановлених правил.

Розтин трупа та його мікробіологічне дослідження потрібно робити якомога скоріше після смерті. До цього його необхідно зберігати на холоді,

оскільки мікрофлора кишечника при низькій температурі повільніше проникає в кров, тканини й паренхіматозні органи. Розтин трупа та забір матеріалу необхідно проводити в умовах, які виключають його забруднення сторонніми мікроорганізмами.

Тварин, що загинули від експериментальної інфекції, досліджують з дотриманням правил асептики. При цьому використовують лише стерильні інструменти. Їх переносять із стерилізатора в склянку зі спиртом і ватою на дні, перед кожним використанням обпалюють на вогні.

Загиблу тварину захоплюють пінцетом, кладуть спиною донизу на дерев'яну дощечку, вміщену в металеву кювету з дезрозином. До дощечки її прикріплюють булавками за чотири лапки, широко розтягуючи їх. Шкіру в місці розтину змочують дезінфікуючим розчином, щоб не розліталась шерсть, яка містить автохтонну мікрофлору.

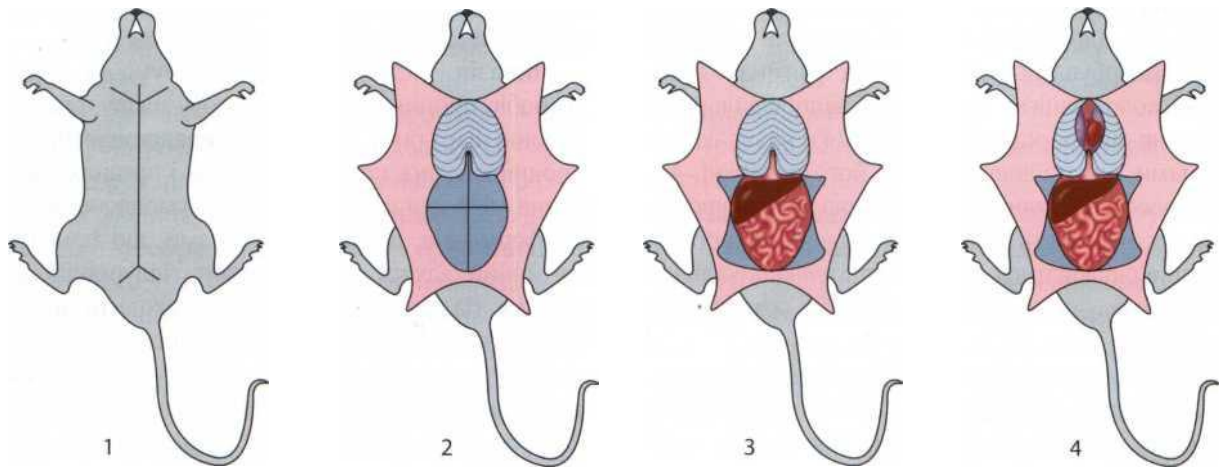
Розтин зовнішніх покривів починають з розрізу шкіри від нижньої щелепи до лобка, потім роблять бокові надрізи в напрямку до лапок. Шкіру відпрепаровують і відкидають в обидва боки, відкриваючи всю передню поверхню тіла. В підшкірній клітковині відзначають такі зміни, як гіперемія судин, крововиливи, набряки, стан лімфатичних вузлів.

Дослідження органів грудної порожнини. Пінцетом захоплюють мечоподібний відросток, роблять поперечний надріз під ним, вставляють ножиці і проводять два бокові розрізи в місцях сполучення ребер із грудною кісткою. Утворений клапот відкривають догори й оглядають легені та серце, відзначають наявність ексудату. Обов'язково роблять посів крові з серця. Для цього розжареним скальпелем припікають стінку шлуночка або передсердь і в даній ділянці роблять прокол пастерівською піпеткою з тонко відтягнутим у полум'ї пальника кінцем. Кров, що потрапила в капіляр, сіють в цукровий бульйон і на агар, а із залишку роблять мазки. При потребі проводять також посіви та роблять мазки-відбитки з легень, плеври та ексудату.

Розтин і дослідження черевної порожнини проводять дуже обережно, щоб не пошкодити кишечник. Черевну стінку захоплюють і трохи підіймають ввєрх, ножицями розрізають її від діафрагми до лобка і по два бокових надрізи в напрямку до лапок. Утворені клапті відвертають в обидва боки. Оглядають внутрішні органи, відзначаючи в протоколі величину, колір і консистенцію печінки, селезінки, нирок, надниркових залоз, лімфатичних вузлів брижі та наявність ексудату.

В разі потреби **роблять посіви із тканин вказаних органів та ексудату.** Для цього припікають поверхню органа розжареним скальпелем і в цій ділянці проводять розріз. Бактеріологічною петлею з поверхні розрізу роблять зішкрібки паренхіми і сіють на поживні середовища.

Для виготовлення мазків-відбитків вирізають шматочок органа й поверхню розрізу притискають до предметного скла, або розмазують по ньому тонким шаром.



Послідовні етапи розтину білої миші.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Провести підшкірне уведення стерильного фізрозчин гвінейській свинці;

Завдання 2. Провести внутрішньошкірне уведення стерильного фізрозчин гвінейській свинці;

Завдання 3. Провести внутрішньом'язове уведення стерильного фізрозчин гвінейській свинці;

Завдання 4. Провести внутрішньовенне уведення стерильного фізрозчин білій миші і кролику;

Завдання 5. Провести внутрішньочеревне уведення стерильного фізрозчин білій миші;

Завдання 6. Провести розтин трупа білої мишки, зробити посіви та мазки відбитки із паренхіматозних органів і ексудату черевної порожнини.

Примітка:

1. Цю лабораторну роботу проводимо в ізоляторі бактеріологічного відділу регіональної лабораторії Держпродспоживслужби;

2. Посів на ТГС (тіогліколеве середовище) і мазки із ексудату черевної порожнини експериментально інфікованої білої мишки робити зразу після розрізу очеревини.

Контрольні запитання:

1. Які мікробіологічні методи використовують для ідентифікації виділених культур бактерій?

2. В чому полягає суть мікроскопічного методу ідентифікації ізолятів бактерій?

3. В чому полягає суть культурального методу ідентифікації ізолятів бактерій?

4. В чому полягає суть біохімічного методу ідентифікації ізолятів бактерій?
5. В чому полягає суть імунологічного методу ідентифікації культур бактерій?
6. В чому полягає суть молекулярно-генетичного методу ідентифікації культур бактерій?
7. З якою метою застосовують біологічний метод досліджень збудників?
8. Яких тварин найчастіше використовують для біопроби у лабораторній практиці?
9. Які лабораторні тварини називаються SPF або гнотобіонтами? Для чого їх вирощують?
10. Перерахуйте основні методи інфікування лабораторних тварин мікроорганізмами (способи зараження тварин).
11. В яких випадках і як застосовується внутрішньошкірний спосіб зараження?
12. В яких випадках і як застосовується внутрішньом'язовий спосіб зараження?
13. В яких випадках і як застосовується внутрішньоочеревинний спосіб зараження?
14. В яких випадках і як застосовується внутрішньовенний спосіб зараження?
15. Де і як утримують заражений піддослідних тварин?
16. Яка мета розтину трупів піддослідних тварин?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ. ПОНЯТТЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ.

Навчальна мета

Знати:

- Суть і способи визначення чутливості бактерій до антибіотиків.

Уміти:

- Визначити чутливість виділених культур мікроорганізмів до антибіотиків.

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, шпателі, груші для посівів, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, чисті культури *St. epidermidis* і *E. coli* на МПБ і МПА, МПБ і МПА (в пробірках, в чашках і розплавлений та охолоджений до 50 С° в колбах по 100 мл), водяна баня, термостат, холодильник, дезінфекційний розчин (3 % розчин хлораміну) у високих стаканах, диски з антибіотиками.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Коротка історія відкриття та застосування антибіотиків

- **1929** – Олександр Флемінг відкриває перший антибіотик – пеніцилін;

- **1942** – Починається промислове виробництво пеніциліну;
- **1954** – 1 тис. тон антибіотиків випускається в США;
- **1960** – з'являються антибіотикостійкі бактерії внаслідок нераціонального застосування препаратів;
- **Сьогодні** – приблизно 250 тис тон антибіотиків виробляється та застосовується в світі щорічно.

Напевно, немає хіміотерапевтичного препарату, до якого бактерія за певних умов не зможе стати стійкою. – Олександр Флемінг

Хіміотерапевтичні препарати (лат. *chymiotherapeutica*) – це лікарські препарати, природнього та синтетичного походження, які використовують для лікування пацієнтів з інфекційними та онкологічними захворюваннями.

До хіміотерапевтичних препаратів належать антибіотики, сульфаніламідні (сульфаніламід), протитуберкульозні, антигельмінтні (антигельмінтики), протигрибкові, противірусні, антибластомні препарати.

Антибіотики – це хіміотерапевтичні препарати біологічного походження або їх напівсинтетичні похідні й синтетичні аналоги, що здатні у низьких концентраціях вибірково ушкоджувати або вбивати мікроорганізми (бактерії, гриби, найпростіші).

Антибіотики – це вироблені мікроорганізмами, або синтезовані штучно хімічні речовини, які здатні гальмувати ріст і викликати загибель мікроорганізмів.

Відомо кілька тисяч антибіотиків, для класифікації яких запропоновано різноманітні схеми. Широкого розповсюдження набула **класифікація антибіотиків за біологічним походженням** (табл. 1).

Слід зазначити, що будь-яка класифікація антибіотиків постійно динамічно змінюється, залежно від появи нових препаратів, виявлення їх нових властивостей. Так, в останні роки, використовуючи методи біоінженерних технологій, з мутантного штама гриба *Glarea lozoyensis* шляхом його ферментації отримано новий клас напівсинтетичних препаратів - **ехінокандини**. Вони мають грибкове походження і являють собою модифіковані ліпопептиди (циклічні декапептиди). Дія таких препаратів унікальна: вони за неконкурентним механізмом блокують 1,3-бетаглюкансинтазу, яка бере участь у формуванні клітинної стінки гриба, внаслідок чого порушується синтез необхідних для їх стінки бета (1,3) О гліканів. **Ехінокандини називають “пеніцилінами” для грибів**. Клінічно значущим зарекомендував себе перший препарат цієї групи - **каспофунгін**. Він є ефективним щодо пневмоцист, кандид та аспергил.

Таблиця 1. Класифікація антибіотиків за біологічним походженням

Антибіотики грибкового походження:	
Пеніцилін (<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. chrysogenum</i>);	• Трихоцетин (<i>Trichothecium roseum</i>);
Цефалоспорини (<i>Cephalosporium spp</i>);	• Фумагілін (<i>Aspergillus fumigatus</i>);
Гризеофульвін (<i>P. griseofulvum</i> , <i>P. nigricans</i>);	• Термофілін (<i>Lenzites thermophyla</i>);
Фузидин (<i>Fusidium coccineum</i>);	• Лензитин (<i>Lenzites sepiaria</i>);
Мікроцид (<i>P. vitale</i>)	• Хетомін (<i>Chaetomium cochloides</i>)

Тетрацикліни: I	
Хлортетрациклін (<i>S. aureofaciens</i>); • Окситетрациклін (<i>S. rimosus</i>)	• Левоміцетин або хлорамфенікол (<i>S. venezuelae</i>)
Макроліди:	
• Олеандоміцин (<i>S. antibioticus</i>)	• Еритроміцин fS. <i>erythreus</i>
Полієнові антибіотики:	
• Ністатин fS. <i>noursei</i>);	Амфотерицин B fS. <i>nodosus</i>);
• Леворин fS. <i>levorys Krass</i>)	• Трихоміцин fS. <i>hachijoensis</i>)
Інгібітори бета-лактамаз:	
Клавуланова кислота fS. <i>clavuligerus</i>); ■ Карбапенем-оліванові кислоти fS. <i>olivaceus</i>)	Тіенаміцин fS. <i>cattleya</i>)

Антибіотики з рослин:	
<ul style="list-style-type: none"> • Уснінова кислота (лишайник); • Хлорелін (<i>Chlorella vulgaris</i>); • Аренарін (безсмертник, <i>Helichrysum arenarium</i>); • Берберин (родина барбарисових); • Госипол (бавовник шерстистий родини мальвових); • Іманін та новоіманін (звіробій); • Гордецин (зерна ячменю) 	<ul style="list-style-type: none"> • Лютенарин (глічки жовті); • Сальвін (шавлія лікарська); • Хінін (кора хінного дерева); • Хлорофіліпт (листя евкаліпту); • Аліцин (часник <i>Allium sativum</i>); • Рафанін (редиска <i>Raphanus sativum</i>); • Фазеолін (квасоля <i>Phaseolus vulgaris</i>)
Антибіотики з тваринних тканин:	
<ul style="list-style-type: none"> • Інтерферони (клітини кісткового мозку, селезінки, макрофаги); • Лізоцим (сльози, слина, яєчний білок) 	<ul style="list-style-type: none"> • Еритрин (еритроцити крові, печінка, плацента); • Екмолін (риби)
Антибіотики з бактерій:	
Із представників роду <i>Bacillus</i> :	
<ul style="list-style-type: none"> • Поліміксин (<i>B. polymyxa</i>); • Бацитрацин, ліхеніформін (<i>B. licheniformis</i>); • Граміцидин (<i>B. brevis</i>); • Субтилін (<i>B. subtilis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Едеїн (<i>B. brevis</i>); • Мікобацилін (<i>B. subtilis</i>); • Бутирозини (<i>B. circulans</i>)
Із представників роду <i>Pseudomonas</i> :	
<ul style="list-style-type: none"> • Піоціанін (<i>P. aeruginosa</i>); • Піролінтрин (<i>P. pirrocinia</i>, <i>P. aureofaciens</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Сорбістини (<i>P. sorbistini</i>)
Із представників інших родів бактерій:	
<ul style="list-style-type: none"> • Монобактами (<i>Chromobacterium violaceum</i>); • Нізин (<i>Streptococcus lactis</i>); • Продигіозин (<i>Serratia marcescens</i>); • Коліформін (<i>E. coli</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Протапіни (<i>Proteus vulgaris</i>); • Стрептозин, диплококів (штам <i>Streptococcus</i>); • Азоміцин, нокардамін (нокардії)

Потреби клініцистів певною мірою задовольняє **класифікація антибіотиків за спектром біологічної дії** (табл. 2).

- Окрім корисної дії **антибіотикам властива побічна дія**, зокрема:
- при повторному їх введенні можуть виникнути алергічні реакції: шкірні висипки, кропивниця, астматичні приступи, риніт, кон'юнктивіт;
 - тетрацикліни та гризеофульфін здатні викликати фотодерматози;
 - спричиняти анафілактичний шок та ангіоневротичний набряк гортані;
 - викликати токсичні реакції завдяки їх органотропній дії;
 - проявом токсичної дії є **бактеріальний ендотоксикоз**, що розвивається у хворих при введенні антибіотиків, до яких сальмонели,

шигели, кишкові палички, бруцели, трепонеми сифілісу проявляють високу чутливість;

– у хворих формуються **дисбіотичні ураження**, пов'язані з порушенням складу мікробіоценозів кишечника, шкіри;

– Формування резистентності мікроорганізмів до антибіотиків.

Таблиця 2. Класифікація антибіотиків за спектром біологічної дії

1	Протибактеріальні:
А.	Вузького спектра дії, активні переважно проти грампозитивних мікроорганізмів:
	природні пеніциліни;
	напівсинтетичні пеніциліни (метицилін, оксацилін, клоксацилін);
	цефалоспорины I покоління;
	лінкоміцин;
	новобіцин;
	фузидин;
	макроліди
Б.	Протибактеріальні антибіотики широкого спектра дії:
	напівсинтетичні пеніциліни (ампіцилін, амоксицилін, карбеніцилін, тикарцилін, азлоцилін, мецилінам);
	цефалоспорины II-IV покоління;
	тетрацикліни;
	левоміцетин (хлорамфенікол);
	аміноглікозиди;
	поліміксини;
	граміцидин С;
	Фторхінолони
2	Протигрибкові (ністатин, леворин, амфотерицин В, гризеофульвін, трихоцетин,
3	Противірусні (амантадин, відарабін, метизазон, ацикловір, гопіпол)
4	Протипаразитарні (еметин, хінін, фумагілін)
5	Протипухлинні (флеоміцин, блеоміцин, мітоміцин С, актиноміцини)

Антибіотикам притаманна висока біологічна активність. Вони спричиняють біологічний ефект у дуже малих концентраціях. Наприклад, пеніцилін викликає виражену бактерицидну дію у концентрації 0,000001 г/мл. Антибіотики мають високу вибірккову специфічність, оскільки проявляють свою дію тільки на певні групи організмів, не завдаючи шкоди іншим. Так, бензилпеніцилін затримує ріст грампозитивних бактерій (стафілококів, стрептококів) і практично не впливає на грамнегативні мікроби, гриби.

Біологічну активність антибіотиків оцінюють в умовних одиницях, які містяться в 1 мл розчину (ОД/мл) або в 1 мг препарату (ОД/мг).

У таких антибіотиків, як еритроміцин, новобіоцин, ністатин, трихоцетин та ін., одна **одиниця активності еквівалентна 1 мкг препарату.**

За **одиницю антибіотичної активності пеніциліну** приймають мінімальну кількість препарату, здатну затримувати ріст штаму *Staphylococcus aureus* 209P у 50 мл поживного бульйону.

Активність стрептоміцину вимірюється мінімальною кількістю антибіотика, який інгібує ріст *Escherichia coli* в 1 мл поживного бульйону.

Фактично для більшості **антибіотиків 1 ОД** відповідає **1 мкг хімічно чистого препарату**. Однак є антибіотики, для яких існують винятки. Так, наприклад, для пеніциліну **1 ОД відповідає 0,6 мкг**, поліміксину В – 0,1 мкг, ністатину – 0,333 мкг хімічно чистих антибіотиків.

Надзвичайно важливим етапом діяльності лікаря є призначення раціонального лікування хворого, а для цього необхідно обрати потрібний (ефективний) препарат.

Отже, **вивчення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних засобів необхідне** для вирішення низки завдань, зокрема:

✓ обґрунтування цілеспрямованої індивідуальної антибактеріальної терапії для лікування конкретної інфекційної хвороби;

✓ обґрунтування емпіричної терапії окремих інфекційних хвороб у межах лікувальних установ або регіонів;

✓ спостереження за розповсюдженням антибіотикорезистентності в окремих установах або регіонах;

✓ дослідження нових хімічних сполук на наявність у них антибактеріальної активності

Оцінка чутливості мікробів до антибіотиків та вивчення їх фармакокінетики в організмі хворого є основними лабораторними показниками, які при їх зіставленні дозволяють **прогнозувати ефективність антибактеріальної терапії**.

Методи, які використовуються в мікробіологічній практиці для визначення чутливості до антибактеріальних препаратів (АБП), можна поділити на дві групи.

Методи серійних розведень у поживних середовищах:

- макрометод (у пробірках);
- мікрометод (у планшетах);
- метод порогових (граничних) концентрацій.

Дифузійні методи:

- диско-дифузійний метод;
- Е-тест (епсилومترичний).

Крім того, є **група спеціальних методів оцінки антибіотикостійкості певних бактерій**, наприклад:

- метод виявлення β-лактамаз мікробів (використовують нітроцефіновий диск);
- виявлення стійкості штамів стафілококів до оксациліну і ванкоміцину;
- виявлення стійкості штамів ентерококів до аміноглікозидів і ванкоміцину;
- виявлення стійкості *S. pneumoniae* до бензилпеніциліну;
- виявлення β-лактамаз розширеного спектра дії в ентеробактерій.

Найпоширенішими методами визначення чутливості мікробів до антибіотиків є:

- ✓ дифузійні методи (диско-дифузійний метод **Кірбі-Бауера**, **Е-тест**) та

✓ метод серійних розведень у рідкому поживному середовищі.

Поживні середовища для визначення чутливості бактерій до антибіотиків повинні відповідати таким вимогам:

- бути стандартними та забезпечувати оптимальні умови росту мікроорганізмів;
- не містити інгібіторів бактеріального росту і великої кількості стимуляторів;
- не мати речовин, що пригнічують активність препаратів.

Диско-дифузійний метод визначення антибіотикочутливості є найпростішим якісним методом і широко використовується в практиці.

У диско-дифузійному методі як носій антибактеріального препарату використовують паперовий диск стандартного діаметра. Утворення зони пригнічення росту відбувається в результаті дифузії антибіотика в поживне середовище до концентрації препарату, яка перевищує **МІК (мінімально інгібуюча концентрація)** і пригнічує ріст досліджуваної культури в цій зоні. Диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано зробити висновок про величину МІК, а результатом дослідження є **віднесення досліджуваного мікроба до однієї з категорій чутливості** (чутливий, помірно стійкий або резистентний).

Достовірність результатів забезпечується шляхом стандартизації проведення тесту на всіх етапах дослідження, зокрема:

- ✓ виготовлення поживних середовищ, що враховують ростові властивості досліджуваних збудників,
- ✓ виготовлення і розливання посівного матеріалу на поверхню агару,
- ✓ вибір дисків (використання набору дисків відповідно до виду виділеного збудника та локалізації інфекції).

Метод дифузії за допомогою дисків є якісним методом. Він дозволяє встановити лише факт чутливості або резистентності збудників інфекції. Однак встановлений корелятивний зв'язок розмірів зон пригнічення росту досліджуваних штамів і значень МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) препарату, яка пригнічує ріст досліджуваного штаму) антибіотиків дозволяє оцінити ступінь чутливості і, використовуючи дані, наведені у таблиці.

За відношенням до антибіотиків можна виділити три групи бактерій:

- **чутливі** - штам пригнічується при концентраціях антибіотика, які створюються в органах і тканинах людини при рекомендованих лікувальних дозах. Лікування інфекції, викликаной мікроорганізмом, що належить до цієї категорії, як правило, ефективно при застосуванні препарату в рекомендованих дозах;
- **помірно стійкі** - МІК антибіотика для штамів цієї категорії вища, ніж для чутливих, але знаходиться в межах, досяжних при рекомендованих режимах дозування. Лікування інфекції, викликаной мікроорганізмом, який належить до цієї категорії, може бути ефективним при застосуванні антибіотика у підвищених дозах, або при локалізації осередку інфекції в тих

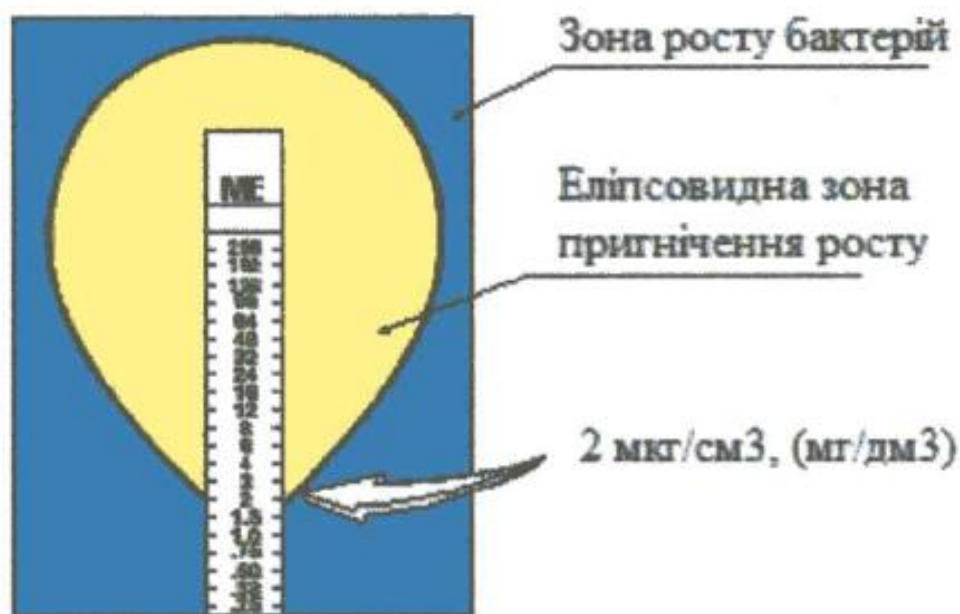
органах чи тканинах, де через фізіологічні особливості створюються підвищені концентрації препарату;

- **Стійкі (резистентні)** – штам не пригнічується при концентраціях антибіотика, які створюються в органах і тканинах при рекомендованих режимах дозування. Ці штами мають певні механізми резистентності. Лікування інфекції, викликаной мікроорганізмом, що належить до цієї категорії, буде неефективним.

Для правильного вибору антибіотика з метою дослідження чутливості виділеного штаму необхідно знати про природну чутливість певних видів мікроорганізмів, про розповсюдження серед них набутої резистентності.

Е-тест (епсилометричний) Даний тест є унікальною градієнтною технікою для дослідження антибіотикочутливості. 15 розведень антибіотика для визначення МПК за допомогою інноваційних технологій сучасної хімії наносяться на спеціальній вузькій полімерній смужці розміром 0,5×6,0 см, за градієнтом концентрацій препарату (від мінімальних до максимальних). Ці розведення вказуються на смужці разом із позначенням антибіотика.

Методика оцінювання чутливості полягає в тому, що смужка з антибіотиком розміщується на поверхню чашки Петрі, попередньо засіяну досліджуваним штамом бактерій. На великій чашці діаметром до 150 мм може бути розташовано 4–6 смужок. Чашка інкубується при оптимальній температурі протягом 24–48 год. Пригнічення росту мікроорганізму навкруг смужки Е-тесту відбувається тільки в тій зоні, де концентрація антибіотика, який дифундує з носія, вища МПК. При цьому утворюється краплеподібна зона інгібіції. Значення концентрацій препарату на кожній ділянці носія нанесені на зовнішній (зверненій до дослідника) поверхні Е-тесту. Місце перетину зони інгібування росту з градієнтною смужкою дає значення МПК (мінімальна порогова кількість) і виражається в мкг/мл (мал. 1).



Мал. 1. Визначення чутливості мікроорганізмів за допомогою Е-тестів.

Метод серійних розведень. Методи серійних розведень базуються на прямому визначенні МІК препарату, яка характеризує мікробіологічну активність АБП.

Показаннями для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень є необхідність одержання кількісних даних (МІК) щодо чутливості збудника інфекції (переважно при тяжкому перебігу інфекційних процесів) для проведення регульованої антибіотикотерапії.

Ефективним є визначення антибіотикочутливості за *методом порогових концентрацій (breakpoints)*. Основою його є уява про дві порогові (граничні) концентрації антибіотика, які поділяють штами мікроорганізмів на три групи – чутливі (S), проміжні (I) та стійкі (R) (див. табл. 1).

Розподіл штамів бактерій на чутливі, помірно чутливі та стійкі відповідно до “порогових” концентрацій антибіотиків (4 і 64 мкг/мл)

Концентрація антибіотика								
1	2	4	8	16	32	64	128	256
МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ	МКГ/МЛ
S - чутливі			I - проміжні			R - стійкі		

У даному випадку концентрація 4 мкг/мл розмежує чутливі та проміжні штами, а концентрація 64 мкг/мл - проміжні та стійкі.

Для кожного АБП визначено свої граничні концентрації для того чи іншого мікроорганізму. Їх значення не є постійними, а регулярно переглядаються в спеціальних комітетах, зокрема:

- ✓ (WHO – world health organization (BOO3),
- ✓ GLASS – Global Antimicrobial resistance Surveillance System – світова наглядова система за антимікробною резистентністю,
- ✓ CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute,
- ✓ EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing та ін.) залежно від змін чутливості популяцій бактерій.

Antimicrobial resistance AMR (антимікробна резистентність), антибіотикорезистентність – здатність мікроорганізмів виживати і розмножуватись, незважаючи на присутність антибіотиків. Це явище має місце коли бактерії, віруси гриби і паразити на генетичному рівні змінюються таким чином, що не «відповідають» на дію АБП, стають толерантними або резистентними до цих препаратів (АБП), що може призвести до поширення хвороби, погіршення здоров'я і навіть до смерті. AMR – це феномен стійкості штаму збудників інфекції до дії одного або декількох антибактеріальних препаратів.

Резистентність може бути природньою і набутою.

Природня – Коли в мікроорганізмі відсутня мішень для дії антибіотика або вона недоступна.

Набута – Ця стійкість розвивається внаслідок мутацій мікроорганізмів або при передачі генів від резистентних бактерій до чутливих бактерій.

Сьогодні це проблема глобального значення.

Адже внаслідок нерозумного застосування антимікробних препаратів – мікроорганізмами набули здатності до нечутливості і закріпили її на генетичному рівні. *Кількість стійких видів дуже швидко зростає!!!*

Наведемо приклад. Перші ознаки антимікробної резистентності (АМР) було помічено в 1942 р. після відкриття пеніциліну (1929 р.). Тоді було виявлено 4 штами *Staphylococcus aureus*, які стали нечутливими до цього антибіотика. На кінець 1960-х – понад 80% штамів стали нечутливими до пеніциліну.

Тоді у 1972 р. було синтезовано метицилін (напівсинтетичний антибіотик який, був дієвим до пеніцилін-стійких штамів стафілококів). Невдовзі з'явилися *метицилінрезистентні штами*. Потім було синтезовано ванкоміцин, який діяв проти метицилінрезистентних стафілококів. Усього 5 років знадобилося аби мікроорганізми виробили і закріпили на генетичному рівні стійкість і до ванкоміцину.

До 1999 року що чотири роки з'являлося приблизно 11 нових антибіотиків. У 2000-2004 їх кількість зменшилась десь втричі. З 2005 по 2009 фармпромисловість випускала десь по 3 антибіотики в рік. Проте таке скорочення у синтезі нових АБП не може допомогти виправити ті зміни, які людство уже спричинило.

У США щороку трапляється понад 2,8 млн. АМР-інфекцій, в результаті чого помирає близько 35 тис людей.

30 тис. людей на Землі щороку помирають через мультирезистентний туберкульоз.

Якщо продовжувати бездумно застосовувати антибіотики, то до 2050 р. кількість смертей через хвороби, які колись легко лікувались антибіотиками, сягне 5–10 млн. в рік!!!

Серед АР бактерій – *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, гриби (*Candida*), віруси (грип), найпростіші (збудник малярії).

Глобальність проблеми антибіотикорезистентності мікроорганізмів полягає в наступному:

1. Глобальна загроза. Масштаби проблеми демонструє той факт, що *щорічно в країнах Європейського союзу понад 25 000 чоловік вмирають від інфекцій, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями.*

До 2050 року глобально очікується близько 2,5 млн. смертей щорічно внаслідок резистентності збудників.

Резистентність до антибіотиків не визнає будь-яких географічних або біологічних меж.

2. Важлива проблема безпеки продуктів тваринництва

У багатьох країнах антибіотики застосовуються у тварин навіть у значно більших масштабах, ніж у людей.

Надмірне застосування антибіотиків для сільськогосподарських тварин має серйозні наслідки для суспільної охорони здоров'я, оскільки сприяє появі

стійких до антибіотиків бактерій і генів резистентності, які можуть бути передані людям.

3. Вичерпано потенціал розробки нових груп антимікробних препаратів. Глобальна проблема полягає в тому, що якщо на початку минулого століття нові класи антибіотиків відкривалися один за одним, з 1987 року і до нашого часу науці не вдалося вивести жодного нового класу антибіотиків.

ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я) у звіті, опублікованому у 2014 р., заявила, що ця *небезпека вже проявляється в кожному регіоні світу і може негативно впливати на перспективи лікування інфекційних захворювань людей і тварин.*

Згідно інформації ВООЗ, *«перенесення» антибіотиків з їжі тваринного походження в організм людини назване однією з основних причин все більш частих проявів антибіотикорезистентності.* У багатьох країнах світу застосування антибіотиків на тваринах регулюється досить жорстко.

Використання антибіотиків в якості стимуляторів росту було одним з головних напрямків застосування їх в тваринництві. Додаткові прирости свиней після застосування тетрациклінових препаратів, біциліну і пеніцилінової маси, досягають 18–22%.

Більшість країн світу відмовляються від бездумного застосування антибіотиків і починають вивчати рівень кризи, моніторити появу антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, звітувати про них у відповідні організації (WHO, GLASS), відмовляти або контролювати застосування антибіотиків.

АМР – це одна з найбільших загроз для здоров'я і життя усіх живих організмів на планеті.

ХІД РОБОТИ

Як поживне середовище використовують **агар Мюллера-Хінтона**, розлитий у стерильні чашки Петрі з товщиною шару 4–4,5 мм, оскільки розмір і форма зони пригнічення росту залежать від глибини і рівномірності агарового шару.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків слід визначати тільки у чистій культурі. Для посіву на поживне середовище використовують стандартний бактеріальний інокулюм, який відповідає 0,5 за стандартом Мак-Фарланда і містить приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл (КУО - колонієутворююча одиниця бактерій).

Для виготовлення інокулюму 5–10 однорідних колоній або чисту культуру мікроорганізмів суспендують у 2 мл спеціального буферного розчину.

Для інокуляції чашок із поживним середовищем стандартний інокулюм в об'ємі 1–2 мл наносять піпеткою на поверхню середовища, рівномірно розподіляють по ньому похитуванням чашки, надлишок рідини видаляють піпеткою. Привідкриті чашки підсушують при кімнатній температурі

протягом 10–15 хв., а потім на них на однаковій відстані кладуть диски з антибіотиками.

На поверхню поживного середовища кладуть диски з антибіотиками. Аплікацію дисків роблять за допомогою стерильного пінцета або автоматичного диспенсора. Відстань від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15–20 мм, тобто на одній чашці діаметром 100 мм слід розміщувати не більше 6-9 дисків. Диски повинні рівномірно контактувати з поверхнею агару, для чого їх слід акуратно притиснути пінцетом.

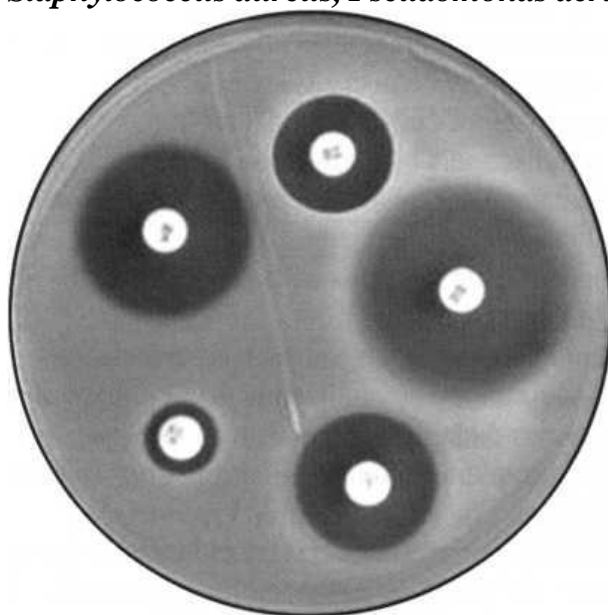
Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають у термостат догори дном і інкубують при температурі 35 °С протягом 18–24 год. (залежно від виду досліджуваного мікроорганізму). Збільшення інтервалу часу між нанесенням дисків на поверхню середовища і початком інкубації, а отже і початком росту досліджуваної культури, призводить до “переддифузії” антибіотика в агар і до збільшення діаметра зони пригнічення росту”.

Облік результатів. Результати враховують через 24 та 48 год. (рис. 2). Після інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45° (облік у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту виміряють з точністю до 1 мм (рис. 3). При вимірюванні зон затримки росту орієнтуються на зону повного пригнічення видимого росту.

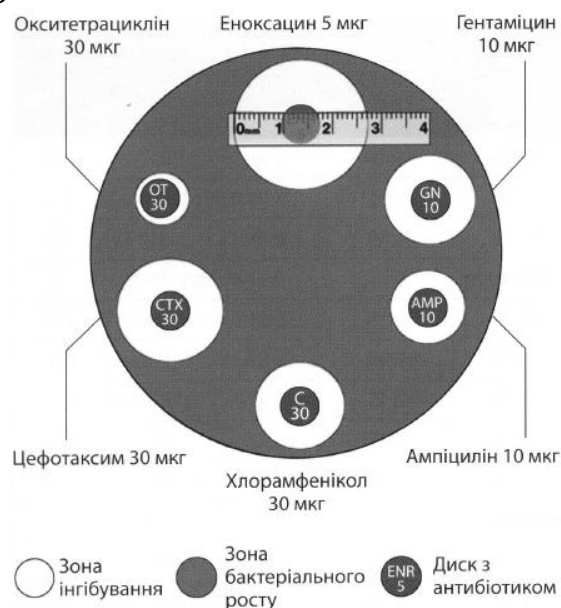
Не звертають увагу на дуже дрібні колонії, які виявляються в межах зони затримки росту тільки за особливих умов освітлення або збільшення.

Отримані дані зон затримки росту зіставляють з контрольними значеннями, представленими у спеціальних таблицях (табл. 3).

З метою стандартизації результатів досліджень паралельно у кожному досліді визначають чутливість тест-культури з відомою чутливістю до антибіотиків. ВООЗ рекомендує такі штами типових культур: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.



Мал. 2.
Визначення антибіотикочутливості за



Мал. 3. Визначення
антибіотикочутливості

диско-дифузійним методом

за диско-дифузійним методом.
Вимірювання зони затримки росту
навколо диска

Таблиця 3.

Мікроорганізми	Антибактеріальний препарат	Вміст у диску, мг	Діаметр зон пригнічення росту, мм			МІК, мкг/мл		
			Резистентні	Помірно стійкі	Чутливі	Резистентні	Помірно стійкі	Чутливі
Ентеробактерії	Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
	Ломефлоксацин	10	≤ 18	19–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 2
	Левофлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
	Гатифлоксацин	5	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 8	4	≤ 2

Контрольні питання:

1. До чого призводить нерегульоване застосування антибіотиків?
2. Що таке AMR? Як на Вашу думку можна вирішувати загрозу AMR?
3. Антибіотики це... дайте визначення.
4. Назвіть основні класи антибіотиків за біологічним походженням і за спектром біологічної дії (наведіть по одному прикладу з кожного класу)
5. Назвіть кілька груп антибіотиків широкого спектру дії. Назвіть кілька груп антибіотиків вузького спектру дії.
6. До якої групи належить бензилпеніцилін і чому?
7. В чому вимірюють біологічну активність антибіотиків?
8. Назвіть методи визначення чутливості до антибіотиків.
9. Суть методу серійних розведень визначення чутливості до АБП.
10. В чому суть диско-дифузійного методу визначення чутливості до АБП?
11. Яким бувають мікроорганізми за їх відношенням до антибіотиків?
12. Резистентні до антибіотика штами мікроорганізмів це... *продовжіть*.
13. Чутливі до антибіотика штами мікроорганізмів це ... *продовжіть*.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 15

Тема: ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ЛЮДИНИ. Частина 1. РЕАКЦІЇ З ФЕНОМЕНОМ АГЛЮТИНАЦІЇ.

Навчальна мета

Знати:

- Суть і місце застосування імунологічних методів в діагностиці інфекційних хвороб людини.
- За діагностики яких захворювань використовують реакцію аглютинації (РА), реакцію преципітації (РП) та реакцію імунодифузії (РІД).

Уміти:

- Поставити реакцію аглютинації на склі та розгорнуту РА в пробірках.

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, полістеролові планшети

для постановки розгорнутої РА, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, діагностичні типоспецифічні аглютинуючі колібактеріозні сироватки, колібактеріозний антиген (2-мільярдна суспензія вбитих формаліном мікробних клітин *E. coli*, 20-годинна культура *E. coli* на МПА, термостат, холодильник, дезінфекційний розчин.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Діагностика інфекційних хвороб людини ґрунтується на поєднанні низки методів, які можна об'єднати у дві групи, зокрема:

I. Прижиттєві (методи клінічного обстеження, епідеміологічного анамнезу та аналізу, лабораторні методи, які в свою чергу діляться на загальні (загальний аналіз крові, сечі та інших біоматеріалів) та спеціальні (виявлення, виділення та ідентифікація збудника інфекції у біоматеріалі);

II. Посмертні (методи патологоанатомічного, патологогістологічного та мікробіологічного дослідження секційного матеріалу).

Клінічні симптоми того чи іншого заразного захворювання, особливості епідемічного процесу, патологоанатомічні зміни ми будемо вивчати на заняттях із спеціальної вірусології та мікробіології.



Мал. 1. Схема застосування різних методів у лабораторній діагностиці інфекційних захворювань людини.

На попередніх лабораторних заняттях ми ознайомилися та засвоїли основні методи мікробіологічної діагностики бактеріальних інфекцій, зокрема, виявлення, виділення та ідентифікації збудників цих хвороб.

На цьому занятті ми розглянемо **імунологічні методи діагностики** інфекційних хвороб та їх місце у загальній схемі діагностики (див. мал.1).

У захисті організму від чужорідних агентів вирішальну роль відіграють імунологічні механізми, які здійснюються:

- **антитілами** (імуноглобулінами) та
- **імунокомпетентними клітинами** (лімфоцитами).

Основою імунологічних механізмів є те, що антитіла і лімфоцити, які утворились при потраплянні в організм антигену (вірусів, бактерій, тощо), реагують тільки з ним, а не з іншими антигенами.

Головною функцією антитіл є зв'язування антигену і його подальше видалення з організму.

Реакції між антигенами й антитілами можуть відбуватись в організмі (*in vivo*) і поза організмом (*in vitro*).

Реакція “антиген - антитіло” *in vitro* супроводжується виникненням кількох феноменів:

- **аглотинації,**
- **преципітації,**
- **лізису** та ін.

Аглотинація і преципітація характеризуються утворенням видимих агрегатів внаслідок об'єднання багатьох комплексів “антиген - антитіло”.

Лізис зумовлений зв'язуванням комплементу комплексом “антиген-антитіло” з наступним утворенням мембрано-атакуючого комплексу, який і руйнує клітину (бактеріальну чи клітину організму).

Антитіла, що беруть участь у реакції, відповідно до кожного феномена, називають **аглотинінами, преципітинами, лізинами**.

Імунологічні діагностичні реакції називаються ще **серологічними**, тому що антитіла переважно знаходяться в сироватці крові людей і тварин (**serum** - сироватка).

Усі серологічні реакції використовуються з двоюкою метою:

1) **для виявлення антитіл** у сироватці хворого за допомогою відомих стандартних антигенів-діагностикумів – для діагностики інфекційної хвороби (**сердіагностика**);

2) **для визначення невідомих антигенів** (бактерій, грибів, вірусів) за відомими стандартними сироватками-антитілами – для імунологічної ідентифікації збудників (**сероідентифікація**). При цьому невідомий компонент визначають за відомим компонентом. Відповідно до цього, в імунологічних реакціях завжди використовують один компонент **стандартний**, тобто **відомий**; інший, який виявляють, одержують від хворого, або невідомий ізолят мікроорганізму.

Стандартні імунні сироватки, або їх ще називають **діагностичними сироватками**, одержують шляхом гіперімунізації тварин відповідними

бактерійними чи вірусними антигенами, в результаті чого в їх крові з'являється значна кількість специфічних антитіл проти цих антигенів. При одержанні такої сироватки визначають її *титр* - найбільше розведення, в якому ще проявляється реакція з відповідним антигеном.

Усі імунологічні методи, що використовуються для діагностики інфекційних захворювань, можна поділити на три групи:

1. Тести, в яких *відбувається безпосередня взаємодія антигену з антитілом*. До цієї групи належать: імунофлуоресценція, радіоімунні та імуноензимні тести.

2. Тести, в яких *відбуваються різні фізико-хімічні реакції або беруть участь додаткові елементи* (носії, комплемент). До них належать: імунодифузія, імуноелектрофорез, пряма аглютинація (бактерійна), непряма аглютинація з використанням еритроцитів (пасивна гемаглютинація), латексу (латексна аглютинація) або інших часточок, таких як бентоніт, холестерол, деревне вугілля, коагулінація (використання білка *A Staphylococcus aureus*) і реакція зв'язування комплементу.

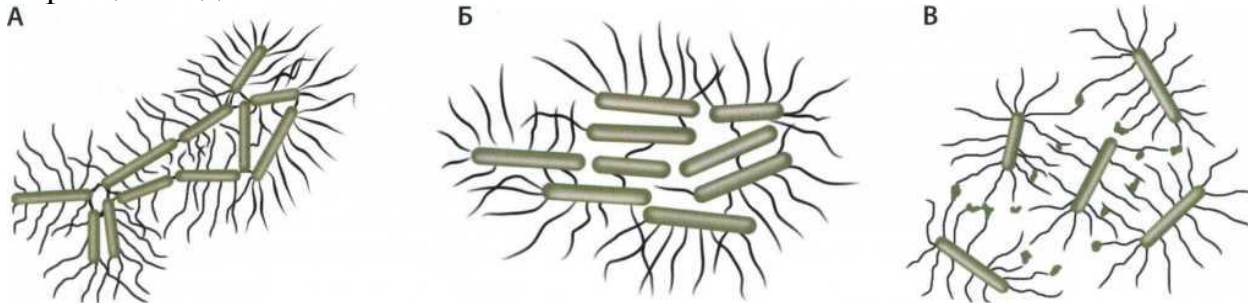
3. Тести, що *базуються на використанні певних біологічних ефектів*, наприклад, опсонізація, фагоцитоз, хемотаксис. До них належать: опсонофагоцитарна проба, хемотаксис, імуноадгезія, клітинна дегрануляція.

РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ

1.1. Реакція аглютинації (РА). *Аглютинація* – це імунологічна реакція між антитілами (*аглютинінами*) і антигенами (*аглютиногенами*), розміщеними на поверхні бактеріальної клітини. Ця реакція призводить до утворення специфічного комплексу “антиген - антитіло” (*аглютинат*).

В аглютинації беруть участь виключно поверхневі антигени, які доступні антитілам. Антигени, розміщені у внутрішніх структурах клітини, не беруть участі в цій реакції.

Механізм аглютинації полягає в тому, що під впливом іонів електроліту зменшується негативний поверхневий заряд бактерійних клітин, і вони можуть зблизитись на таку відстань, при якій виникає їх склеювання (Мал. 2). Реакцію проводять на склі, пластмасових пластинках, у пробірках, лунках полістиролових планшет. Ця реакція або її різновиди використовуються для діагностики більшості бактеріальних та вірусних інфекцій людини.



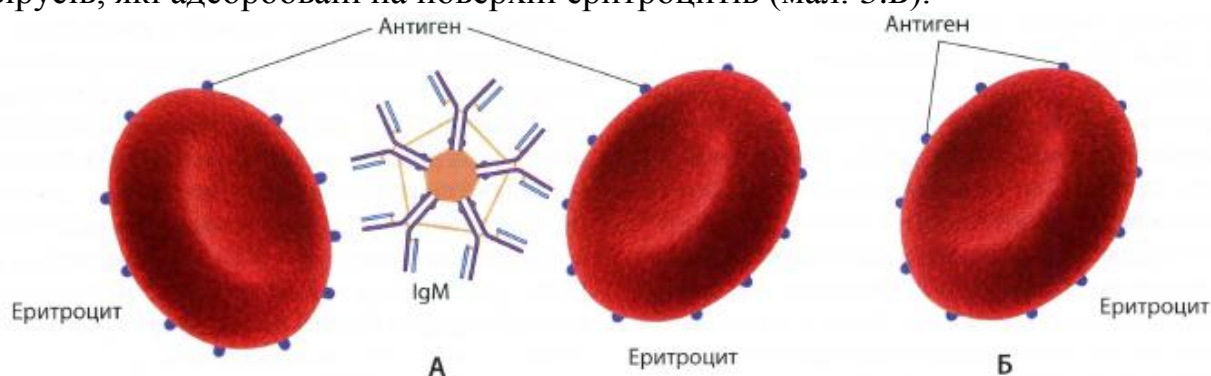
Мал. 2. Аглютинація бактерій:

А - О-аглютинація (соматична), дрібнозерниста; Б - Vi-аглютинація; В - H-аглютинація (джгутикова), крупно пластівцева.

1.2. Реакція непрямой аглютинації (РНА). За своєю чутливістю значно перевищує пряму реакцію аглютинації і дозволяє виявити мінімальну кількість антитіл або антигенів. Така висока чутливість досягається завдяки адсорбції антигенів або антитіл на спеціальних інертних частинках (латекс, бентоніт) або клітинах (еритроцити).

Якщо антигени адсорбовані на еритроцитах, така реакція називається **реакцією непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА, РПГА)**. Навантажені антигеном еритроцити склеюються в присутності специфічних антитіл і випадають у вигляді пухкого осаду з нерівним фестончастим краєм (перевернутої “парасольки”) на дні пробірок.

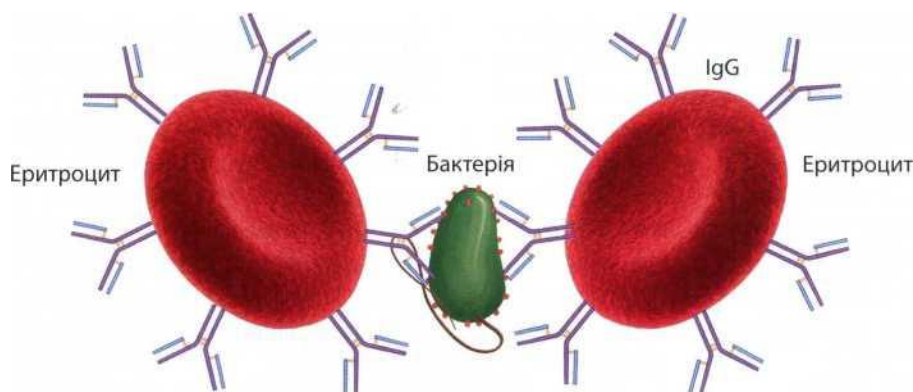
Антигени для РНГА називаються **еритроцитарними діагностикумами**. Це стандартизовані препарати, які складаються з антигенів бактерій або вірусів, які адсорбовані на поверхні еритроцитів (мал. 3.Б).



Мал. 3. А - схема реакції непрямой гемаглютинації; Б - еритроцитарний діагностикум.

За допомогою еритроцитарних діагностикумів можна виявляти в сироватці хворих антитіла до будь-якого збудника.

РНГА можна використовувати й для **серологічної ідентифікації збудника**. У цьому випадку як індикатор використовують еритроцити, навантажені відповідними антитілами. При додаванні до них культури збудника також виникає феномен гемаглютинації. На відміну від попередньої реакції, її називають **реакцією оберненої (зворотної) непрямой гемаглютинації (РО(з)НГА)** (мал. 4).



Мал. 4. Схема оберненої (зворотної) непрямой гемаглютинації

Реакція непрямой гемаглютинації широко використовується у діагностиці вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних інфекцій.

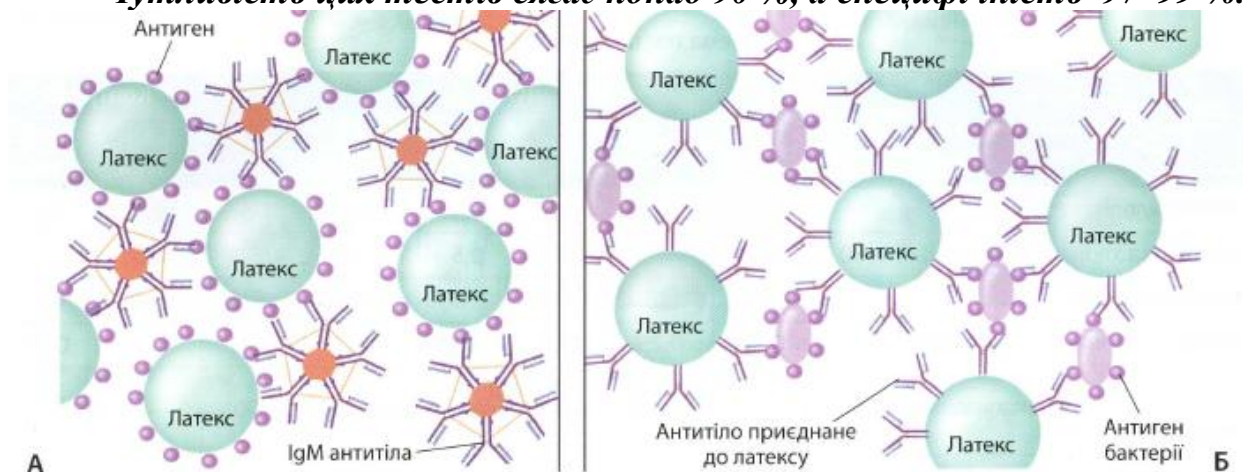
РНГА відноситься до найбільш чутливих реакцій порівняно з аглютинацією, преципітацією і зв'язуванням комплементу.

1.3. Реакція аглютинації латексу (РАЛ) за своїм механізмом аналогічна РНГА. Для постановки РАЛ використовують сенсibilізовані (навантажені) частинки полістиролового латексу діаметром 0,5–1,2 мкм, які в присутності гомологічного імунологічного реагенту (антигену або антитіла) склеюються (мал. 5). Ця реакція відбувається досить швидко (2–7) хв., що дозволяє застосовувати її як **експрес-метод** виявлення антигенів і антитіл.

Навантажені антитілами часточки латексу широко використовують для виявлення антигенів вірусів і бактерій. Наприклад, антигени стрептококів у мазках із зівя можна виявити вже через 10–60 хв.

Збудників, які викликають запалення мозкових оболонок (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *C. neoformans*), можна безпосередньо в матеріалі виявити протягом 15 хв. Латекс-аглютинація широко використовується для ідентифікації антигенів ротавірусів, герпесвірусів тощо.

Чутливість цих тестів сягає понад 90 %, а специфічність 97–99 %.

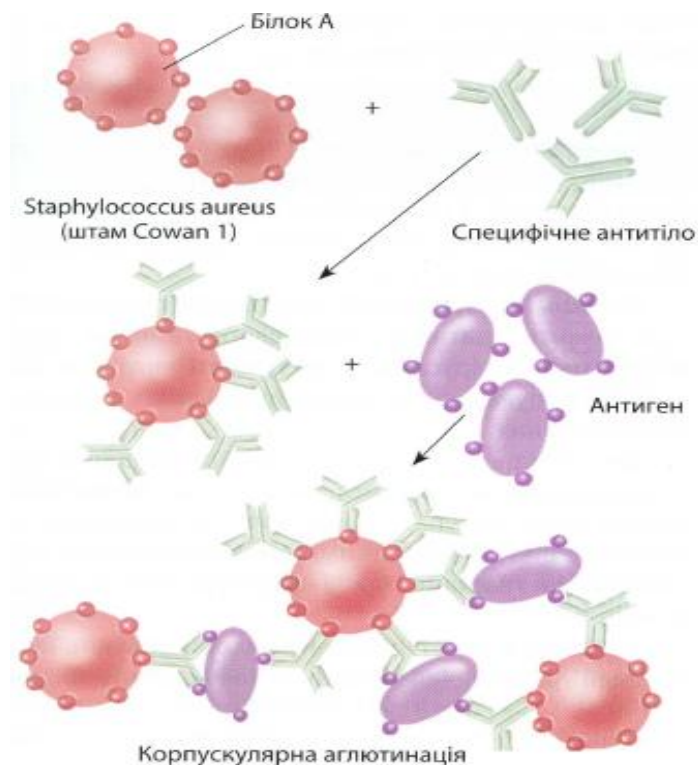


Мал. 5. Схема реакції аглютинації латексу:

А - визначення невідомих антитіл за відомим антигеном на поверхні латексу;

Б - визначення виду бактерії за відомими антитілами на поверхні латексної часточки.

1.4. Реакція коагутинації (РКоА). Для постановки РКоА використовують золотисті стафілококи (штам *Cowan 1*). У клітинній стінці цих мікроорганізмів міститься **білок А**, який має значну спорідненість до Fc-фрагмента IgG людини і кроля. Тому молекули IgG після адсорбції на стафілококах, що мають білок А, орієнтовані в оточуюче середовище своїми вільними Fab-фрагментами, в яких знаходиться активні центри антитіла (мал. б).



Мал. 6. Схема реакції коаглютинації.

Цим стафілококові діагностикуми відрізняються від інших антитільних препаратів, у яких носії (еритроцити, бентоніт, латекс) не мають специфічних рецепторів для Fc-фрагмента IgG. На таких інертних частинках молекули імуноглобулінів адсорбуються будь-якою ділянкою, без суворої просторової конфігурації, а тому й чутливість їх є нижчою.

Реакція КОА широко використовується для виявлення антигенів різних стрептококів, *N. meningitidis* і *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, шигел, сальмонел тощо.

Метод з успіхом використовується для ідентифікації низки вірусів зокрема грипу, параміксовірусів, ротавірусів, вірусів гепатиту В тощо.

1.5. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) набула широкого розповсюдження для діагностики вірусних інфекцій. Її можна застосовувати :

- для серологічної ідентифікації вірусів, так і
- для серологічної діагностики.

Гемаглютинація – це феномен склеювання еритроцитів під впливом вірусів. Деякі віруси мають на своїй оболонці рецептори, комплементарні рецепторам поверхні еритроцитів певних тварин, і при додаванні до суспензії вірусів еритроцитів, останні склеюються. Наприклад, вірус грипу аглютинують еритроцити курей, вірус кліщового енцефаліту – еритроцити гусей. Таким чином, у випадку гемаглютинації можна зробити висновок про наявність вірусу в досліджуваному матеріалі. **Проте ця реакція не імунологічна**, тому що в ній не бере участі основна система – антиген і антитіло.

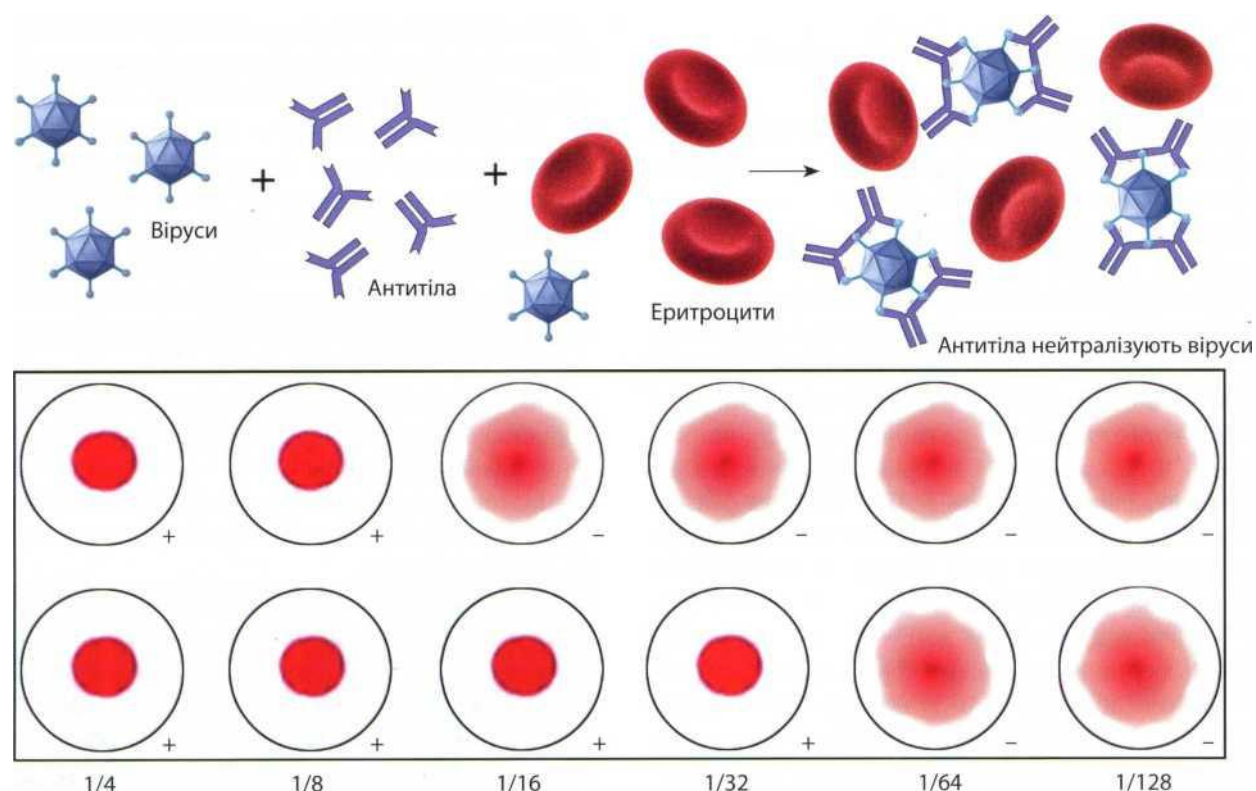
У той же час РГГА (**реакція гальмування гемаглютинації**) належить до серологічних реакцій імунітету. У РГГА специфічні противірусні антитіла,

взаємодіючи з вірусом і блокуючи поверхневі рецептори, позбавляють його здатності склеювати еритроцити (мал. 7).

Якщо досліджувана сироватка містить антитіла до даного вірусу, вона його нейтралізує, і феномен гемаглютинації еритроцитів не настає (*позитивна РГГА*).

Для постановки РГГА в лунках полістиролових планшет готують послідовні розведення сироватки в об'ємі 0,25 мл і змішують їх з такою ж кількістю вірусомісного матеріалу. Суміш ставлять у термостат при 37 °С на 30 хв., після чого в кожен лунку додають по 0,5 мл 1–2 % зависі еритроцитів.

Обов'язкові два контролю: контроль сироватки і контроль вірусу. Облік проводять після повторного 30-хвилинного перебування реагентів у термостаті.



Мал. 7. Схема реакції гальмування гемаглютинації

ХІД РОБОТИ.

Завдання 1. Постановка РА.

Існує дві різновидності постановки реакції:

- орієнтовна аглютинація на склі (реакція сероідентифікації) й
- розгорнута аглютинація в пробірках (серодіагностики).

Реакція аглютинації на склі. На предметне скло наносять роздільно 2 краплі специфічної імунної сироватки і краплю ізотонічного розчину хлориду натрію. В краплю ізотонічного розчину бактеріологічною петлею вносять досліджувану культуру й ретельно її емульгують. Після цього петлю зафламбовують і нову набирають культуру і вносять її у краплю сироватки й ретельно її емульгують. Крапля сироватки, куди не вносили культури, є

контролем сироватки.

Реакція проходить досить швидко при кімнатній температурі. Якщо контрольна крапля сироватки залишається прозорою, в краплі ізотонічного розчину - рівномірне помутніння, а в краплі, де культура змішана з сироваткою, з'являються зернистість або пластівці, реакція вважається позитивною.

Щоб остаточно підтвердити або відкинути попередній висновок, ставлять **розгорнуту реакцію аглютинації** (табл. 1). Діагностичні аглютинуючі сироватки, які одержані шляхом гіперімунізації тварин, мають високий титр антитіл (1:20 000-1:40 000 і вище).

Таблиця 1. **Постановка реакції аглютинації для ідентифікації *E. coli***

Компоненти, мл	Пробірки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	Сиро- затоки	Анти- гену
0,85 % розчин хлориду натрію	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
ОК-колі сироватка в розведенні 1:50	1,0-»	1,0-»	1,0-»	1,0-»	1,0-»	1,0↓	1,0	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Суспензія <i>E. coli</i> (краплі)	2	2	2	2	2	2	-	2
Термостат 37 °С - 2 год.								
Результат								

Спочатку готують робоче розведення сироватки (1:50), із якого надалі одержують двократні розведення від 1:100 до титру, вказаного на ампулі з сироваткою. Для цього в ряд пробірок розливають по 1 мл ізотонічного розчину, потім у першу пробірку вносять такий же об'єм сироватки робочого розведення і після перемішування 1 мл переносять у другу, звідти в третю і т.д., а в передостанню пробірку додають 1 мл сироватки робочого розведення. В останню пробірку сироватку не вносять. Потім у всі пробірки додають по дві краплі досліджуваної культури.

Передостання – контроль сироватки, остання – контроль антигену. Після струшування штатив із пробірками поміщають у термостат при 37°С на дві години і згодом залишають при кімнатній температурі до наступного дня. Після цього проводять облік результатів. Якщо реакція виявилась позитивною до титру або до половини титру діагностичної сироватки, вона вважається достовірною.

Завдання 2. Постановка РНГА. У ряд лунок полістиролової планшети наливають по 0,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію, потім у першу лунку вносять 0,5 мл сироватки хворого (1:50) і одержують розведення сироватки 1:100. З першої лунки переносять 0,5 мл у другу, одержують розведення 1:200, з другої в третю і т.д., крім останньої. З передостанньої лунки 0,5 мл виливають, потім в усі лунки додають по 0,25 мл відповідного

еритроцитарного діагностикуму (табл. 2). Планшети поміщають у термостат при 37 °С на 2–3 год. У лунках із сироваткою при позитивній реакції осад матиме нерівні краї і покриватиме майже всю лунку.

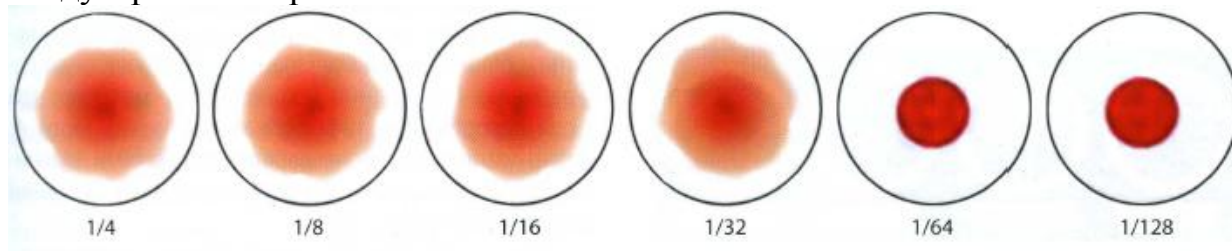
Таблиця 2. Схеми постановки РНГА

Компоненти, мл	Лунки						Контролі	
	1	2	3	4	5	6	Сироватки	Антигену
Розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка хворого в розведенні 1:50	0,5 →→→	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5↓	0,5	-
Розведення сироватки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:100	-
Еритроцитарний діагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25
Термостат 37 °С – 2–3 год								
Результат								

Інтенсивність РНГА оцінюють за чотириплюсовою системою:

- якщо майже всі еритроцити аглютинувались і утворився осад, який нагадує перевернуту “парасольку”, реакція позитивна (++++, +++);
- не всі еритроцити аглютинувались, мереживоподібний осад меншого розміру (++);
- більшість еритроцитів не склеїлись і утворюють у центрі дна лунки компактний диск з нерівними краями - реакція слабопозитивна (+) (мал. 5).

Результат реакції оцінюють за виглядом осаду еритроцитів, починаючи з контролю, де вони повинні осісти на дно у вигляді круглого компактного осаду з рівними краями.



Мал. 8. Результат постановки РНГА

Контрольні питання:

1. Як можна поділити методи діагностики інфекційних хвороб людини.
2. Опишіть схему застосування різних методів у діагностиці інфекційних захворювань людини.
3. Назвіть та охарактеризуйте зажиттєві методи діагностики ІХ.
4. Назвіть та охарактеризуйте зажиттєві методи діагностики ІХ.
5. Які системи є основою всіх імунологічних механізмів?
6. Де може відбуватися реакція “антиген - антитіло”?
7. Якими феноменами визначається реакція “антиген - антитіло” in vitro?
8. Як називаються у кожному випадку (аглютинації, преципітації, лізису) антитіла?

9. З якою двоякою метою застосовуються серологічні реакції?
10. Що таке стандартні імунні сироватки, титр імунної сироватки?
11. На які групи діляться імунологічні методи діагностики інфекційних хвороб?
12. В чому полягає суть РНГА?
13. В чому полягає суть реакції коагулінації?
14. В чому полягає суть РГГА?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 16

Тема: ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ЛЮДИНИ. Частина 2. РЕАКЦІЇ З ФЕНОМЕНОМ ПРЕЦИПІТАЦІЇ.

Навчальна мета

Знати:

- Суть і місце застосування реакцій з феноменом преципітації та лізису в діагностиці інфекційних хвороб людини.
- За діагностики яких захворювань використовують реакцію преципітації (РП), реакцію імунодифузії (РІД) та реакцію зв'язування комплементу (РЗК).

Уміти:

- Поставити РІД за діагностики Т-лейкозу.

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, полістеролові планшети для постановки розгорнутої РА, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, діагностичну преципітуючу сибіркову сироватку, стандартний сибірковий антиген, 20-годинна культура живого *вакцинного штаму* збудника сибірки штаму 55) на МПА і МПБ, термостат, холодильник, дезінфекційний розчин.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

3. РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ (РП).

За своєю сутністю реакція преципітації аналогічна реакції аглютінації. **В основі механізму РП** лежить утворення і випадання в осад комплексів “антиген - антитіло”. Проте вона відрізняється за характером антигенів: в реакції аглютінації вони корпускулярні (цілі клітини), а в реакції преципітації - молекулярні, в розчинному стані. **Антигенами** можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.

Феномен преципітації полягає в тому, що антитіла (преципітини), з'єднуючись із розчинними антигенами (преципітиногенами), зумовлюють утворення осаду (преципітату) (мал. 12). За титр реакції приймають найбільше розведення антигену, яке дає позитивний результат.

Реакція преципітації значно чутливіша від реакції аглютінації й дозволяє виявити антиген у дуже малих кількостях. Її можна проводити в рідкому і щільному середовищах. **Обов'язковою умовою постановки РП** в рідкому середовищі є **прозорість компонентів**.

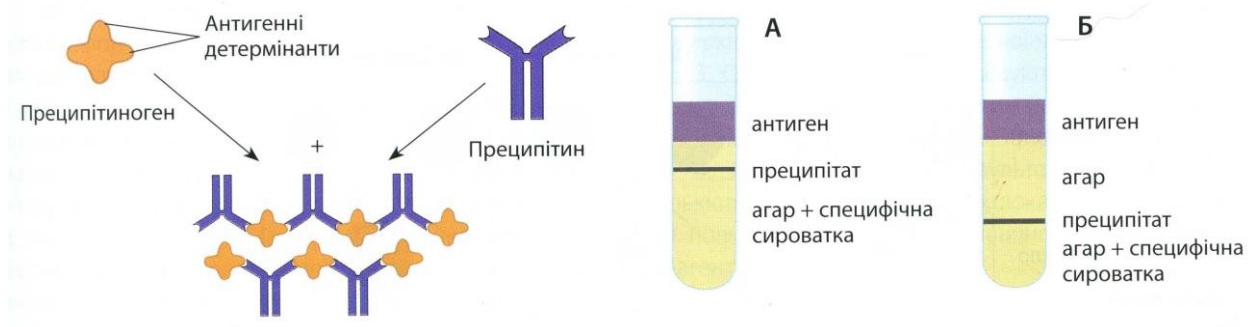
Реакція відбувається при змішуванні розчинів антигену й антитіла або

нашаруванні одного компонента на інший. В останньому випадку на межі двох реагентів утворюється преципітат у вигляді кільця.

Для аналізу складу антигенів застосовують реакцію преципітації в гелі. Розрізняють просту і подвійну дифузію в гелі.

РЕАКЦІЇ ІМУНОДИФУЗІЇ (РІД).

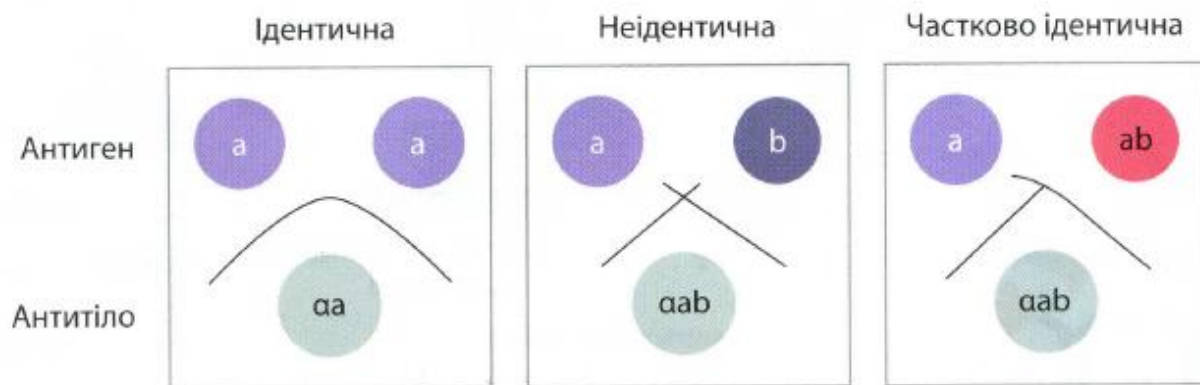
4.1. Проста імунодифузія (реакція Удена). Агаровий гель, який містить преципітуючу сироватку, поміщають у вузькі пробірки і зверху нашаровують розчин антигену. Дифундуючи в гель, антиген зв'язується з відповідними антитілами, утворюючи мутні лінії преципітації (мал. 1.А).



Мал. 1. Схема реакції преципітації та реакція імунодифузії.

4.2. Подвійна імунодифузія за Оклі і Фулторпом. На відміну від попереднього методу, у подвійній імунодифузії реагенти розділені шаром нейтрального гелю, який не містить реагентів. На поверхню гелю, змішаного з специфічною сироваткою, вносять шар нейтрального гелю, після застигання якого нашаровують антиген. Дифундуючи назустріч одне одному, антиген і антитіла зустрічаються в шарі нейтрального гелю та утворюють лінії преципітації (мал. 1.Б).

4.3. Подвійна радіальна імунодифузія за Оухтерлоні. В агарі, який розлитий тонким шаром в чашках Петрі або на предметних скельцях, за допомогою спеціальних штампів роблять круглі лунки на однаковій відстані одна від одної (4–10 мм). У лунки вносять досліджувану сироватку і розчин антигену в різних розведеннях або різні антигени. Із лунок антигени й антитіла дифундують назустріч один одному, і в точці їх оптимального співвідношення утворюється преципітат у вигляді тоненьких білих ліній.

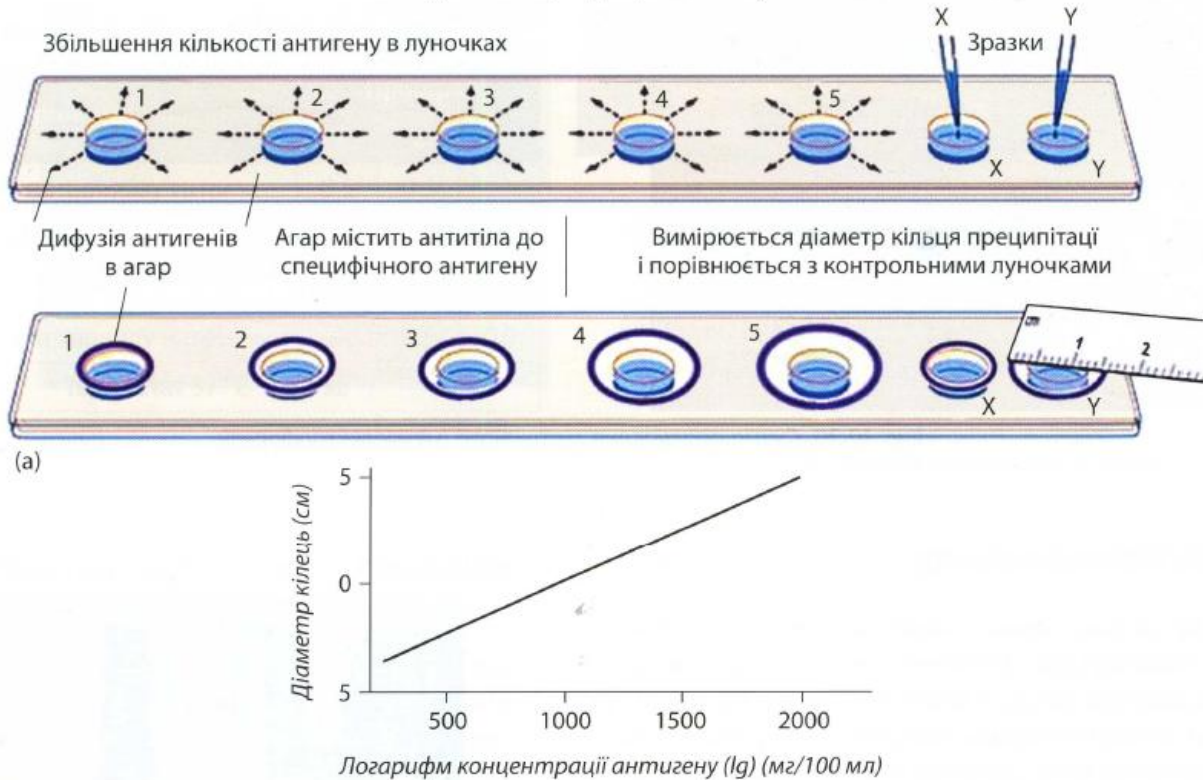


Мал. 2. Варіанти результатів реакції імунодифузії за Оухтерлоні.

4.4. Проста радіальна імунодифузія за Манчіні (мал. 3) є однією із різновидностей реакції преципітації в гелі. За її допомогою визначають концентрацію імуноглобулінів у сироватці крові, а також специфічних антитіл до того чи іншого збудника інфекції.

РІД використовують в діагностиці низки вірусних захворювань таких як СНІД, Т-лейкоз (білокрів'я) та деякі інші.

Невідома концентрація антигену



Мал. 3. Реакція радіальної імунодифузії за Манчіні

4.5. Зустрічний імуноелектрофорез. При діагностиці різноманітних бактеріальних і вірусних інфекцій досить часто використовують метод зустрічного електрофорезу, результати якого можна одержати вже через 1-2 години після надходження матеріалу в лабораторію. Будучи порівняно простим у методичному відношенні, він, як і всі імунодифузійні методи, відзначається дуже високою специфічністю.

Імуноелектрофорез є поєднанням двох методів – електрофорезу в гелі і наступної після нього подвійної імунодифузії.

Для проведення реакції імуноелектрофорезу використовують скляні пластинки, предметні скельця, на які наносять тонкий шар агару або агарози. Спочатку антигени розміщують у центрі пластинки і розділяють їх в електричному полі. Потім у канавку, зроблену в агарі паралельно до лінії розділу антигенів, вносять специфічну сироватку. Дифундуючи назустріч один одному, антигени й антитіла у місці контакту утворюють дуги преципітації.

Феномен преципітації широко використовується в медичній практиці. Зокрема, в судово-медичній експертизі його застосовують для визначення видової належності крові. За допомогою специфічних преципітуючих сироваток

проти білка людини, різних тварин і птахів можна встановити, якому виду належить виявлена кров. Таким же чином визначають можливу фальсифікацію продуктів (м'ясо, мед). Ця реакція застосовується для діагностики епідемічного цереброспінального менінгіту, чуми, дизентерії тощо.

Особливе значення має **реакція термопреципітації Асколі**, яку використовують для визначення інфікованості збудником сибірки продуктів і матеріалів тваринного походження (шкіра, хутро, щетина).

Суть серологічної діагностики Т-лейкозу полягає у виявленні в сироватці крові за допомогою реакції імунодифузії (РІД) преципітуючих антитіл проти антигенів рнавірусу.

Специфічні антиген та антитіло, розташовані на незначеній відстані один від одного в агаровому гелі, дифундують та утворюють у ділянці їх зустрічі преципітат у вигляді білих ліній, які добре видно неозброєним оком.

У випадку невідповідності або антигену до антитіла бо ж відсутності антитіла у досліджуваній сироватці крові лінії преципітації не утворюються.

Реакцію ставлять на предметних скельцях або чашках Петрі. Реакція повинна проходити за температури 18–27°C. Читаємо через 48–72 год.

Результат реакції може бути оцінений як позитивний або негативний.

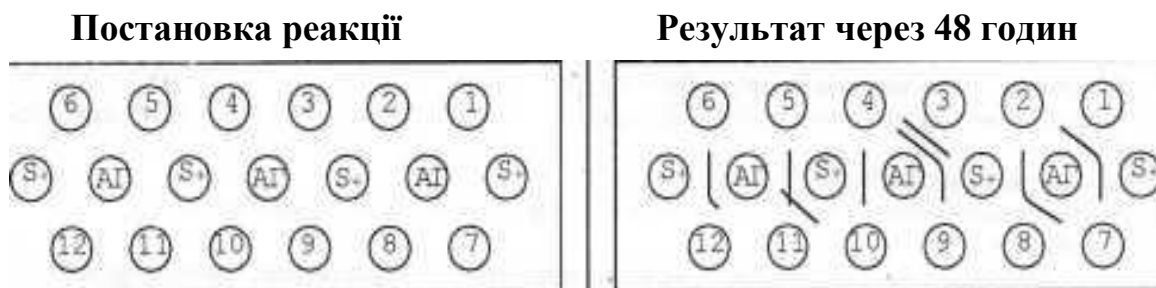


Рис. 1. Схема заповнення

лунок

1-12 – сироватки, що випробовуються (досліджувана);

S+ – позитивна контрольна сироватка;

AG – антиген вірусу лейкозу

Рис. 2. Результат РІД

1, 8 – позитивні сироватки;

3 – позитивна з подвійною лінією;

2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 – негативні сироватки;

12 – слабопозитивна сироватка

11 – негативна сироватка (не специфічна лінія преципітації)

Позитивна реакція – якщо дослідна сироватка утворює з антигеном специфічну чітку лінію преципітації, ідентичну до контрольної позитивної сироватки.

Негативна – якщо контрольна лінія преципітації продовжується до лунки з досліджуваною сироваткою без загинів або з невеликим згином в сторону лунки з контрольною сироваткою.

Сумнівно реагуючою вважають сироватку, якщо контрольна лінія преципітації погано продивляється. В цьому випадку проводять повторне взяття крові для дослідження сироватки.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Приготування хімічних реактивів та реагентів

Агаро-сольову суміш відважуємо у потрібній кількості, переносимо до вимірювальної колби, доливаємо дистильованою водою до кількості, що зазначена на етикетці, перемішуємо до отримання однорідної суспензії. Колбу з суспензією поміщаємо у киплячу водяну баню, та перемішуючи, витримуємо 50–60 хв. до утворення прозорого однорідного агару-гелю.

Завдання 2. Хід дослідження матеріалу.

1. Чашки Петрі розміщують на строго горизонтальній поверхні. Розплавлений 0,8 % агар-гель розливають у чашки Петрі по 15 мл (або по 2–3 мл на предметні скельця) за допомогою вимірювальної піпетки. Після витримання чашок Петрі при кімнатній температурі 15–20 хв. за допомогою штамп робимо лунки, не допускаючи тріщин між ними та відшаровування агару від дна чашки

2. Поетапно закапуємо досліджувану і контрольні сироватки, антиген до краю меніска (згідно схем інструкції).

3. Підготовлені чашки розміщуємо на підставці стерилізатора, на дно якого налито шар води 1–2 см, але так щоб вода не торкалась до чашок; предметні скельця поміщаємо у вологу камеру при температурі 18–27°C.

6. Чашки Петрі продивляємося в проникаючому світлі і оцінюємо при наявності чіткої контрольної лінії преципітації, між антигеном і специфічною сироваткою і відсутністю такої з від'ємною контрольною сироваткою.

Контрольні питання:

1. В чому полягає феномен преципітації?
2. Як називаються антигени, що стимулюють утворення в організмі преципітинів?
3. Суть реакції простої імунодифузії (реакція Удена).
4. Суть подвійної імунодифузії за Оклі.
5. Суть радіальної імунодифузії за Оухтерлоні.
6. Суть простої радіальної імунодифузії за Манчіні.
7. Яке місце у структурі методів лабораторної діагностики інфекційних хвороб займає реакція преципітації?
8. Якими реакціями проявляється *in vitro* взаємодія антигену та антитіл?
9. Дайте визначення реакції преципітації.
10. Для діагностики яких вірусних хвороб застосовують РІД?
11. В чому полягає суть РІД.
12. Які реактиви і яке обладнання потрібне для постановки РІД?
13. Опишіть хід постановки РІД.
14. Охарактеризуйте позитивну реакцію преципітації.
15. Охарактеризуйте негативну реакцію преципітації.
16. Охарактеризуйте сумнівну реакцію преципітації.

**Тема: ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ
ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ЛЮДИНИ. Частина 3.
РЕАКЦІЇ З ФЕНОМЕНОМ ЛІЗИСУ.**

Навчальна мета:

Знати:

- Суть і місце застосування реакції зв'язування комплементу (РЗК)

Уміти:

- Поставити реакцію гемолізу .

Матеріали і обладнання: термостат або водяна баня, 3 % суспензія еритроцитів барана, гемолізін, комплемент, стерильні пробірки діаметром 14 мм, стерильний фізрозчин, піпетки.

**ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА
РЕАКЦІЇ ЛІЗИСУ**

1. Реакція лізису.

Реакції з використанням феномену лізису мають широке застосування у діагностиці інфекційних хвороб людини. Розрізняють декілька реакцій лізису: бактеріоліз, гемоліз, цитоліз. В свою чергу на використанні феномену гемолізу розроблені такі діагностичні реакції як:

- Реакція лізису
- Реакція радіального гемолізу
- Реакція зв'язування комплементу (РЗК).

1. Для реакції лізису необхідні такі компоненти:

- антиген,
- антитіло
- комплемент.

Антигеном можуть бути мікроорганізми, еритроцити або інші клітини. Як *антитіло (лізин)* використовують специфічну сироватку або сироватку хворого. Залежно від того, проти яких клітин спрямована дія лізинів, вони мають свої назви:

- ✓ проти бактерій – *бактеріолізину*,
- ✓ спірохет – *спірохетолізину*,
- ✓ еритроцитів – *гемолізину*,
- ✓ проти інших клітин організму – *цитолізину*.

Комплемент при утворенні комплексу “клітина (антиген) – лізин (антитіло)”, зв'язується з цим комплексом, активується за класичним шляхом і викликає лізис (розчинення) клітини.

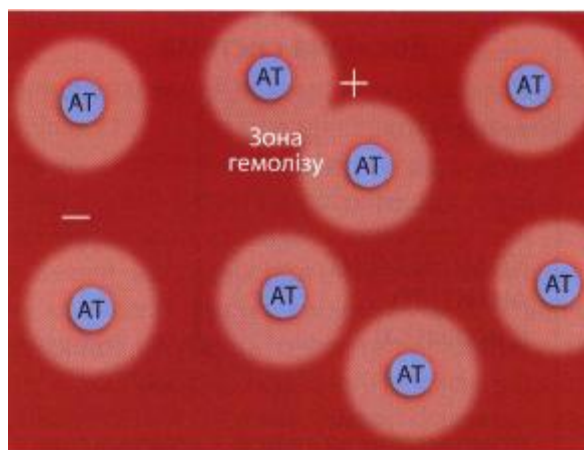
Без комплементу лізис клітини неможливий.

2. Реакція радіального гемолізу.

Реакцію ставлять *в лунках агарового гелю, що містить еритроцити барана і комплемент*. Після внесення в лунки гемолітичної сироватки (антитіл проти еритроцитів барана) навколо них, в результаті радіальної дифузії антитіл, утворюється зона гемолізу. Таким чином можна визначити

активність комплементу і гемолітичної сироватки, а також *антитіла в сироватці крові* у хворих на *грип, краснуху, кліщовий енцефаліт*. Для цього попередньо навантажені відповідними вірусними антигенами еритроцити разом із комплементом вносять у гель. Після його застигання роблять лунки, в які додають сироватку крові хворого. Протівірусні антитіла взаємодіють з вірусними антигенами, адсорбованими на еритроцитах, після чого до цього комплексу приєднуються компоненти комплементу, викликаючи гемоліз.

Реакція радіального гемолізу еритроцитів характеризується простотою постановки, нечутливістю до сироваткових інгібіторів, дозволяє титрувати сироватки крові за діаметром зони гемолізу, не вдаючись до серійних розведень (мал. 1).



3. Реакція зв'язування комплементу.

Характерною відмінністю РЗК від реакції аглютинації й преципітації є участь в ній, крім антигену й антитіла, *інгредієнтів реакції гемолізу*, яка виступає *у вигляді індикаторної системи*.

Взаємодія антигену з антитілом не завжди зумовлює візуальні зміни, які дозволяють визначити результат реакції. Проте відомо, що при утворенні комплексу “антиген + антитіло” до нього завжди приєднується комплемент. Якщо антиген і антитіло не відповідають один одному, комплемент не зв'язується, залишаючись вільним у системі. При додаванні комплексу “еритроцити барана + гемолізину” вільний комплемент, зв'язуючись з ним, викликає гемоліз еритроцитів. Цей принцип і покладено в основу РЗК. При відповідності антигена антитілу з ним зв'язується комплемент. Щоб переконатись в цьому, додають еритроцити барана й гемолітичну сироватку.

Цей принцип і покладено в основу РЗК.

При відсутності гемолізу роблять висновок, що **реакція позитивна**, *при наявності гемолізу* - **реакція негативна** (рис. 2).

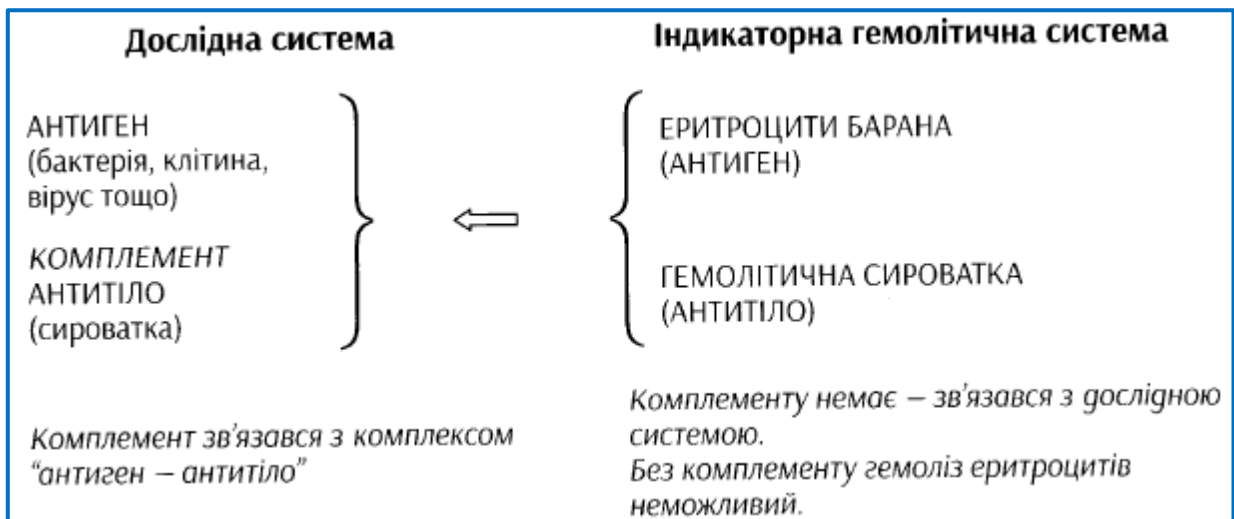


Рис. 2. Схема реакції зв'язування комплекменту.

Для серологічної ідентифікації використовують стандартні діагностичні сироватки з відомим титром антитіл.

Для серологічної діагностики досліджувану сироватку прогривають при 56 °С протягом 30 хв., для інактивації власного комплекменту, а потім готують ряд послідовних розведень для визначення титру антитіл.

Антигенами можуть бути бактеріальні клітини, віруси, білкові або полісахаридні речовини, екстракти органів і тканин.

Комплемент представлено свіжою або ліофілізованою сироваткою гвінейської свинки, яку розводять 1:10.

Гемолітичну сироватку використовують у потрібному титрі, а з *еритроцитів барана* готують 3 % суспензію в ізотонічному розчині хлориду натрію.

Постановку РЗК будемо ставити за лабораторної діагностики бруцельозу. РЗК застосовують для діагностики *сифілісу, бореліозу, содоку, кампілобактеріозу та деяких інших бактеріальних і вірусних інфекцій.*

ХІД РОБОТИ.

1. Постановка реакції гемолізу.

Компонентами реакції є:

- ✓ антиген (еритроцити барана),
- ✓ антитіло (гемолітична сироватка),
- ✓ комплекмент (свіжа сироватка гвінейської свинки або стандартний сухий комплекмент).

Для одержання еритроцитів у барана беруть кров із яремної вени у стерильний флакон із скляними кульками й енергійно струшують, щоб нитки фібрину намотались на кульках і кров не згорнулася. Потім ізотонічним розчином хлориду натрію відмивають еритроцити від плазми. Для цього кров центрифугують 10 хв. при 2000 об./хв. Плазму відсмоктують піпеткою, а до осаду еритроцитів знову додають ізотонічний розчин, ретельно перемішують і центрифугують. Таке промивання еритроцитів роблять тричі. Рідину обережно відсмоктують, а з осаду еритроцитів готують 3 % суспензію в

ізотонічному розчині.

Гемолітичну сироватку (гемолізін) одержують шляхом імунізації кролів еритроцитами барана. Після циклу імунізації у них беруть кров, з якої готують сироватку, де містяться антитіла проти еритроцитів. Для інактивації комплементу, що знаходиться в ній, її прогрівають при 56 °С протягом 30 хв. і визначають титр гемолізінів.

Для постановки реакції **гемолітичну сироватку** беруть у потрібному титрі. Наприклад, якщо титр сироватки 1:1800, то її розводять до 1: 600.

Комплемент беруть у розведенні 1:10.

Схема постановки реакції гемолізу

Компоненти, мл	Пробірки		
	1	2	3
Гемолізін у потрібному титрі	0,5	0,5	-
3 % суспензія еритроцитів барана	0,5	0,5	0,5
Комплемент 1 : 10	0,5	-	0,5
0,85 % розчин хлориду натрію	-	0,5	0,5
Термостат 37 °С – 60 хв			
Результат (гемоліз)	+	-	-

Реакція вважається позитивною, якщо всі еритроцити лізувались (мал. 1.). Рідина червоного кольору й абсолютно прозора. Ніякого осаду на дні пробірки немає.

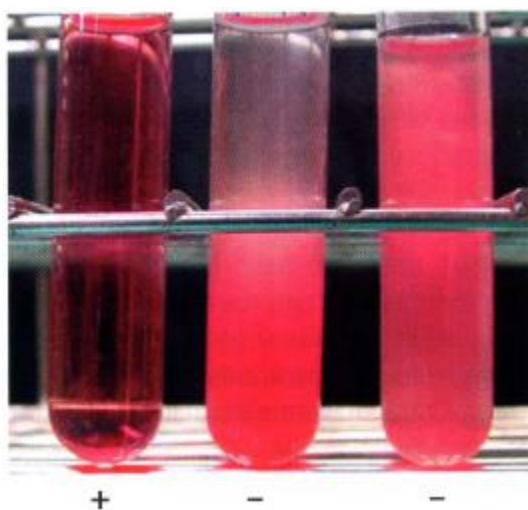


Рис. 1. Реакція гемолізу

Контрольні питання:

1. Які види реакцій лізису розрізняють?
2. Які компоненти необхідні для постановки реакції лізису?
3. Яку роль відграє комплемент в реакціях лізису?
4. Чим характеризується і який принцип реакції радіального гемолізу?
5. Антитіла до збудників яких хвороб можна визначити з допомогою РРГ?

6. Який принцип покладено в основі РЗК?
7. Як візуально оцінюється позитивна РЗК?
8. Які захворювання діагностують з допомогою РЗК?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 18

Тема: ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ЛЮДИНИ. ЧАСТИНА 4. МЕТОД ФЛУОРЕСЦЮЮЧИХ АНТИТІЛ. (МФА), ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА).

РЕАКЦІЯ ІМУОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ (РІФ) або МЕТОД ФЛУОРЕСЦЮЮЧИХ АНТИТІЛ (МФА)

Позитивні результати реакцій аглютинації, преципітації, лізису, РЗК й інших спостерігають *тільки за оптимального співвідношення реагентів*. Якщо ця умова не виконується, зафіксувати видимий позитивний результат не завжди вдається.

Чутливість імунологічних реакцій значно зростає завдяки використанню мічених реагентів, наприклад, антитіл, кон'югованих з флуорохромом. При зв'язуванні таких імуноглобулінів з антигеном в люмінесцентному мікроскопі спостерігають світіння об'єктів (бактерій, вірусів, клітин), покритих міченими антитілами.

Імунофлуоресцентним методом можна також визначати антитіла в сироватці хворого, на поверхні клітин і тканин. У цьому випадку використовують мічені флуоресцеїном сироватки проти глобулінів людини (антиглобулінові), якими обробляють **комплекс "антиген - антитіло"**. Внаслідок цього цей комплекс під дією ультрафіолетових променів починає світитися зеленим світлом.

У першому випадку говорять про **прямий**, у другому - про **непрямий** імунофлуоресцентний метод (рис. 3).

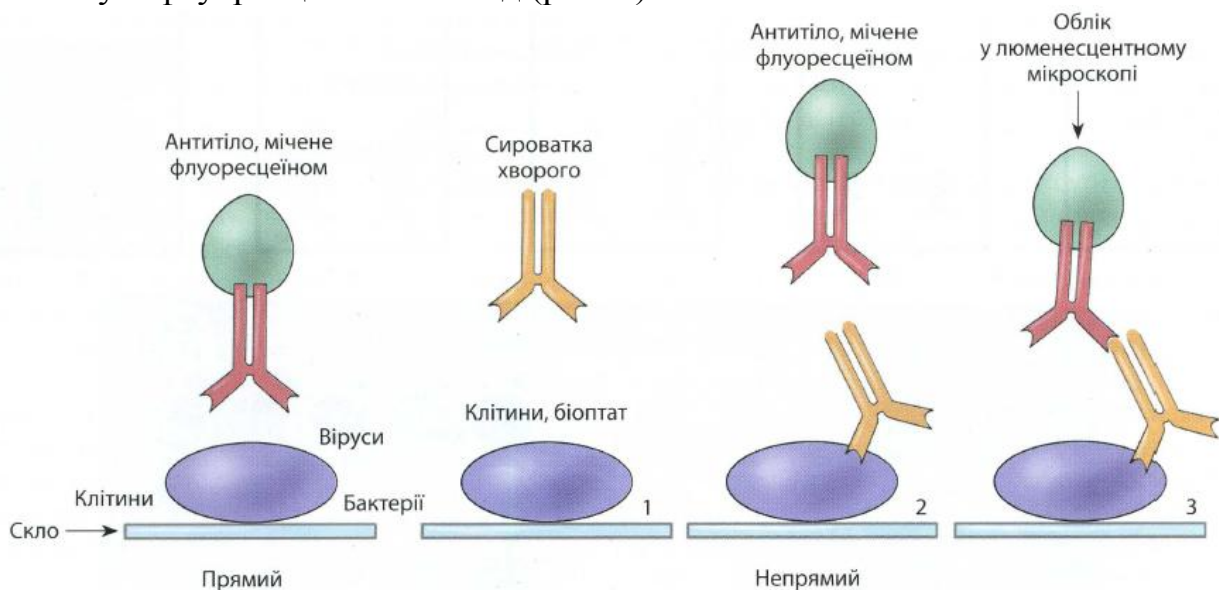


Рис. 3. Реакція імунофлуоресценції (прямий і непрямий варіанти)

Імунофлуоресцентні методи використовуються для виявлення аутоантитіл до тканинних і клітинних антигенів. Використовуючи зрізи тканин, на предметному склі можна виявити антитіла до кількох різних антигенів.

За допомогою імунофлуоресцентних методів можна ідентифікувати окремі клітини в суспензії клітин шляхом виявлення антигенів на поверхні живих клітин. Для цього суспензію живих клітин, які були попередньо пофарбовані флуоресцентними барвниками, пропускають через спеціальний прилад (цитофлуориметр), який заміряє інтенсивність світіння кожної клітини в різних областях спектра і потім розділяє клітини за параметрами світіння.

Прямий варіант РІФ широко використовується у діагностиці інфекційних хвороб людини, а за деяких інфекцій він є основним методом (діагностика сказу, хламідіозу, туляремії, сибірки та ін.).

Постановку прямого варіанту РІФ ми будемо проводити за діагностики сибірки, клостридіальних інфекцій і туляремії.

ІМУНОФЕРМЕНТНІ МЕТОДИ (ІФА)

В імуноферментних методах антиген взаємодіє з антитілом, при цьому *один з реагентів зв'язаний з ферментом* (ензимна мітка). Для виявлення цієї ензимної мітки необхідний відповідний субстрат (хромоген), який реагує в місці з'єднання антигену й антитіла з кон'югованим ферментом, змінюючи забарвлення реагуючої суміші.

Для такої мітки широко використовується фермент *пероксидаза хрому*, яка залежно від субстрату дає різнокольорові продукти реакції. Крім пероксидази хрому, може використовуватись *глюкозна оксидаза* (бактерійний ензим, який відсутній в людських тканинах); проте продукт реакції не такий стабільний або нерозчинний, як пероксидаза. Набуває популярності *лужна фосфатаза*, особливо при використанні технік з подвійною міткою для одночасного виявлення двох антигенів.

Імуноферментні методи широко використовуються:

- у лабораторній практиці, особливо при імуногістологічних дослідженнях, а також
- для виявлення циркулюючих антигенів,
- антитіл та
- імунних комплексів, які мають суттєве значення в діагностиці інфекційних хвороб.

Розрізняють прямі і непрямі імуноферментні методи.

Прямий метод. На першому етапі реакції антиген реагує з антитілом, міченим пероксидазою, потім до утвореного комплексу додають відповідний субстрат (наприклад, H_2O_2 , 5-аміносаліцилову кислоту). Якщо антиген відповідає антитілу, в реагуючій системі виникає певне забарвлення. Методика постановки проста, проте така реакція використовується рідко через меншу чутливість порівняно з іншими методами.

Непрямий метод. Спочатку антиген реагує з неміченими антитілами, утворюючи комплекс “антиген - антитіло”. Після промивання у систему вносять протиглобулінові антитіла, мічені пероксидазою, які зв'язуються з першим комплексом. Після наступного промивання вносять субстрат, який, розкладаючись адсорбованим ферментом, зумовлює появу відповідного забарвлення (рис. 4).

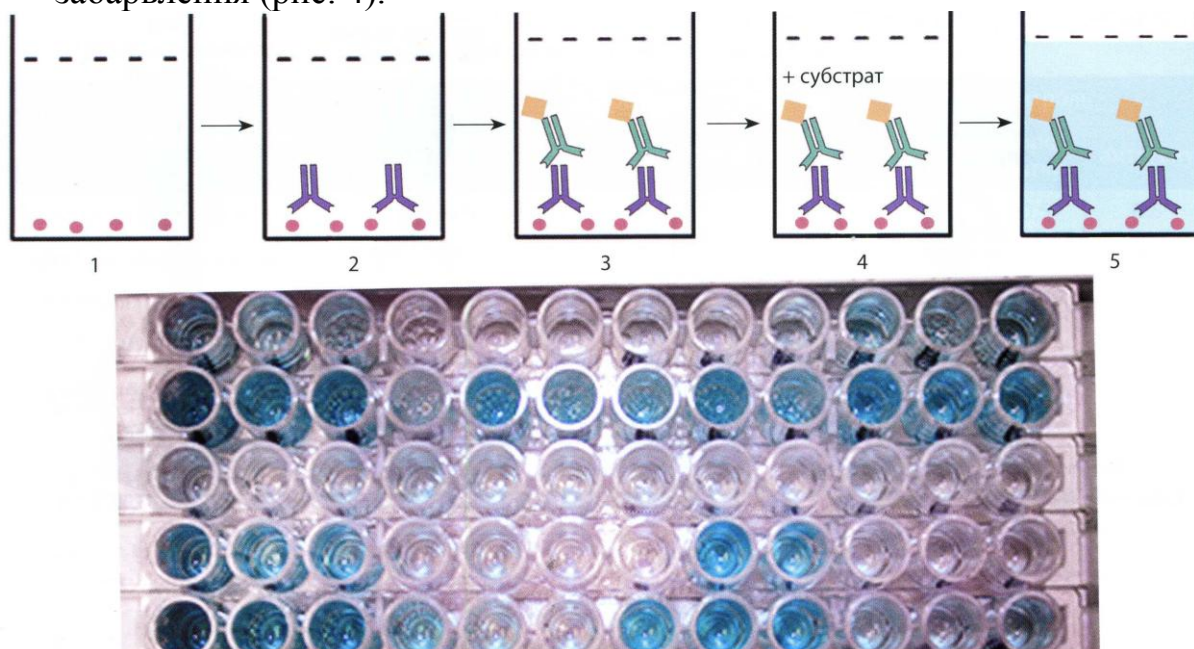


Рис. 4. Схема імуноферментного методу:

1 - тверда фаза з фіксованим антигеном; 2 - досліджуване антитіло сироватки хворого, зв'язане з антигеном; 3 - кон'югований з ферментом антиглобулін, зв'язаний з комплексом “антиген - антитіло”; 4 - внесення субстрату, який розкладається ферментом; 5 - зміна забарвлення свідчить про присутність ферменту, а значить, відповідно антитіла

Розроблено різноманітні модифікації техніки непрямого методу, зокрема:

- **Техніка подвійної мітки;**
- **Твердофазні імуноферментні методи;**
- **Конкурентний твердофазний метод.**

Перші антитіла можуть бути мічені гаптенами, якими є біотин або арсенілова кислота, інші спрямовані проти гаптену, кон'юговані з пероксидазою.

Для маркування реагентів реакції широко використовують можливості системи “авідин - біотин”. **Авідин** – глікопротеїн білка курячого яйця, має 4 детермінанти, які зв'язують **вітамін Н (біотин)**. Тому авідин, як і біотин, можна використовувати для мітки антитіл або ферментів (також для інших маркерів, таких як флуоресцеїн або лектин).

Замість авідину, кон'югованого з пероксидазою, в лабораторіях почали застосовувати комплекси “авідин - біотин - пероксидаза”. Техніка їх використання може бути двоетапною, коли використовуються біотиновані перші антитіла. Біотинована пероксидаза і авідин після змішування

утворюють комплекси. Для цього методу вже розроблено комплекси авідину і біотинованої лужної фосфатази.

Техніка подвійної мітки. Останнім часом одержано моноклональні антитіла проти антигенів диференціації (CD), які можуть бути використані для точнішої характеристики різних типів клітин, у тому числі і для диференціації субпопуляцій лімфоцитів. На клітинах одночасно можна виявити два або більше різних антигенів, за якими вони відрізняються між собою. Для подвійної мітки використовують методику з'єднання авідин-біотин-пероксидази із моноклональними мишачими антитілами.

Твердофазні імуоферментні методи. Принцип цих методів полягає в наступному. В якості твердої фази (носія) використовують лунки полістиролових планшет, фільтрувальний папір або нітроцелюлозу, на яких адсорбовано антиген чи антитіло. До антигену, що зафіксований на твердій фазі, додають досліджувану сироватку, а після інкубації і промивання вносять антитіла проти гамма-глобулінів людини, мічені ферментом. Після наступної інкубації та промивання додають субстрат для використаного ферменту, який реагує з ним. Спостерігається кольорова реакція, після затримки якої облік проводять візуально або спектрофотометрично.

Конкурентний твердофазний метод. До антигену, фіксованого на твердому носіїві, додають досліджувану сироватку хворого. Специфічні антитіла сироватки зв'язуються з антигенами. Після цього вносять стандартні специфічні антитіла, мічені ферментом. Якщо антитіла сироватки хворого зв'язались з антигеном, мічені антитіла не можуть реагувати з цим антигеном і активність ферменту в луночці буде незначною. При відсутності в сироватці хворого специфічних антитіл, стандартні специфічні антитіла, мічені ферментом, зв'язуються з антигеном, фіксованим на твердій фазі, і при додаванні субстрату спостерігається висока активність ферменту.

РАДІОІМУННІ МЕТОДИ (РІМ)

До радіоімуних методів відносяться всі імунологічні методи, в яких застосовують мічені радіоактивними ізотопами антигени або антитіла.

Для радіоактивного мічення найчастіше використовують два нукліди: тритій - ^3H і йод - ^{125}J . Радіоактивність заміряють за допомогою лічильників у-проміння, в яких кількість імпульсів є показником концентрації міченого антигену чи антитіла. Використовують також авторадіографію.

Класична радіоімуна методика базується на використанні конкурентного зв'язування антитілами досліджуваного антигену і міченого ізотопом антигену, який вносять у конкретну пробу в тій же самій кількості. Чим більша кількість досліджуваного антигену, тим менше міченого антигену зв'язується з антитілами.

Радіоімунні методи належать до найчутливіших імунологічних методів; вони дозволяють виявляти слідові кількості білка (нано-, пікограми). Проте для їх виконання необхідні відповідні специфічні умови, які забезпечують проведення роботи з радіоактивними ізотопами. До недоліків слід віднести і

недостатню стійкість радіоізотопних міток порівняно з ензимними.

ІМУНОБЛОТИНГ

Сучасні методи електрофорезу в гелі дозволяють розділяти біополімери, однак вивчати природу і біологічну активність окремих молекул, які були розділені при електрофорезі, досить важко. Це пов'язано з тим, що *локалізовані в порах гелю біополімери недоступні для специфічних антитіл*, оскільки *діаметр пор матриці значно менший за розміри антитіл*.

У зв'язку з цим було розроблено методику, яка дозволяє вилучати розділені молекули з гелю, переносити і фіксувати їх на поверхні твердої фази у тій послідовності, в якій вони знаходились у гелі. Таким чином, *досліджувані антигени, розміщуючись на поверхні нового носія (твердій фази), стають доступними для подальших досліджень*.

Процес переносу біополімерів із електрофоретичного гелю та іммобілізація їх на поверхні пористої мембрани називається *блотингом*, а одержаний відбиток - *блотом*.

Для проведення імуноблотингу досліджувані антигени спочатку розділяють за допомогою електрофорезу в гелі. Одержані фракції електрофоретично переносять на листок нітроцелюлози (блот), який знаходиться в спеціальній камері. Фіксовані блоти обробляють специфічними до антигену антитілами, відмивають і додають радіоактивно мічений кон'югат для виявлення антитіл, які зв'язались з антигеном.

Після повторного промивання листок нітроцелюлози розміщують у касеті з рентгенівською плівкою для радіоавтографії. На проявленій плівці появляться смуги локалізації антигену, який зв'язав мічені антитіла.

Замість радіоактивної мітки можна використати люмінесцентні антитіла або антитіла, що кон'юговані з ферментом. В останньому випадку субстрат для ензиму (хромоген) повинен бути попередньо нанесений на нітроцелюлозну мембрану.

Існує багато різноманітних методів, в яких використовується блотинг, наприклад, дот- або спот-блотинг, Southern-блотинг, Northern-блотинг, Western-блотинг. Усі вказані методи можна віднести до двох груп:

- тих, в яких використовується гібридизація нуклеїнових кислот, і
- тих, які базуються на феномені реакції "антиген - антитіло".

Реакції гібридизації блотинг - високоспецифічні, їх суть полягає у використанні одноланцюгової нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) (генетичний зонд), яка комплементарно зв'язується з досліджуваною ДНК або РНК. Генетичні зонди, що застосовуються в таких реакціях одержують шляхом клонування плазмід, штучного синтезу або з використанням техніки ампліфікації генів. Як мітку генетичного зонду використовують біотин. **Біотин** - розчинний у воді вітамін Н, в структурі якого знаходиться залишок деоксиуридинтрифосфату, який є структурним аналогом трифосфату

тимідину. Завдяки цьому біотин вмонтовується у нитку ДНК на місце тимідину, виконуючи роль маркера.

Реакції блот-гібридизації проводяться на мембранах, які містять мікропори і виготовлені з нітроцелюлози або нейлону.

Вестерн-імуноблотинг використовується для виявлення антимікробних, антивірусних і протигрибкових антитіл. З цією метою очищені білки (бактерій, вірусів, грибів) розділяють шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі. В останньому білки мігрують і розділяються один від одного, утворюючи невидимі дуги, які складаються з білків різної молекулярної маси. Після розділення дуги електрофоретично переносять на нітроцелюлозну мембрану, що є тою основою, на якій можна буде виявити антитіла проти індивідуальних білків.

Маркером є біотин, який значно підвищує чутливість реакції і вилучає небезпеку, пов'язану з радіоактивним випромінюванням. Проте застосування біотину вимагає додаткової інкубації і промивання (одне після додавання авідину, який специфічно зв'язується з біотином; друге після внесення субстрату). В результаті реакції настає зміна кольору і дуги стають видимі.

Вестерн-імуноблотинг - різнопланова методика, яка використовується для дослідження різних аспектів імунологічної відповіді в процесі розвитку інфекційного процесу. З її допомогою можна визначати антитіла не тільки класу IgG, але також анти-IgM, анти-IgA, анти-IgE.

Вестерн-блот - методика, яка підтверджує факт зараження ВІЛ на основі виявлення антитіл. Вона використовується для диференціації ВІЛ 1 і ВІЛ 2, а також при змішаній інфекції ВІЛ 1 і ВІЛ 2. Все частіше її застосовують для діагностики захворювань, викликаних іншими вірусами і бактеріями (наприклад, *T. pallidum*, *B. burgdorferi*).

БІОЧІПИ

На даний час в лабораторній діагностиці все ширшого застосування набувають **біочіпи** (біологічні числові інформаційні пристрої).

Технологія біочіпів може бути використана в клінічній діагностиці **для визначення вірусів і мікроорганізмів, гормонів, алергенів, наркотиків**, малих концентрацій будь-яких біоактивних речовин в біологічних і медико-біологічних дослідженнях; у криміналістиці; для досліджень в галузі екології і біобезпеки. Зараз існує три основні типи біочіпів:

- ДНК-чіпи,
- білкові і
- клітинні чіпи.

Біочіп являє собою набір фіксованих на невеликій (від кількох міліметрів) скляній пластинці-матриці сотень і тисяч “мікропробірок”, точніше, гелевих крапель, обсягом в одну мільйонну мілілітра. Кожна з них заповнена своїм реактивом - **аналізатором** (молекулярним зондом). В якості молекулярних зондів можуть служити олігонуклеотиди, фрагменти геномної ДНК, РНК, білки, поліпептиди, рецептори антитіл, ліганди, олігосахариди і т.п. На біочіп наносять досліджуваний матеріал. У тих краплях-“пробірках”,

де відбулася взаємодія реактиву з препаратом, виникає специфічне світіння. Воно реєструється мікроскопом і обробляється комп'ютером. За розташуванням осередків, які світяться, можна судити про те, що являє собою досліджуваний препарат.

У біочіп можна заправити ДНК хвороботворних бактерій і вірусів для виявлення цих патогенів у навколишньому середовищі, у пацієнта в крові або слині. Це дає в руки лікарів швидкий, надійний і дешевий спосіб діагностики і обстеження хворого, дозволяє їм практично безпомилково прогнозувати результати лікування.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Постановка прямої реакції імунофлуоресценції із міченими антиколібактеріозними глобулінами.

Завдання 2 . Постановка експрес-методу діагностики КОВІДу за допомогою антиковідних смужок в реакції імуноблотингу.

Контрольні питання:

1. Принцип імунофлуоресцентного методу.
2. Для діагностики яких хвороб застосовується прямий варіант РІФ?
3. Принцип імуноферментного методу.
4. В чому полягає різниця між прямими та непрямим варіантом ІФА.
5. Принцип радіоімуного методу.
6. В чому полягає чутливість цих методів?
7. Принцип імунофлуоресцентного методу.
8. Для діагностики яких хвороб застосовується прямий варіант РІФ?
9. В чому полягає суть імуноблотингу.
10. На які дві групи ділять блотингові методи.
11. Коли ми застосовуємо вестерн-імуноблотинг?
12. В яких випадках може бути застосована технологія біочіпів?
13. Які типи біочіпів Ви знаєте?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 19

Тема: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ЛЮДИНИ.

Навчальна мета

Знати:

– Суть і місце застосування молекулярно-генетичних методів для діагностики інфекційних хвороб людини.

Уміти:

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Молекулярна біологія базується на принципі генетичного детермінізму. Дослідження на молекулярному рівні структурної організації як генів, так і в цілому геному дозволяє вивчати механізми функціонування генів.

Використання молекулярно-генетичних методів дозволило дослідити в першу чергу геном прокариот, а згодом і повністю розшифрувати геном людини.

Методи генетичного аналізу в наш час бурхливо розвиваються. Ось деякі з них, що їх найчастіше використовують у мікробіології:

1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі (пробі). Крім простого збільшення числа копій ДНК (цей процес називається *ампліфікацією*), ПЛР дозволяє здійснювати безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), і широко використовується в біологічній і медичній практиці для:

- клонування генів,
- введення мутацій,
- виділення нових генів,
- секвенування,
- створення і визначення генетично модифікованих організмів,
- діагностики захворювань (спадкових, інфекційних),
- ідентифікації малих кількостей ДНК,
- встановлення батьківства.

ПЛР у діагностиці вірусних і бактеріальних інфекцій дозволяє виявляти мікроби у досліджуваному матеріалі від хворого без виділення чистої культури – за наявністю в матеріалі ДНК мікробів. Для проведення цієї реакції з досліджуваного матеріалу виділяють ДНК, у якій визначають наявність специфічної для даного мікроба ділянки. Виявлення цієї ділянки здійснюють шляхом її накопичення (ампліфікації). Для цього необхідно мати специфічні *праймери*, що запускають реакцію. Праймери синтезують штучно, вони комплементарні до 3'-кінця ДНК досліджуваної ділянки.

2. Метод молекулярної гібридизації дозволяє виявити ступінь схожості різних ДНК. Застосовується під час ідентифікації мікробів для визначення їх точного таксономічного положення.

Як і при ПЛР, метод ґрунтується на здатності дволанцюгової ДНК при підвищеній температурі (90 °С) в лужному середовищі денатурувати, тобто розплітатися на дві нитки, а при пониженні температури на 10 °С знову відновлювати початкову дволанцюгову структуру. *Метод потребує наявності молекулярного зонда.*

Зондом називається одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти з радіонуклідною міткою, з якою порівнюють досліджувану ДНК.

3. Рестрикційний аналіз Дозволяє визначити генетичну спорідненість штамів; виявити ділянки, піддані мутаціям; отримати рестрикційну карту певного виду мікробів. Цей метод ґрунтується на *застосуванні ферментів*,

що мають назву рестриктаз.

У геномі конкретної таксономічної одиниці знаходиться строго визначене (генетично детерміноване) число ділянок упізнання для певної рестриктази. Якщо виділену з конкретного мікроба ДНК обробити певною рестриктазою, то це спричинить утворення строго визначеної кількості фрагментів ДНК фіксованого розміру.

Про розмір кожного типу фрагментів можна дізнатися за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. У такий спосіб можна отримати рестрикційну карту певного виду мікробів. Зіставляючи карти рестрикції ДНК, виділених із різних штамів, можна визначити їх генетичну спорідненість, виявити належність до певного виду або роду, а також знайти ділянки, піддані мутаціям.

3. Риботипування та опосередкована транскрипцією ампліфікація рибосомальної РНК. Послідовність нуклеотидних основ в оперонах, які кодують рРНК, вирізняється консервативністю, властивою кожному виду бактерій. Фрагменти ДНК, отримані після її оброблення рестриктазами, містять послідовності генів рРНК, які можуть бути виявлені методом молекулярної гібридизації з міченою рРНК відповідного виду бактерій. Кількість і локалізація копій оперонів рРНК і рестрикційний склад сайтів як усередині рРНК-оперона, так і по його флангах, варіюють у різних видів бактерій. На підставі цієї властивості побудований метод риботипування, який дозволяє проводити генетичний моніторинг виділених штамів бактерій. На даний час риботипування проводиться в автоматичному режимі у спеціальних приладах. Опосередкована транскрипцією ампліфікація рРНК використовується для діагностики мішаних інфекцій (мікст-інфекцій).

4. Метагеномний аналіз. Революційним підходом у мікробній екології (вивченні спільнот мікроорганізмів, що населяють об'єкти оточуючого середовища, а також мікробіоми людини, тварин і рослин) являється метагеномний аналіз. Він передбачає вивчення генів бактерій (переважно рибосомальних 16S РНК) та інших мікроорганізмів за допомогою ПЛР з наступним секвенуванням ампліфікованого продукту для визначення нуклеотидних послідовностей. Далі за допомогою комп'ютерної техніки ці послідовності зіставляються з нуклеотидними послідовностями вже відомих видів бактерій.

Метагеномний аналіз дозволяє визначити видову різноманітність досліджуваного зразка без необхідності виділення й культивування мікроорганізмів. Використовуючи різноманітні підходи, в дослідних зразках можна одночасно визначати геноми бактерій, архей, грибів, вірусів, найпростіших, у тому числі раніше не досліджених (секвенування *de novo*).

Секвенування – це визначення послідовності нуклеотидних пар у молекулі ДНК чи РНК. Це молекулярно-біологічний термін, який застосовують при опису методів, які використовуються для встановлення послідовності нуклеотидних пар. Результати секвенування записуються в символічному лінійному вигляді, що називається послідовністю, яка стисло

підсумовує значну кількість інформації стосовно атомної структури секвенованої молекули.

За допомогою метагеномного аналізу доведено існування величезної кількості невідомих геномів мікроорганізмів і вірусів, що заселяють біосферу, зокрема людину. Метагеномний аналіз широко використовується у філогенетичній таксономії бактерій.

Для молекулярно-генетичного аналізу складного геному еукаріот необхідні були інформативні маркери.

Спочатку використовувалися:

- ✓ тест-системи для виявлення продуктів генів (*білковий поліморфізм*),
- ✓ потім на рівні генетичного матеріалу клітин (*поліморфізм ДНК*).

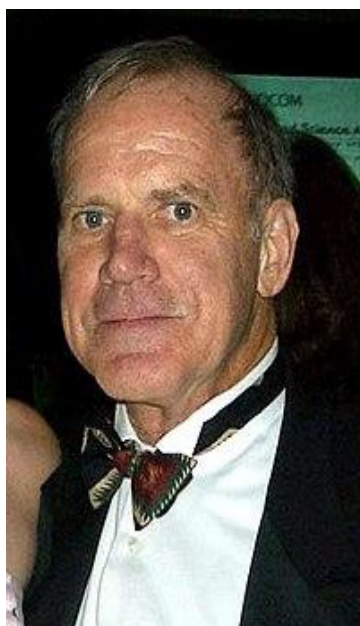
Більш інформативним виявилось використання як маркерів поліморфних послідовностей нуклеотидів ДНК за *поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів* (ПДРФ).

Проблема пошуку маркерів на рівні молекул ДНК була практично вирішена, коли відкрили метод ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ(ПЛР), яку називають «золотою кулею» діагностики, – один із сучасних високочутливих методів молекулярної біології, який базується на принципі виявлення і багаторазового копіювання (ампліфікації) індивідуальних фрагментів ДНК.

Принцип методу ПЛР (Polymerase chain reaction (PCR) розроблений **Кері Мюллісом** (фото) зі співробітниками, який за ці роботи у 1993 р. одержав Нобелівську премію.

Зараз ПЛР широко використовується як для наукових досліджень, так і для діагностики генетичних та інфекційних захворювань), ветеринарно-санітарної експертизи (визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі кормів) та ін.



Мал. 1. Кері Мюлліс.

В основі методу ПЛР лежить природний процес – *комплементарна добудова ДНК матриці, яке здійснюється за допомогою ферменту ДНК-полімерази*. Ця реакція має назву реплікації ДНК.

Природна реплікація ДНК має декілька стадій:

1. Денатурація ДНК (розплетення подвійної спіралі, розходження ниток ДНК).
2. Утворення коротких дволанцюгових ділянок ДНК (затравок, необхідних для ініціації синтезу ДНК).
3. Синтез нового ланцюга ДНК (комплементарна добудова обох ниток).

Цей процес можна використовувати для одержання копій коротких ділянок ДНК, специфічних, наприклад, для конкретних мікроорганізмів, тобто здійснювати цілеспрямований пошук таких специфічних ділянок, що і є метою генодіагностики для виявлення у даному випадку збудників інфекційних захворювань.

Полімеразна ланцюгова реакція, або специфічна ампліфікація ДНК, дає змогу вибірково синтезувати *in vitro* невеликі ділянки ДНК, які мають розмір від декількох десятків до сотень пар олігонуклеотидів (від грец. *Oligos* – малий).

Тобто **ампліфікація** – це процес утворення додаткових копій певної нуклеотидної послідовності ділянок хромосомної ДНК. Як матриця можуть використовуватися різні зразки ДНК, що містять послідовність, яку треба ампліфікувати (тиражувати). Таким чином, ПЛР – це багаторазове збільшення кількості копій (ампліфікація) специфічної ділянки ДНК, яке каталізується ферментом – ДНК-полімеразою.

Для проведення ампліфікації необхідні наступні компоненти:

ДНК-матриця (ДНК або її частина, яка містить досліджуваний специфічний фрагмент);

Праймери (від англ. *Primer* – початковий, основний) – синтетичні олігонуклеотиди (20-30 нуклеотидних пар), які комплементарні послідовностям ДНК у межах специфічного фрагмента. Вибір специфічного фрагмента та підбір праймерів відіграє важливу роль у специфічності проведення ампліфікації, що позначається на якості аналізу.

Суміш дезоксирибозонуклеотидтрифосфатів (ДНТФ) (суміш чотирьох ДНТФ (Г, Ц, Т, А), які є матеріалом для синтезу нових комплементарних ланцюгів ДНК).

ДНК-полімераза. При проведенні ПЛР-аналізу використовують різні ферменти:

Тақ-полімераза – термостабільна ДНК-полімераза, яка каталізує подовження ланцюгів праймерів шляхом послідовного приєднання нуклеотидних основ до зростаючого ланцюга ДНК, що синтезується.

Тақ-полімераза виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, яка живе в гарячих джерелах. Фермент стабільний при високих температурах і зберігає високу активність у процесі ампліфікації.

Tth-полімераза, яка виділена з термофільної бактерії *Thermus thermophilis*. Температурний і рН оптимуми відповідно дорівнюють 75 °С і 9,0. Фермент має ревертазну активність і використовується з РНК-матрицею у реакції синтезу комплементарної молекули ДНК. Для одержання специфічних ділянок геному РНК-вмісних вірусів спочатку отримують ДНК-копію на РНК-матриці шляхом використання реакції зворотної транскрипції (RT), яка каталізується ферментом – ревертазою (зворотною транскриптазою).

Pwo-полімераза, яку отримують з термофільної бактерії *Pyrococcus woesei*. Фермент більш термостабільний, ніж Taq- і Tth-полімерази.

Буферний розчин (реакційне середовище, яке містить іони Mg^{2+} , необхідні для підтримки активності ферменту).

Необхідною умовою при ампліфікації є **наявність «праймерів»** – синтетичних невеличких фрагментів ДНК, які складаються з 20-30 пар нуклеотидних основ. Праймери комплементарні ділянкам (сайтам) відпалу на ідентифікованій матричній ДНК.

ПЛР-аналіз відбувається циклами, кожний з яких складається з трьох послідовних стадій, які відбуваються при різних температурах:

1. **Денатурація** або процес плавлення молекул ДНК ($t^{\circ}=93-95$ °С). При цьому дволанцюгова форма перетворюється на одноланцюгову, яка стає доступною для праймерів.

2. **Відпал** – приєднання праймерів, один з яких комплементарний початку одного ланцюга ДНК, а другий – кінцю іншого.

3. **Подовження (елонгація) ланцюга ДНК** за рахунок приєднання дезоксинуклеотидтрифосфатів за принципом комплементарності. Відбувається за участю ДНК-полімерази термофільної бактерії *Thermus aquaticus* (Taq-полімерази) за температури 60–70 °С. Утворюються дволанцюгові молекули ДНК – точні копії необхідного фрагмента.

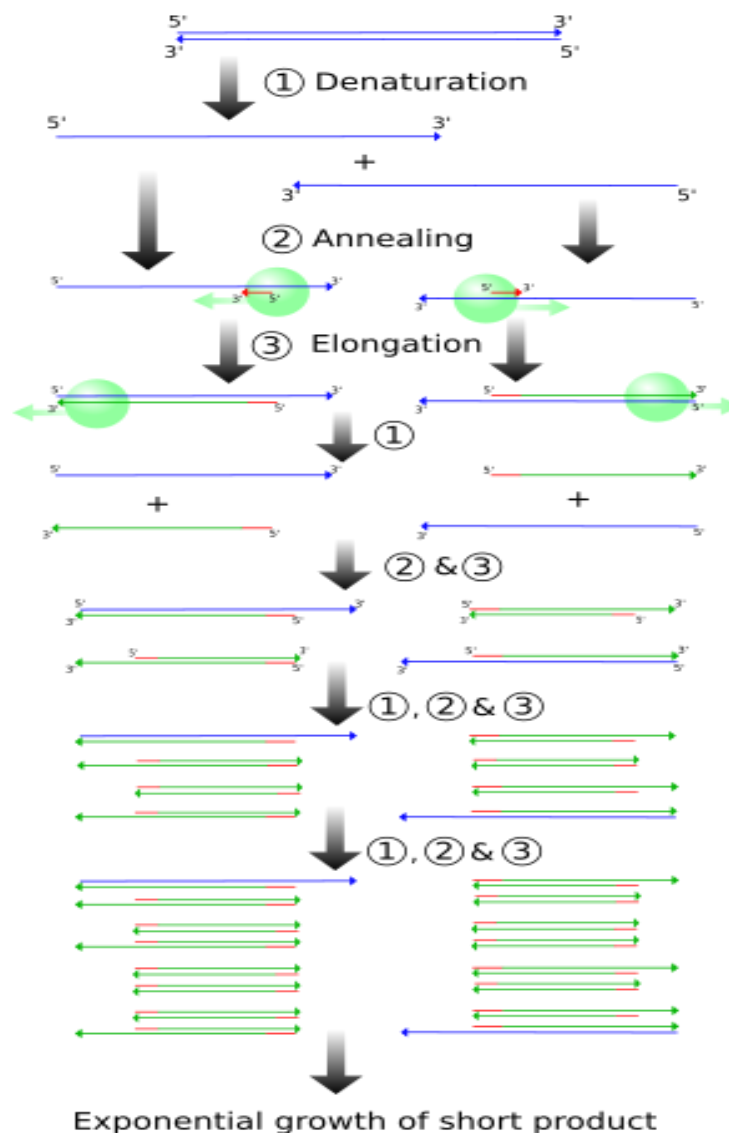
Цей триступеневий цикл, у процесі якого утворюються синтезовані фрагменти ДНК-амплікони, повторюється 30-40 разів. З кожним циклом кількість сегментів ДНК, обмежених з обох кінців, що використовуються праймерами, збільшується експоненціально ($C=2^n$, де n – кількість циклів). Вихід інших продуктів збільшується лінійно.

Полімеразна ланцюгова реакція проводиться в термоциклері (ампліфікаторі) – термостаті, в якому автоматично змінюється температурний режим (мал. 2).



Мал. 2. Типовий ампліфікатор для ПЛР

4. Наступний етап ПЛР – *детекція або виявлення ампліфікованої ДНК*. Ампліфіковані специфічні фрагменти ДНК виявляють *методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі з барвником* (бромистий етидій). Барвник утворює з фрагментами ДНК стійку сполуку, яка проявляється у вигляді смуг, що світяться при опроміненні гелю УФ-випромінюванням при довжині хвилі 290–330 нм. Продукт електрофорезу розглядають в УФ-світлі за допомогою транслюмінатора і фотографують.



Мал. 3. Схематичне зображення процесу ПЛР. (1) Денатурація при 94-96 °С. (2) Відпал при ~65 °С (3) Елонгація при 72 °С. На малюнку зображені чотири цикли реакції.

ПЛР може бути доповнена **рестрикційним аналізом ампліфікованої ДНК**, що потрібно для визначення поліморфізму ДНК.

Для лабораторії ПЛР необхідні три ізольовані кімнати з наявністю води і вентиляції. **Для попередження контамінації** або потрапляння будь-яким шляхом із зовнішнього середовища в реакційну суміш продуктів ампліфікації, що викликає хибнопозитивні результати.

Основними видами робіт є:

- ✓ підготовка досліджуваних зразків,
- ✓ ампліфікація та
- ✓ детекція продуктів ПЛР,

які потрібно ізолювати один від одного і проводити в різних приміщеннях.

Робота організовується в одному напрямі:

від ПЛР-приміщення до кімнати, де відбувається детекція продуктів полімеразної реакції, до виписки результатів дослідження.

При проведенні ПЛР необхідно одночасно проводити **постановки контрольних проб** – позитивної і негативної.

В пробірку з **позитивним контролем** вносять препарат, в якому міститься визначена послідовність ДНК.

У пробірці з **негативним контролем** замість досліджуваного зразка ДНК вносять аналогічний об'єм води.

Використовують також так званий «**внутрішній контроль**», при якому в реакційну суміш додають зразок ДНК, який має специфічні сайти приєднання праймерів, але відрізняється за довжиною від очікуваного цільового фрагмента. Виявлення специфічних продуктів ампліфікації внутрішнього контролю – сигнал успішного проходження ПЛР. Якщо продукти ампліфікації внутрішнього контролю не виявляються – реакція за будь-яких причин не відбулася.

Методика ПЛР постійно вдосконалюється.

Сучасний варіант – **ПЛР в реальному часі (real time PCR)** не потребує етапу електрофорезу. ДНК, її види і кількість визначається безпосередньо в ампліфікаторі. Якщо об'єкт досліджень є РНК, то з допомогою зворотної транскриптази (ревертази) переводять РНК в ДНК, які далі досліджують як ДНК.

Контрольні питання:

1. Методи генетичного аналізу знаходять все більше застосування в наш час?
2. При діагностиці яких захворювань/явищ застосовують ці методи?
3. Назвіть основні молекулярно-генетичні методи.
4. Для чого застосовується метагеномний аналіз.
5. В чому інноваційність метагеномний аналіз?
6. Що таке секвенування?

7. ПЛР – це... продовжіть.
8. Історія «винайдення» ПЛР (засновники, дати).
9. Принцип методу ПЛР.
10. Назвіть 4 цикли постановки ПЛР?
11. Що таке ампліфікація? Які компоненти необхідні для проведення ампліфікації.
12. Сучасний варіант – ПЛР це... продовжіть.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 20

Тема: ІМУНОПРОФІЛАКТИКА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ.

Навчальна мета

Знати:

- Суть і значення термінів «імунопрофілактика», «імунотерапія» та «імунокорекція»;
- Класифікацію вакцин;
- Національний календар профілактичних щеплень.

Уміти:

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Імунопрофілактика – це напрямок прикладної імунології, метою якого є вдосконалення існуючих і створення нових методів та засобів специфічної профілактики захворювань інфекційної та неінфекційної етіології шляхом формування у людини специфічного імунітету до збудників інфекційних хвороб або антигенів іншого походження.

Імунотерапія спрямована на боротьбу із захворюваннями, при яких саме імунній системі та активним речовинам її діяльності надається основна роль у відновленні гомеостазу організму, або патогенез яких пов'язаний із серйозними порушеннями з боку імунної системи.

Імунокорекція - комплекс терапевтичних або профілактичних заходів, що передбачають активний вплив на імунну систему організму з метою відновлення її фізіологічного стану.

Способами реалізації імунопрофілактичного та імунотерапевтичного впливу на організм людини є **імуотропні засоби** - препарати, основна фармакологічна (фізіологічна) дія яких спрямована на ті чи інші ланки імунітету. За принципом дії на імунну систему імуотропні препарати можна розділити на три групи:

- імуностимулятори,
- імуносупресори та
- засоби замісної терапії. В останньому випадку йдеться про внесення до організму людини певних компонент гуморального (імуноглобуліни) або клітинного (пересадка кісткового мозку, тимуса) імунітету.

Виділяють **супільну** й **індивідуальну профілактику** інфекційних хвороб.

Індивідуальна профілактика передбачає дотримання правил особистої гігієни в побуті та на виробництві.

Суспільна – включає систему заходів з охорони здоров'я колективів.

Усі заходи щодо профілактики інфекційних захворювань можна умовно розділити на дві великі групи – загальні та спеціальні.

До **загальних** належать державні заходи, спрямовані на підвищення матеріального добробуту, поліпшення медичного забезпечення, умов праці та відпочинку населення, а також санітарно-технічні, агролісотехнічні, гідротехнічні й меліоративні заходи, раціональне планування та забудова населених пунктів, що сприяє ліквідації інфекційних хвороб.

Спеціальними є профілактичні заходи, які проводять працівники лікувально-профілактичних і санітарно-епідеміологічних закладів. Система профілактичних заходів також включає міжнародні заходи щодо запобігання тим небезпечним інфекційним захворюванням, які регулюють Міжнародні медико-санітарні правила.

При плануванні й проведенні профілактичних заходів щодо інфекційних хвороб їх поділяють на три групи:

- 1) заходи стосовно джерела інфекції, спрямовані на його виявлення та знешкодження (або усунення);
- 2) заходи стосовно механізму передачі з метою розірвати шляхи передачі збудника інфекції;
- 3) заходи із підвищення несприйнятливості населення.

Забезпечення несприйнятливості населення до збудників інфекційних хвороб (імунопрофілактика) у системі протиепідемічних заходів саме посідає одне з найважливіших місць.

Імунопрофілактика є традиційним науково обґрунтованим засобом зниження захворюваності та ліквідації інфекційних хвороб.

Формування активного штучно набутого протиінфекційного імунітету досягається введенням вакцин.

Вакцини – препарати, одержані з бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів, їх хімічних компонентів, продуктів життєдіяльності або виготовлені штучним шляхом, які застосовуються для активної імунізації людей і тварин з метою профілактики і лікування інфекційних хвороб.

Усі вакцини **за способом одержання й характером антигенів** поділяють на живі, вбиті, хімічні, субклітинні, субодичні, анатоксини, штучні на основі рекомбінантних ДНК, антиідіотипові. **За кількістю антигенів** розрізняють моно-, ди-, три-, тетравакцини тощо.

Для забезпечення виробництва нешкідливих, стандартних вакцин існує єдина система їх випробування і застосування. Вона передбачає:

- одержання вакцинного штаму,
- виготовлення достатньої кількості препарату,
- експериментальну перевірку його на стерильність, токсичність, реактогенність, імуногенність на тваринах,
- оцінку ефективності на обмеженому контингенті людей,

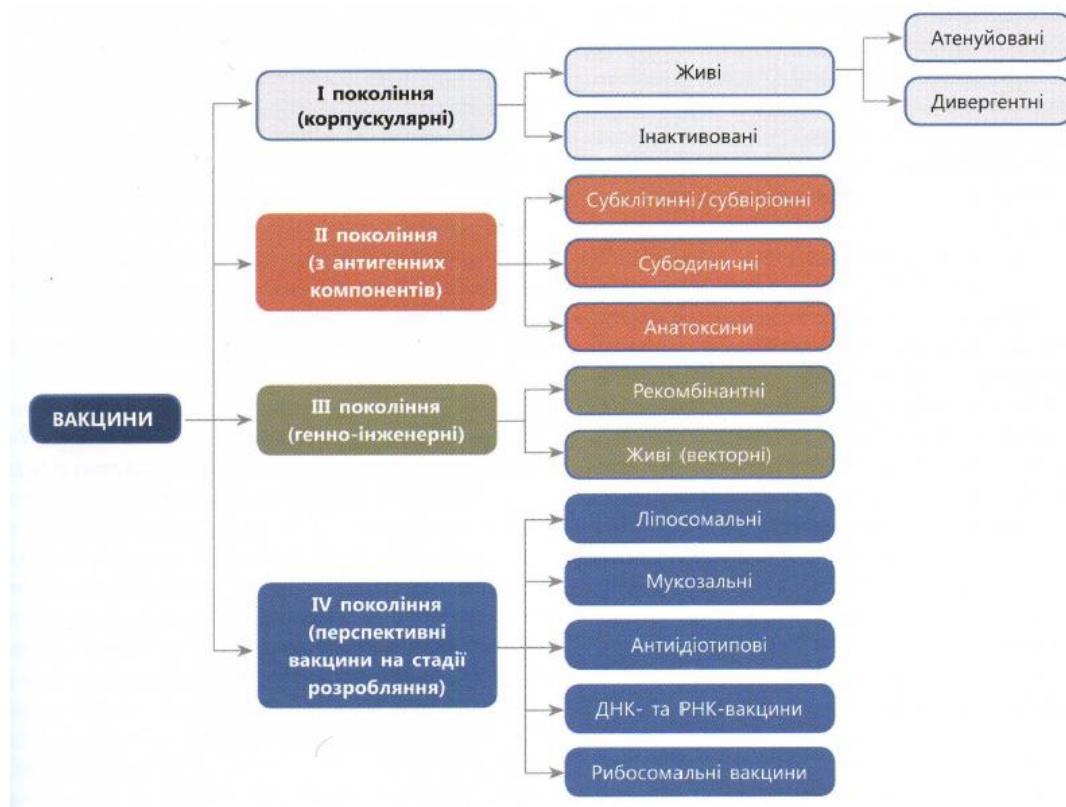
➤ вивчення ефективності при масовому застосуванні.

Вакцини умовно можна поділити на чотири покоління (мал. 1).

Перше покоління - це вакцини, подібні до вакцини Едварда Дженнера і вакцин Луї Пастера, тобто вакцини з цільних мікроорганізмів; їх ще називають *корпускулярними* (від лат. *corpusculum* - тіло, частинка). Вони поділяються на живі та інактивовані вакцини, отримані з цільних мікроорганізмів.

Вакцини другого покоління одержують з очищених антигенних компонентів мікроорганізмів. До цього покоління належать хімічні вакцини, при виготовленні яких антигенні комплекси вилучаються з мікробів хімічним шляхом (у вірусів вони називаються субодиночними – вилучають субодиночні вірусні білки). Близькими до хімічних вакцин є анатоксини, отримані з екзотоксинів збудників.

До третього покоління належать генно-інженерні (рекомбінантні) вакцини. Генно-інженерні вакцини поділяють на вакцини очищених рекомбінантних антигенів і живі векторні вакцини – коли потрібний ген, що відповідає за синтез певного протективного антигену, вводять у живий вектор (наприклад, непатогенний вірус), який розмножується у вакцинованому організмі.



Мал. 1. Класифікація вакцин за поколіннями.

Вакцини четвертого покоління – це сучасні вакцини на стадії розробки: вакцини, які нині тільки входять у практику, конструюються на основі новітніх технологій і наукових знань. До таких вакцин належать синтетичні вакцини, ліпосомальні та мікрокапсулярні вакцини, мукозальні

вакцини, антидіотипові вакцини, ДНК- і РНК-вакцини, рибосомальні вакцини, а також так звані "істивні вакцини", вакцини, отримані з трансгенних рослин.

Живі вакцини – біологічні препарати, виготовлені з живих бактерій або вірусів із пониженою вірулентністю, але вираженими імуногенними властивостями. Вони не здатні у звичайних умовах викликати захворювання, але слабкий інфекційний процес при цьому має місце. Тому живі вакцини, як найбільш ефективні препарати для щеплення, індукують довготривалий і напружений поствакцинальний імунітет.

Крім **атенуації** (зниження вірулентності бактерій), живі вакцини можна одержувати шляхом **селекції (відбору)** з існуючих у природі штамів таких варіантів, які мають найменшу вірулентність (вакцини проти бруцельозу, туляремії, віспи, поліомієліту). У той же час, незважаючи на високу ефективність, живі вакцини мають ряд недоліків. Їх важко зберігати, стандартизувати, контролювати активність, а у людей з імунодефіцитами вони можуть викликати захворювання.

У даний час знову набуває великого значення метод атенуації. З цією метою використовують генетично модифіковані мікроорганізми (бактерії, віруси). Такі вакцини містять або непатогенні мікроорганізми, які синтезують антигенні детермінанти певного патогенного збудника, або штами патогенних бактерій, у яких вилучені гени патогенності.

Сучасні живі атенувані вакцини ефективніші, ніж інактивовані чи субодичні.

Інактивовані (вбиті) вакцини. Виготовлення вбитих вакцин - складний і відповідальний процес. Він розпочинається з підбору вакцинного штаму, який повинен мати виражені вірулентні та імуногенні властивості. Культуру засівають на оптимальні поживні середовища для одержання значної кількості біомаси бактерій. Після цього готують маточні суспензії, які піддають інактивації. Залежно від її способу, розрізняють:

- гріті вакцини (культуру прогрівають при 56-60 °С протягом 1-2 год);
- формолові вакцини, спиртові,
- ацетонові тощо (при дії на мікроби відповідних хімічних речовин).

На наступному етапі вакцини стандартизують, тобто встановлюють певну густоту їх суспензії (1-4 млрд. мікробних тіл в 1 мл). Препарати піддають обов'язковій перевірці на стерильність, антигенність, імуногенність, реактогенність тощо. Після цього одержані вакцини розливають в ампули й закупорюють.

Із вбитих вакцин використовують лептоспірозу, гонококову, грипозу, поліомієлітну Солка, японського та кліщового енцефалітів, антирабічну.

Хімічні вакцини. З метою введення в організм очищених антигенних препаратів, вільних від баластних речовин, з бактерій чи вірусів за допомогою хімічних методів або ультразвуку вилучають окремі антигенні компоненти. Вони й складають основу хімічної вакцини. Такі очищені

антигени можна концентрувати й адсорбувати на різних основах (сорбентах – ГОА, аеросил, тощо), збільшуючи цим їх імуногенну активність. Такі сорбовані вакцини створюють в організмі депо препарату, з якого в кровоток поступово всмоктуються антигени, що забезпечує тривалу імуностимулюючу дію. До найбільш відомих хімічних вакцин належать черевнотифозна, пневмококова, менінгококова.

Субклітинні вакцини - вакцини, які містять антигенні комплекси з рибосом мікробних клітин. Такі вакцини менш токсичні, більш імуногенні, здатні створювати перехресний імунітет до різних серогруп мікробів певного виду. Розроблено субклітинні вакцини проти сибірки, черевного тифу та інші.

Субодиничні вакцини — вакцини, які містять лише окремі білкові антигени патогенних мікробів, найчастіше вірусів (табл.1).

Перевагами таких вакцин є те, що вони містять очищений імуногенний білок, вони безпечні, не здатні викликати захворювання, стабільні. Їх хімічні властивості відомі, в їх складі відсутні інші білки і нуклеїнові кислоти, які могли б викликати небажані побічні ефекти в організмі.

Недоліками субодиничних вакцин є те, що очищення специфічного білка коштує дорого, а просторова конфігурація виділеного білка може відрізнятись від вихідного, що може призвести до зміни антигенних властивостей.

Таблиця 1.

Основні види сучасних субодиничних вакцин

Антивірусні вакцини	Антибактеріальні вакцини	Антипаразитарні вакцини
1. Вітряної віспи-оперізуючого	1. Ентеротоксину <i>E. coli</i>	1. Лейшманіозна
2. Цитомегаловірусна	2. Холерна	2. Протималарійна
3. Гепатиту А	3. Гонококова	
4. Гепатиту В	4. Лепрозна	
5. Простого герпесу 2	5. Менінгококова	
6. Грипозна А, В	6. Кашлюкова	
7. Парагрипозна	7. Протитуберкульозна	
8. Респіраторно-синцитіальна	8. Черевнотифозна	
9. Антирабічна	9. Протиправцева	
10. Ротавірусна	10. Пневмококова	
	11. Стрептококова груп А, В	

Анатоксини – препарати, які одержують із бактеріальних білкових токсинів при дії на них формаліну (0,3–0,5 %) протягом 3-4 тижнів при температурі 39-40 °С. Після такої обробки токсин втрачає отруйні властивості, але зберігає антигенні. Одержані анатоксини очищають, концентрують і адсорбують на гідроокисі алюмінію. Мікробіологічна промисловість випускає правцевий, дифтерійний, ботулінові, гангренозні, стафілококовий анатоксини. При імунізації цими препаратами в організмі утворюються антитіла (антитоксини), що здатні нейтралізувати дію відповідних токсинів. **Активність анатоксинів** визначають за їх здатністю

вступати в реакцію із специфічною антитоксичною сироваткою. Її виражають в одиницях зв'язування (03) або **флокуляційних одиницях**. Силу анатоксину визначають у реакції флокуляції, яка за механізмом подібна до реакції преципітації.

Флокуляція – феномен утворення каламутної хмаринки під час взаємодії анатоксину з антитілом. Початкова (ініціальна) флокуляція відбувається при чіткій відповідності кількості антигену й антитіла. Кількість анатоксину, яка зумовлює ініціальну флокуляцію з 1 МО (міжнародною одиницею) антитоксичної сироватки, приймають за одиницю флокуляції.

Асоційовані (комбіновані) вакцини. Препарати, до складу яких входить суміш антигенів кількох збудників. Їх переваги в тому, що вони забезпечують імунітет проти відповідних інфекцій при одномоментному введенні вакцинного препарату. Випускають такі асоційовані вакцини: АКДП (містить коклюшні бактерії і два анатоксини - дифтерійний і правцевий, які адсорбовані), ДТ-Роліо (дифтерійний, правцевий анатоксини та інактивовані віруси поліомієліту), Пентакт-ХІВ (полісахарид бактерії інфлюєнзи, правцевий і дифтерійний анатоксини, інактивованій збудник кашлюка, інактивована вакцина поліомієліту I, II, III) та інші.

Штучні вакцини. Штучне копіювання антигенів і детермінант методами генної інженерії може сприяти створенню вакцин без баластних домішок. Для отримання антигенів з необхідними детермінантами без сторонніх субстанцій існує два напрямки:

- 1) виділення високоочищеного антигену з природного матеріалу методами препаративної біохімії або генної інженерії;
- 2) хімічний синтез антигенних детермінант.

Як правило, виділяють або конструюють протективні антигени, адгезини, ферменти, протеїни оболонки, токсини. Незабаром буде створено вакцини, які забезпечать імунітет до збудників, проти яких поки що надійного захисту немає.

Основою **рекомбінантних вакцин** є перенесення в плазмиду або вірусний вектор гена, відповідального за продукцію необхідного антигену (рис. 1). Такі препарати поділяють на:

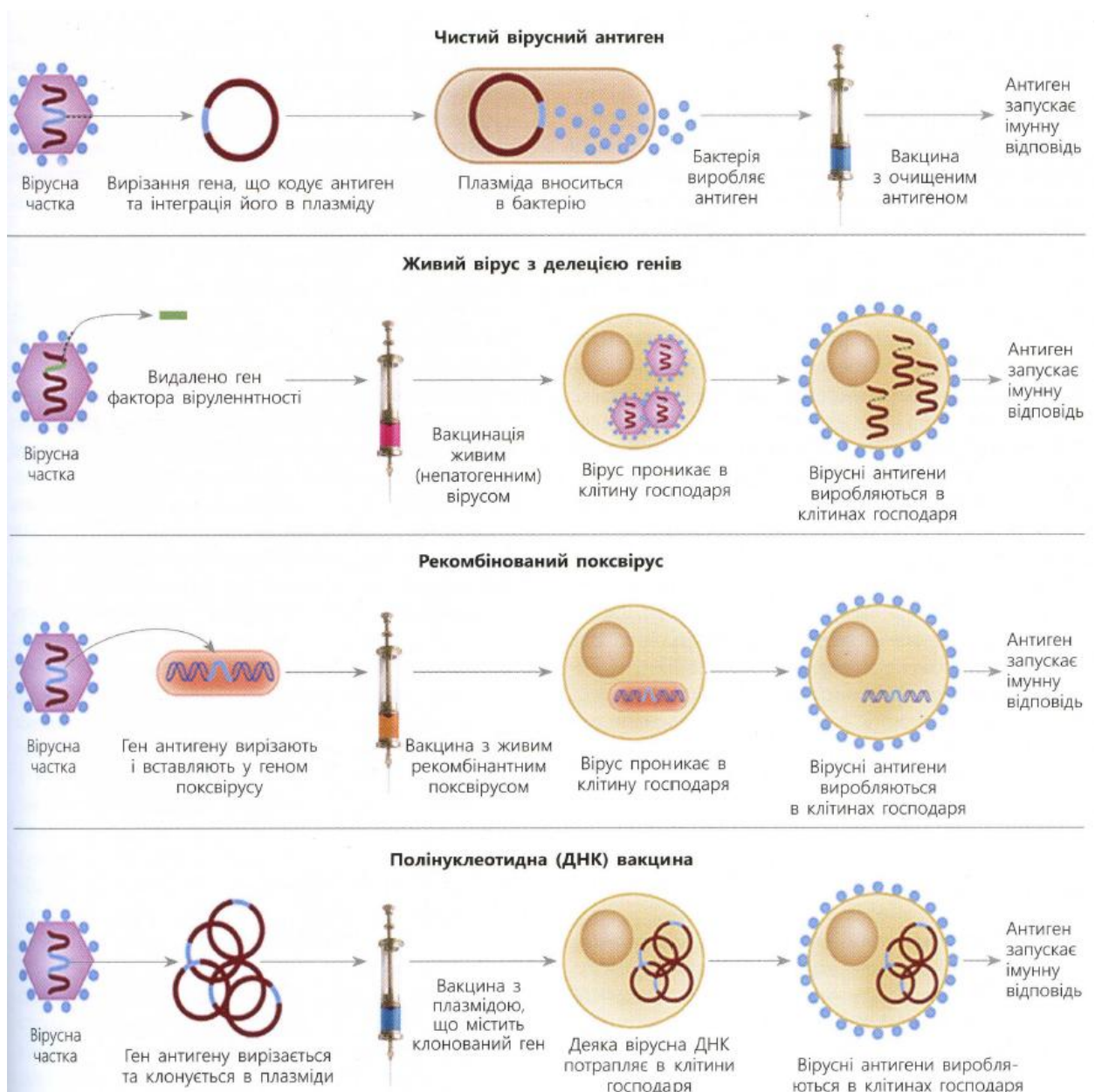
- генно-інженерні рекомбінантні вакцини з антигенів, синтезованих в рекомбінантних бактеріальних системах і дріжджах;
- генно-інженерні векторні живі вакцини на основі вірусу віспо вакцини;
- та інші.

У прокаріотні системи (кишечна паличка, сінна паличка) вносять плазмиди з генами, які контролюють синтез антигенів менінгококів, гонококів, холерних вібріонів, малярійних плазмодіїв, і таким чином отримують відповідні моноантигени того чи іншого виду мікробів у живильному середовищі.

Все більшого значення набуває новий напрям створення штучних вакцин, який одержав назву **генної імунізації**. Імунна відповідь формується без введення антигену в організм. Методика базується на включенні в

клітини-мішені гена, який кодує антиген. Наприклад, у плазміді *E. coli* інтегрували ген білка-антигену і такий мікроорганізм використали для внутрішньом'язової імунізації. В результаті в організмі вироблялись білки-антигени і в сироватці відзначали наявність відповідних антитіл.

Векторні вакцини. Векторні вакцини найчастіше готуються на основі вірусу вісповакцини. В геном вірусу одночасно вносять гени, що кодують антигенні детермінанти різних збудників (вірусів сказу, грипу, гепатиту В, простого герпесу тощо). Щеплення здійснюють таким модифікованим вірусом вісповакцини. Як вектори використовують аденовіруси, поліовірус, вірус вітрянки. Таким чином, векторні вакцини дозволяють провести імунізацію одночасно проти кількох захворювань, індукуючи ефективну імунну відповідь.



Мал. 2. Схема одержання вірусних вакцин з використанням генно-інженерних технологій.

ДНК-вакцини – являють собою гени, які кодують протективні антигени, вбудовані в плазмиди бактерій або інші вектори разом з промотором, без якого транскрипція в еукаріотичних системах не відбудеться. Найчастіше для запуску реплікації генетичної вакцини в клітинах людського організму використовується цитомегаловірусний промотор. При внутрішньом'язовому введенні таких вакцин транскрипція ДНК і трансляція протективного гена відбувається в міоцитах, далі антиген на поверхні міоцитів розпізнається Т8-лімфоцитами і антигенпрезентуючими клітинами; це приводить до стимуляції не лише клітинного, але й гуморального імунітету.

Сьогодні існує й *інший підхід до створення ДНК-вакцин*: виділяється фрагмент ДНК, вилучається ген протективного антигену, концентрується, а далі адсорбується на мікрочастинках золота. Такі вакцини активно взаємодіють з клітинами Лангерганса, які здатні презентувати антиген Т-хелперам. ДНК-вакцини стабільні, вони позбавлені інфекційних агентів. Перспективним напрямком є розробка багатокomпонентних вакцин, які містять дві чи більше плазмідні форми, що кодують різні антигени, цитокіни або інші біологічно активні молекули.

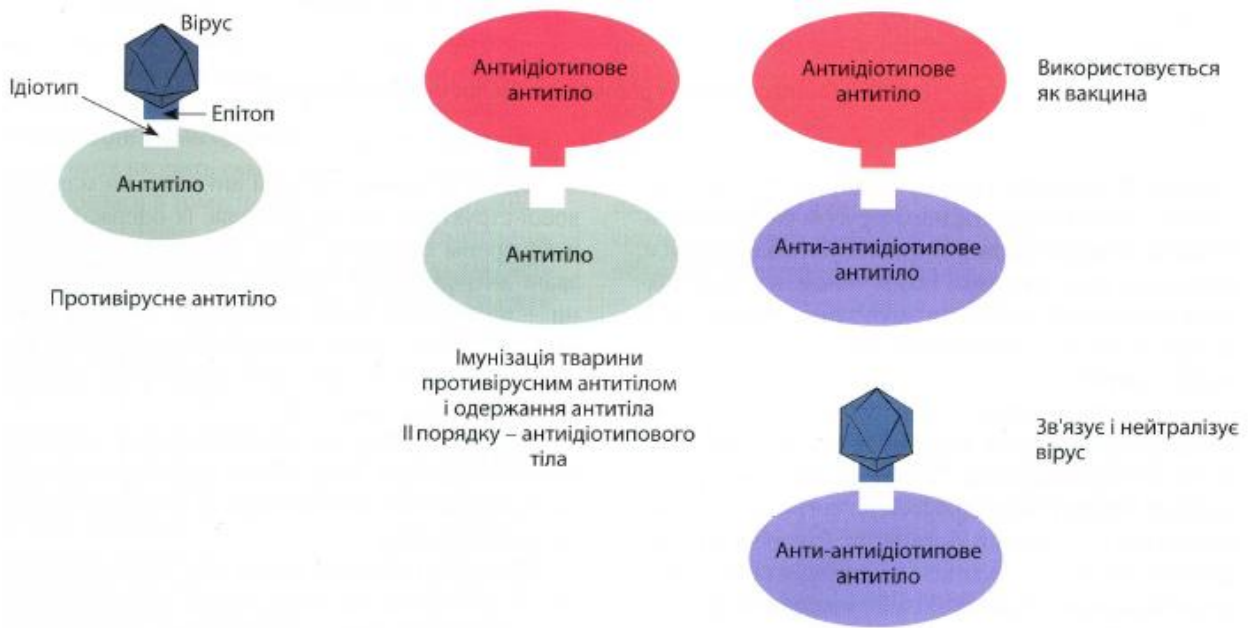
Вакцини можна отримувати не лише з ДНК, а й з РНК. **РНК-вакцини** безпечніші щодо бластогенного ефекту, однак вони нестабільні і викликають короткочасний імунітет. До того ж виробництво таких вакцин обходиться дорожче.

Досить актуальним є конструювання вакцин, які безпосередньо можна вводити через рот або через ніс, а не парентерально. Такі **оральні вакцини** повинні бути стійкими до кислого середовища шлунка і дії травних ферментів. Створені в експерименті вакцини базуються на використанні живих рекомбінантних мікроорганізмів – мікроносіїв для білкових антигенів.

Однак у деяких бактерій антигени не мають білкової структури, що не дозволяє їх одержати генно-інженерним способом. Тому почали створювати так звані антиідіотипові вакцини. **Антиідіотипові вакцини** – це антитіла (антитіла другого порядку), які несуть справжній внутрішній образ детермінант антигену і викликають при його відсутності адекватну імунну відповідь (мал. 3).

Вже розроблено такі вакцини проти стрептококів, вірусу гепатиту В. Вони мають перевагу перед іншими препаратами, оскільки ніколи не зможуть викликати захворювань.

Відкрито і вивчено новий клас **імунопотенціаторів** – синтетичних поліелектролітів, які активують клітини імунної системи й зумовлюють при їх введенні разом з антигенами сильну імунну відповідь навіть у осіб з генетично детермінованою низькою відповіддю на ці антигени.



Мал. 3. Схема одержання антиідіотипових вакцин.

У практичній медицині використовується ряд *полівакцин* для лікування захворювань дихальних шляхів у хворих з хронічними запальними процесами. Наприклад, вакцина ВП-4, яка містить антигени стафілокока, клебсієли пневмонії, протей, кишкової палички, при введенні через рот або через ніс виявилась досить ефективною.

Створення й широке застосування таких вакцин забезпечить поступовий перехід від ін'єкційних вакцин до таких препаратів, що значною мірою полегшить технічні й психологічні аспекти вакцинації.

Останніми роками одержано вакцини, білки яких синтезуються *рослинними клітинами*, що в їх хромосому інтегровано гени окремих вірусів і бактерій. Проходять клінічні випробування такі вакцинні препарати, що містяться в моркві, бананах тощо. Таким чином, незабаром зникне необхідність ін'єкційного методу введення вакцин.

ПОКАЗАННЯ І ПРОТИПОКАЗАННЯ ДО ПРОВЕДЕННЯ ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЩЕПЛЕНЬ.

Планова імунізація проти багатьох інфекцій проводиться всьому населенню, яке не має протипоказань до щеплень.

Проте *залежно від епідеміологічної ситуації у певних регіонах* проводять вакцинацію проти захворювань, які дають епідемічні спалахи (дифтерія).

Має значення і *професійний фактор*. Так, на територіях, де реєструють захворювання на сибірку, лептоспіроз, туляремію, бруцельоз, у першу чергу вакцинують людей, які можуть заразитись у зв'язку з особливостями їх роботи.

Планову вакцинацію дітей і дорослих проводять у терміни, передбачені **Національними календарями щеплень** (табл. 2.).

Протипоказаннями для проведення всіх видів щеплень є гострий гарячковий стан. При імунодефіцитних станах не можна проводити щеплення живими вакцинами (БЦЖ, коровою, паротитною, поліомієлітною). При хронічних захворюваннях нервової системи протипоказано вводити живі корову й паротитну вакцини, АКДП і ДП. Заборонено щеплення вакциною БЦЖ осіб із тяжкими формами алергічних захворювань.

У відповідності до календаря щеплень на території України **обов'язковими є щеплення проти 10 інфекцій**. До 18-річного віку кожна людина має бути вакцинована від **туберкульозу, поліомієліту, дифтерії, кашлюку, правця, кору, краснухи, паротиту, гепатиту В та гемофільної інфекції**. Щеплення проти пневмококової, менінгококової, коронавірусної, ротавірусної інфекції, вітряної віспи, гепатиту А та грипу є перспективними на майбутнє.

Щеплення, які проводяться на ендемічних, ензоотичних територіях і за епідемічними показаннями, передбачають вакцинацію проти туляремії, кліщового енцефаліту, бруцельозу, сибірки, лептоспірозу, сказу та деяких інших захворювань.

Таблиця 2.

Календар профілактичних щеплень в Україні (2018 рік)

Вік	Щеплення проти					
1-й день	-	Гепатит В	-	-	-	-
3-5 день	Туберкульоз	-	-	-	-	-
2 міс.	-	Гепатит В	Дифтерії, кашлюку, правця	Поліомієліту	Гемофільної інфекції	-
4 міс.	-	-	Дифтерії, кашлюку, правця	Поліомієліту	Гемофільної інфекції	-
6 міс.	-	Гепатит В	Дифтерії, кашлюку, правця	Поліомієліту	-	-
12 міс.	-	-	-	-	Гемофільної інфекції	Кору, краснухи, паротиту
18 міс.	-	-	Дифтерії, кашлюку, правця	Поліомієліту	-	-
6 років	-	-	Дифтерії, правця	Поліомієліту	-	Кору, краснухи, паротиту
14 років	-	-	-	Поліомієліту	-	-
16 років	-	-	Дифтерії, правця	-	-	-
26 років	-	-	Дифтерії, правця (надалі – кожні 10 років)	-	-	-

Імунізацію населення здійснюють у спеціальних кабінетах профілактичних щеплень, які розміщуються в поліклініках, дошкільних закладах і школах. До проведення щеплень допускаються спеціально підготовлені медичні працівники, ознайомлені з інструкціями із застосування вакцин, технікою їх введення, порядком надання першої допомоги (при необхідності). Імунізація проводиться під керівництвом лікаря. Усі вакцини необхідно вводити в організм із дотриманням правил асептики й антисептики. Дільнична медична сестра щомісячно відбирає дітей, яких потрібно імунізувати в наступному місяці, з вра-

хуванням існуючого календаря щеплень.

Введення вакцин в організм *людини може* відбуватися різними шляхами - як парентерально (внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньошкірно, скарифікаційно), так і не парентерально (через рот, інтраназально, у свічках, клізмах). Вибір того чи іншого способу введення залежить від багатьох обставин, але в першу чергу - від біологічних властивостей самого вакцинного препарату та від мети його застосування.

Внутрішньом'язове введення. Основним місцем внутрішньом'язового введення визначено верхній зовнішній квадрант сідниці, а також передньозовнішню ділянку стегна. Деякі препарати вводять також у дельтоподібний м'яз. Шкіру в місці ін'єкції препарату до і після введення обробляють 70 % етиловим спиртом.

Підшкірне введення. Основне місце ін'єкції - підлопаткова ділянка або верхня третина зовнішньої поверхні плеча.

Внутрішньошкірне введення. Таким способом вводять вакцину проти туберкульозу БЦЖ. Місце її введення – межа верхньої і середньої третини зовнішньої поверхні плеча. Використовують спеціальні однограмові або туберкулінові шприци й тонкі голки з коротким зрізом. Голку вводять зрізом догори у поверхневий шар шкіри, паралельно до її поверхні. При правильному введенні повинна утворитись папула білого кольору у вигляді “лимонної кірочки” діаметром 7-8 мм, яка зникає через 15-20 хв.

Внутрішньовенне введення. Цим способом в основному вводять імуноглобуліни людини для внутрішньовенного введення - препарати, позбавлені антикомплементарних властивостей. Необхідно суворо витримувати температуру препарату, що вводиться (36-37 °С), його розведення і швидкість введення. Інші імуноглобуліни вводити таким способом не можна. Внутрішній спосіб використовується також при введенні специфічної плазми (антистафілокової, антисиньогнійної, антипротейної).

Нашкірний (скарифікаційний) метод застосовують для щеплення деякими живими бактеріальними вакцинами (бруцельозна, Ку-лихоманки, сибіркова, туляремійна, чумна). На шкіру внутрішньої поверхні передпліччя наносять необхідну кількість крапель вакцини і через них скарифікатором роблять неглибокі надрізи. Кількість крапель, число надрізів, їх довжина і відстань один від одного визначаються інструкцією з застосування конкретного препарату.

Пероральний спосіб вакцинації використовують при щепленні проти поліомієліту, чуми, холери. Ці препарати слід вживати натщесерце.

СЕРОТЕРАПІЯ І СЕРОПРОФІЛАКТИКА.

Часто необхідно терміново попередити розвиток захворювання у людини, яка була в контакті з джерелом інфекції. Такий захист

досягають введенням готових антитіл (іmunних сироваток, імуноглобулінів). Іmunні сироватки та імуноглобуліни використовують і для лікування інфекційних захворювань, особливо тих, при яких вирішальну роль відіграють білкові токсини.

Лікувально-профілактичні сироватки та імуноглобулінові препарати - це лікарські засоби, які містять антитіла, специфічні до певного антигену чи антигенів.

За спрямованістю дії такі сироватки поділяють на:

- антитоксичні;
- противірусні;
- антибактеріальні і
- такі, що специфічні до антигенів іншого походження.

За способом одержання такого роду препаратів вони можуть бути:

- 1) гетерологічними (для лікування людей використовують імуноглобуліни тваринного походження);
- 2) гомологічними (джерелом для отримання таких препаратів є сироватка або плазма людини);
- 3) очищеними імуноглобулінами;
- 4) моноклональними антитілами.

Гетерологічні сироватки отримують шляхом іmunізації тварини, а гомологічні - від вакцинованих людей або осіб, що переохворіли певним інфекційним захворюванням. Чужорідні сироватки та γ -глобуліни, одержані при іmunізації тварин, при введенні людям можуть часом викликати ускладнення (анафілактичний шок, сироваткову хворобу тощо).

Гомологічні сироватки та препарати імуноглобулінів застосовують для профілактики і лікування кору, кліщового енцефаліту, синьогнійної інфекції, протейної, стафілококової та інших інфекцій. Найбільш небезпечним ускладненням після застосування сироваток є **анафілактичний шок**. Симптоми даного ускладнення, яке розвивається, як правило, безпосередньо після ін'єкції препарату, характеризується розвитком гострої серцево-судинної недостатності й бронхоспазму.

Для лікування застосовують протигістамінні препарати, адреналін, препарати кальцію та інші симптоматично діючі препарати.

Для профілактики виникнення анафілактичного шоку перед введенням будь-якої гетерологічної сироватки необхідно обов'язково поставити внутрішньошкірну пробу з розведеною 1:100 сироваткою коня, яка знаходиться у коробці з препаратом (ампула маркована червоним кольором). Розведену сироватку вводять внутрішньошкірно у згинальну поверхню передпліччя в об'ємі 0,1 мл. Облік реакції проводять через 20 хв. **Проба вважається негативною**, якщо діаметр набряку (гіперемії) у місці ін'єкції менший 1 см.

Якщо шкірна проба позитивна, а також при розвитку реакції на підшкірну ін'єкцію 0,1 мл нерозведеної сироватки, препарат застосовують тільки за життєвою необхідністю.

Для десенсибілізації сироватку, розведену 1:100, вводять підшкірно послідовно в об'ємі 0,5 мл, 2 мл, 5 мл з інтервалом 15-20 хв., потім з такими ж інтервалами вводять підшкірно 0,1 мл і 1,0 мл нерозведеної сироватки. При відсутності реакції вводять призначену дозу сироватки.

Одночасно з початком десенсибілізації хворому проводиться протишокова терапія. Завжди необхідно мати напоготові розчин адреналіну 1:1000 або 0,5 % розчин ефедрину.

За призначенням імунні сироватки можуть бути:

- ✓ лікувально-профілактичними і
- ✓ діагностичними.

Антитоксичні сироватки (протиправцева, протидифтерійна, протиботулінові, протигангренозні та ін.) виготовляють у науково-дослідних інститутах шляхом гіперімунізації коней відповідними анатоксинами (дифтерійними, ботуліновими, гангренозними тощо).

У антитоксичних сироваток концентрацію антитіл виражають в антитоксичних одиницях (АО) або в міжнародних одиницях (МО). За одну таку одиницю приймають найменшу кількість сироватки, яка нейтралізує певну кількість DLM відповідного токсину. Для кожного виду сироватки є своє визначення АО (МО). Так, за 1 АО протидифтерійної сироватки приймають найменшу її кількість, яка нейтралізує 100 DLM дифтерійного токсину для гвінейської свинки масою 250 г.

Антимікробні (антивірусні) сироватки виготовляють шляхом гіперімунізації тварин відповідними вбитими бактеріями (вірусами) або їх антигенами.

Нативні імунні сироватки для видалення з них баластних білків і підвищення концентрації антитіл очищають, використовуючи різні фізико-хімічні методи (спиртовий, ферментативний, афінну хроматографію, ультрафільтрацію). Очищені й концентровані імунні сироватки являють собою імуноглобулінові препарати. Нині розробляються нові методи отримання імуноглобулінів (генно-інженерні), збагачених антитілами класів IgA та IgM. Активність сироваткових препаратів може вимірюватись у титрах антитіл: антитоксинів, антигемаглютининів, комплементзв'язуючих та віруснейтралізуючих антитіл.

Розрізняють ***γ-глобуліни специфічної дії*** і ***нормальний у-глобулін***.

До ***γ-глобулінів специфічної дії*** належать: протиправцевий, протидифтерійний, протистафілококовий та інші.

Нормальний ***γ-глобулін*** одержують із плазми крові декількох тисяч здорових донорів і використовують для попередження респіраторних

інфекцій у дітей, для профілактики гепатиту А, епідемічного паротиту, кору, вітрянки.

Очищаючи γ -глобуліни від неспецифічних антитіл, отримують **імуноглобуліни спрямованої дії** (антистафілококовий, проти синьогнійної палички).

Випускають **комплексний імуноглобуліновий препарат** для перорального і ректального введення, який містить IgM, IgG, IgA і характеризується значним вмістом антитіл до ентеробактерій (шигел, сальмонел, ешерихій).

ІМУНОСТИМУЛЯТОРИ ТА ЗАСОБИ КОРЕКЦІЇ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ

Препарати **бактерійного та грибного походження** знайшли широке застосування **для підсилення та корекції імунітету**: атенуйовані мікобактерії *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette - Guerin, BCG*, БЦЖ), коринебактерії *Corynebacterium parvum*, мурамілпептиди з клітинної стінки мікобактерій (мураміловий дипептид) та лактобактерій (глюкозамінілмураміл-пентапептид), ліпополісахариди грамнегативних бактерій, полісахариди (β -глюкани грибів *Lentinus edodes* і *Trametes versicolor*, дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, β -фруктани бактерій *Streptococcus salivarius*), пептиди (дипептид бестатин із гриба *Streptomyces olivoreticuli*).

Імуностимулююча дія таких препаратів спрямована, головним чином, на моноцити та макрофаги, посилюють фагоцитоз, цитотоксичну функцію макрофагів.

Для лікування і профілактики запальних захворювань ротової порожнини, дихальних та сечовивідних шляхів застосовують **препарати на основі лізатів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів**: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida albicans*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella ozaenae*, *K. pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria catarrhalis*, *N. subflava*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysagalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*, *S. viridans* та інших.

Такі лікарські препарати підсилюють неспецифічну резистентність організму, стимулюють вироблення ендogenous інтерферону, інших цитокінів та лізоциму, а також специфічних сироваткових *IgA*, *IgG*, *IgM* та секреторного *IgA*.

У традиційній та народній медицині широко застосовують **препарати рослинного походження** (ехінацея, женьшень, лимонник, елеутерокок, родіола рожева та інші), які стимулюють вроджену резистентність та клітинний імунітет.

Такі засоби відносять до *класу адаптогенів* - препаратів, що полегшують адаптацію (приспосовування) організму до несприятливих фізичних (холод, спека, іонізуюче випромінювання), хімічних (гіпоксія, токсини) та біологічних (мікроорганізми, паразити) факторів, підвищують фізичну та розумову працездатність, стресостійкість.

До імуностимуляторів тваринного походження належать препарати, отримані з клітин кісткового мозку свиней і телят, тимуса й ембріональної тканини великої рогатої худоби, зокрема:

1. *Препарати на основі екстракту тимусу* (тималін, тактивін, вілозен та інші) що забезпечують гуморально-регуляторний зв'язок центральної та периферичної складових імунної системи.

2. *Цитокіни* - імуномодулятори ендogenousного походження, які завдяки наявності у них молекул трьох основних біологічних функцій: прозапальної, протизапальної та імунорегуляторної є *імуномодуляторами*, а не імуностимуляторами.

Для лікування вроджених або набутих імунодефіцитів, (аплазія тимуса, гіпогаммаглобулінемія, агранулоцитоз, септичні стани, генералізовані вірусні інфекції та ін.), призначають *замісну імунокорекцію*. Вона включає пересадку кісткового мозку, тимуса, введення лімфоцитарної та лейкоцитарної маси, людських імуноглобулінів.

Значну частину *синтетичних імуностимуляторів* складають препарати поліпептидної природи: *тимоген, лікопід, імунофан, копаксон*, а також *індуктори ендogenousного інтерферону*, до яких належать *циклоферон, неовір, тилорон, кагоцел*, полудан.

ІМУНОСУПРЕСОРИ

Імуносупресивні засоби мають здатність пригнічувати імунну відповідь організму. Вони набули особливої актуальності у зв'язку зі збільшенням кількості пересадок аlogenних органів, тканин, клітин. Засоби цієї групи мають значно сильніший інгібуючий вплив на первинну імунну відповідь порівняно з вторинною.

Крім іонізуючого випромінювання, до цих чинників належать

- *синтетичні глюкокортикоїди* (преднізон, преднізолон, метилпреднізолон, дексаметазон),
- *алкілюючі препарати* (циклофосфамід, хлорамбуцил),
- *інгібітори синтезу нуклеїнових кислот* (β -меркаптопурин, азатіоприн, метотрексат, мікофенолова кислота), циклоспорин А, гусперимус, лефлюномід, еверолімус,
- *деякі антибіотики-макроліди* (такролімус, сиролімус).

У трансплантології використовують також *поліклональні антилімфоцитарні та антитимоцитарні імуноглобуліни*.

Найсучаснішими імуносупресорами є *генно-інженерні моноклональні антитіла*, які вибірково пригнічують певні імунокомпетентні клітини та блокують цитокіни чи імуноглобуліни.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення терміну «Імунопрофілактика».
2. Дайте визначення терміну «Імуноterapia».
3. Дайте визначення терміну «Імунокорекція».
4. Дайте визначення терміну «Імунотропні засоби».
5. На які групи поділяються імунотропні препарати?
6. На які групи можна розділити заходи щодо профілактики інфекційних захворювань?
7. На які три групи поділяють профілактичні заходи щодо інфекційних хвороб?
8. Дайте визначення терміну «Вакцина».
9. Як поділяються вакцини за способом одержання?
10. З яких процедур складається єдина система випробування і застосування стандартних вакцин
11. Що собою являють вакцини першого покоління?
12. Що собою являють вакцини другого покоління?
13. Що собою являють вакцини третього покоління?
14. Що собою являють вакцини четвертого покоління?
15. Що собою являють живі та атенуйовані вакцини?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 21

Тема: ЗАГАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ. БУДОВА ВІРУСІВ. ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСІВ ІЗ КЛІТИНОЮ.

Навчальна мета

Знати:

- Основні етапи становлення вірусології як науки;
- Будову вірусів;
- Форми взаємодії вірусів із клітиною.

Уміти:

Матеріали і обладнання:

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вірусологія – це наука про віруси – мікроскопічні високомолекулярні частинки, які є у своєрідною паразитарною формою життя.

Віруси кардинально відрізняються від інших мікроорганізмів **5 основними ознаками:**

- відсутністю клітинної організації;
- наявністю лише одного типу нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК);
- відсутністю самостійного обміну речовин;
- унікальним диз'юнктивним способом розмноження (лат. (*disjunctivis* – роздільний, у вірусів нуклеїнова кислота і білки синтезуються у

різних місцях клітини і в різний час, лише після цього відбувається збірка зрілих віріонів);

- здатністю паразитувати на генетичному рівні, тобто включати свій геном до геному клітини-господаря.

Віруси мають дві форми існування:

➤ **позаклітинну** або відпочиваючу (таку, що знаходиться в стані спокою). Синонімами позаклітинної форми є терміни – «вірусна частинка», «віріон», «вірусний корпускул»;

➤ **внутріклітинну** або вегетативну (таку, що розмножується, репродукується). Синонімами внутріклітинної форми є термін – «комплекс вірус-клітина».

Відкриття вірусів. Про існування вірусів вчені догадувалися ще за кілька десятиліть до того, як вони були відкриті. Так, **Луї Пастер**, досліджуючи причини виникнення сказу у 80-х роках XIX століття, не зміг знайти у тілах померлих ніяких організмів, які могли б викликати сказ. Він припустив, що ці мікроорганізми були занадто малі, щоб їх можна було побачити у оптичний мікроскоп.

Дмитро Йосипович Івановський, у 1892 р. вивчаючи тютюнову мозаїку, при якій його листя стає плямистим, виявив, що сік, отриманий із заражених листків, при нанесенні на листя здорових рослин здатний передавати цю хворобу. Він пропустив сік із хворих листків через порцелянові фільтри, пори яких настільки малі, що через них не можуть пройти навіть самі дрібні бактерії. Профільтрований сік як і раніше інфікував здорові рослини. Д. Івановський прийшов до висновку, що існують набагато менші за бактерії організми, які здатні викликати захворювання.

Мартінус Віллем Беєрінк у 1897 році повторив експеримент Івановського. М. Беєрінк перепробував усі доступні на той час мікроскопи, але так і не зміг виявити хоча б що-небудь, що можна було прийняти за збудника цього захворювання. Оскільки спроби виростити культуру цього хвороботворного агента на штучному середовищі також виявилися невдалими, вчений припустив, *що мозаїчна хвороба тютюну викликається якоюсь розчинною отруйною сполукою*, тому і **назвав її вірусом**, оскільки *virus* у перекладі з латинської означав отрута. З тих пір ця назва прижилась. Проте, основоположником науки про віруси, за побажанням М. Беєрінка, вважають Д. Івановського.

Наступним етапом у розвитку вірусології було **встановлення вірусної етіології багатьох антропонозних і зоонозних хвороб**. Так, вже у 1898 р. **Ф. Лефлер і П. Фрош** встановили фільтруємість збудників **ящуру корів**;

- у 1892–1906 рр. **С. Пашен** відкрив автономні елементарні тільця, а **Г. Гуарнієрі** – цитоплазматичні включення в епітеліальних клітинах при натуральній віспі людини;
- у 1898–1903 рр. **В. Бабеш і А. Негрі** виявили тільця-включення у нейронах мозку тварин, які померли від **сказу**;
- у 1908 р. доведено, що вірусними хворобами є:

- **поліомієліт** (К. Ландштейнер і С. Поппер),
- **денге** (П. Ашбері і Ч. Крейч) і
- **лейкоз курей** (В. Еллерман і О. Банг),
- **саркома курей** (Френсю Раус),
- **вітряна віспа** (Х. Арагана і Е. Пашен, 1911 – 1917),
- **кір** (Т. Андерсон і Дж. Гольдберг, 1911)

Друга хвиля відкриття вірусів припадає на 30-ті рр., зокрема:

- У 1933 р. **грип** (У. Сміт, К. Ендрюс і П. Лейдлоу);
- **ендемичний паротит** (К. Джонсон і С. Гудпасчур, 1934);
- **японський комариний енцефаліт** (М. Хаяші, А.С. Смородинцев, 1934–1938);
- **краснуха** (Дж. Хіро, С. Тасака, 1938);
- **Гепатит** (Д. Камероном, Ф. Мак-Каллумом і В. Хавенсом);
- **ослаблена жива вакцина проти жовтої лихоманки** (М. Тейлер 1938р. **(Нобелівська премія, 1951)**).
- На початку 30-х років крім мишей стали використовувати також **курачі ембріони**.
- **Вивчення мікроскопічної будови вірусів** – 50-60 рр. ХХ ст. після вдосконалення електронного мікроскопа.
- Початком **ери сучасної вірусології** стало відкриття у 1949 р. **Ендерса, Уеллера і Роббінса**, які показали, що культури клітин здатні підтримувати ріст вірусу поліомієліту (Нобелівська премія, 1954).
- у 1952 р., коли **Дульбекко** застосував до вірусів тварин **метод бляшок** (Нобелівська премія, 1975);
- У 1970 році **Темін і Балтімор** незалежно один від одного відкрили у **ретровірусів зворотну транскриптазу** (Нобелівська премія, 1975),
- у 1957 році **Гайдушек** припустив, що **хвороба куру** викликається одним з **вірусів повільних інфекцій** (Нобелівська премія, 1976);
- у 1982 р. була встановлена природа повільних інфекцій, коли **Прузинер** продемонстрував, що скрепі викликається інфекційними білками, які він назвав **пріонами** (Нобелівська премія, 1997);
- у 1981 році був виділений **вірус лейкемії Т-лімфоцитів людини** - перший вірус, для якого була встановлена здатність викликати рак у людини,
- у 1983 році **Монтаньє і Галло** виділили **вірус імунодефіциту людини**;
- на початку **ХХІ ст.** вже були описані **6 тисяч вірусів**, а також вивчена їх структура, біологія, хімічний склад і механізми репродукції, а вірусологія перетворилася на величезну область знань, важливу для біології, медицини та сільського господарства.

Структурна організація вірусів дуже проста, зокрема, у них відсутні цитоплазма і ядро, мітохондрії і рибосоми, інші органели і навіть ферменти; Для них характерні 2 форми існування:

- позаклітинна або корпускулярна (віріон) та
- внутрішньоклітинна або репродуктивна;

Для віріонів характерна власна архітектура, генотип, біохімічні та молекулярно-генетичні особливості.

Основні властивості вірусів:

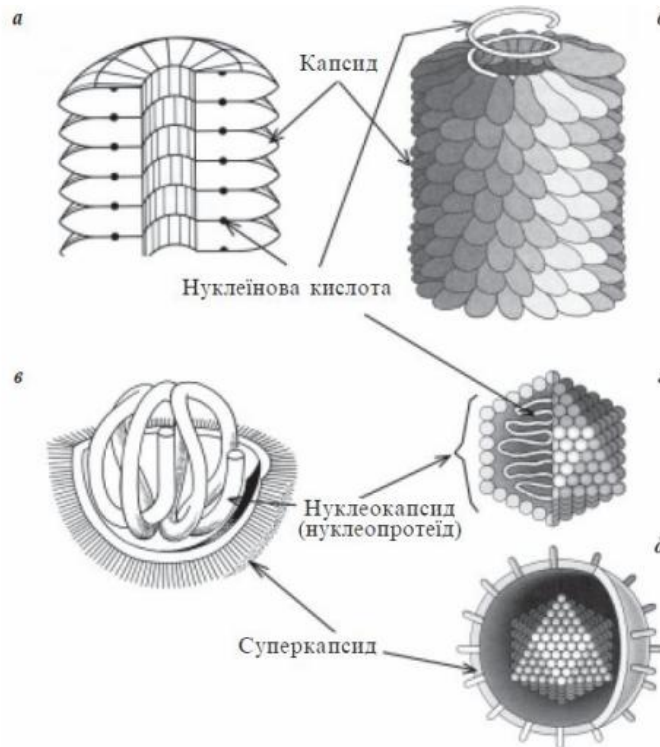
1. Здатні зберігати свою індивідуальність;
2. Забезпечують відтворення свого генотипу і фенотипу;
3. Підтримують свою відокремленість від навколишнього світу;
4. Володіють спадковістю і мінливістю;
5. Еволюціонують за загальними законами всього живого.

За структурою віріонів віруси поділяються на :

- **Прості**, які складаються з нуклеїнової кислоти, оточеної зовні білковою оболонкою, яку називають капсидом;
- **Складні** - мають додаткову зовнішню оболонку (суперкапсид або пеплос).

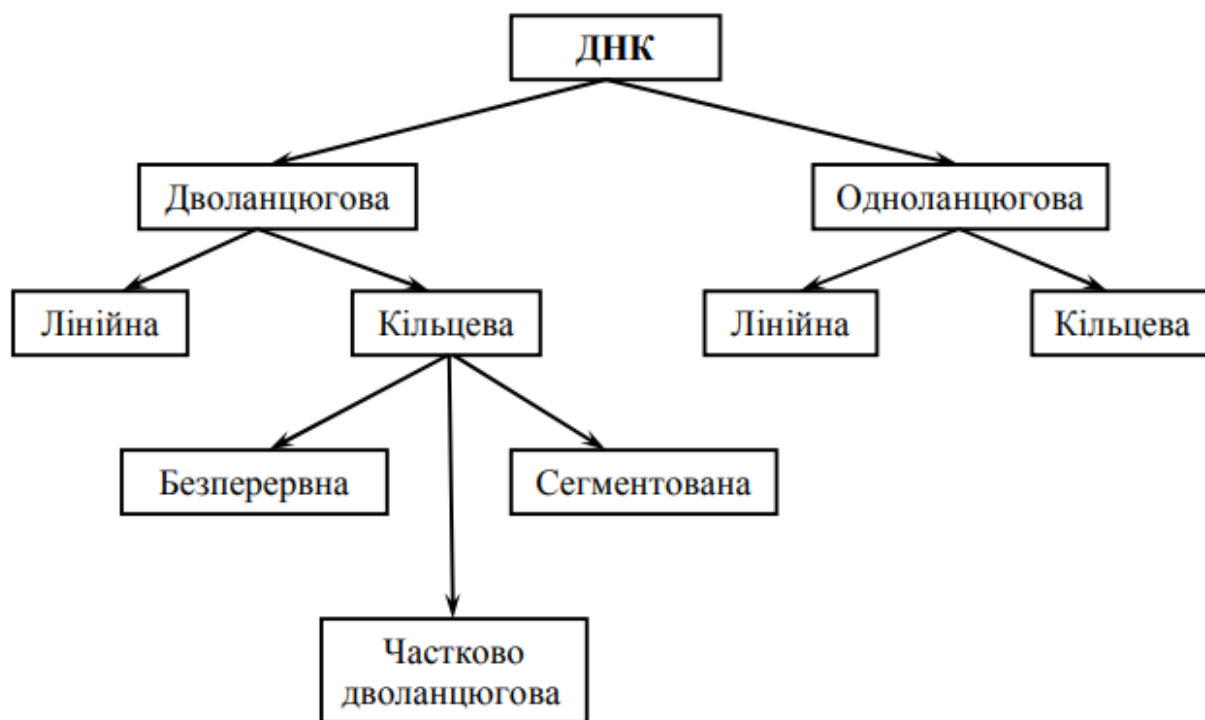
Кожний віріон складається з **нуклеїнової кислоти**, яка називається **нуклеон** (у простих вірусів) або часто, **нуклеоїд** (у складних вірусів), Порівняйте: **нуклеус - в еукаріот, нуклеоїд - у прокаріот**.

Нуклеїнова кислота зв'язана з первинною білковою оболонкою - **капсидом** (лат. *capsa* - вмістилище), Капсид складається із білкових **капсомерів**. **Капсомери** - це утворення з однієї або кількох білкових молекул. Об'єднання нуклеїнової кислоти з капсомерами утворює **нуклеопротеїд (нуклеокапсид)**. За характером розміщення капсомерів виділяють три типи симетрії вірусів – спіральний, кубічний і змішаний тип симетрії (мал. 1).

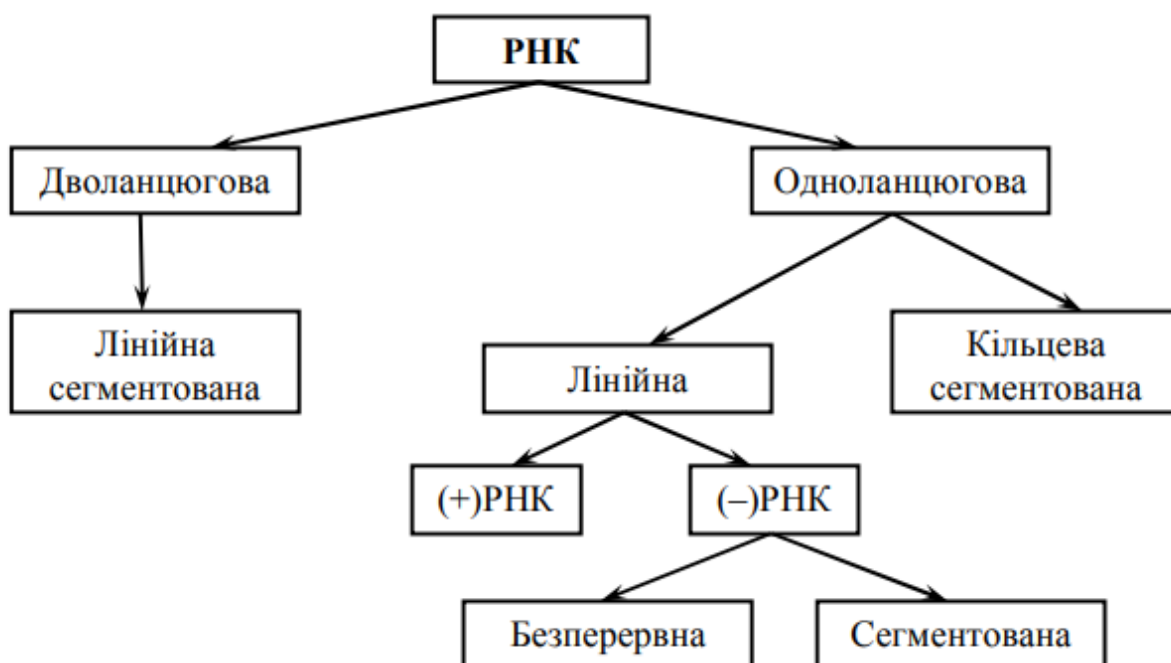


Мал. 1. Схема структури вірусів зі спіральним (а, б, в) та кубічним (г, д) типом симетрії.

Віріони містять лише *один тип нуклеїнової кислоти* - ДНК або РНК;
 близько 20 % усіх вірусів мають ДНК-геном, 80% - РНК-геном;
Форми ДНК- і РНК- вірусів (мал. 2 і 3).



Мал 2. Форми ДНК у ДНК-вмісних вірусів.



Мал 3. Форми РНК у РНК-вмісних вірусів.

Геноми більшості вірусів гаплоїдні, але геном ретровірусів – диплоїдний, тобто складається з двох ідентичних молекул РНК. У геномах,

які містять дволанцюгову ДНК, генетична інформація зазвичай закодована на обох ланцюгах ДНК. Велике значення має здатність ДНК вірусів утворювати кільцеві форми. Така форма забезпечує стійкість ДНК до дії клітинних нуклеаз. Кільцева форма ДНК вірусів є обов'язковою для процесу інтеграції вірусної ДНК з клітинним геномом.

В залежності від будови геному вірусу генетична інформація у них реалізується у декількох напрямках:

- 1) ДНК → іРНК → білок (як у клітинах);
- 2) РНК → білок (позитивний геном);
- 3) РНК → іРНК → білок (негативний геном);
- 4) РНК → ДНК → іРНК → білок (позитивний геном із наявною зворотною транскриптазою);
- 5) олДНК ↔ проміжний длДНК-транскрипт → іРНК → білок.

У природі існує безліч найрізноманітніших вірусів. У наш час для класифікації вірусів використовується комбінація двох систем:

✓ ICTV - Міжнародний комітет з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses) і

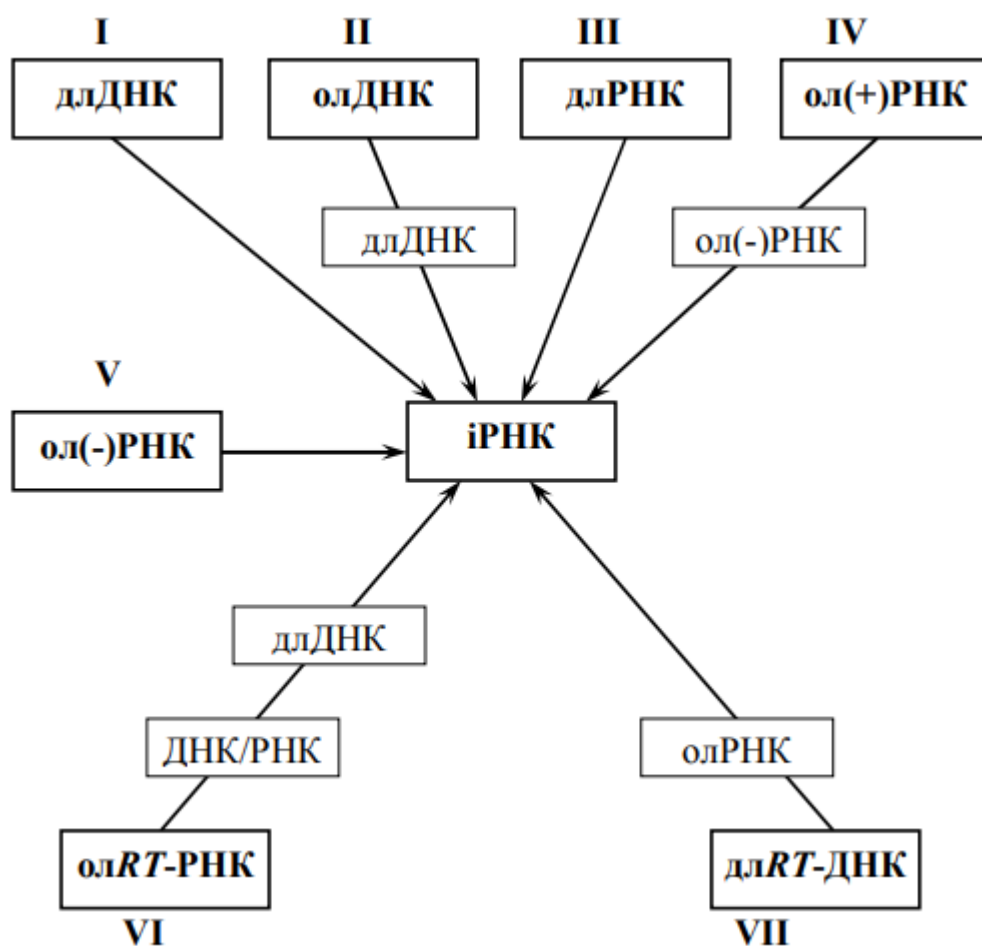
✓ класифікації Балтімора.

Сучасна таксономія вірусів є універсальною для вірусів хребетних, безхребетних, рослин та мікроорганізмів. Формальними **таксонами** у царстві Віра є: · **Порядок** – складається із родин вірусів із загальним еволюційним походженням (-*virales*); · **Родина (підродина)** – об'єднує роди, представники яких мають один тип геному та вихідну структурну організацію вірусної частки (-*viridae*, -*virinae*); · **Рід** – об'єднує віруси на основі стратегії геному, феномену генетичних взаємовідносин, архітектури віріону, кола сприйнятливих організмів, патогенності, географічного поширення та способу передачі (-*virus*); · **Вид** – формально кожний окремий вірус може бути визначений як вид (-*virus*).

Система класифікації вірусів Балтімора була запропонована у 1971 році Нобелівським лауреатом Девідом Балтімором. Згідно даної класифікації віруси поділяються на 7 груп (мал. 4.) в залежності від механізму утворення вірусної іРНК (інформаційної РНК, на якій у рибосомах відбувається синтез білка) у інфікованій клітині.

Взаємодія вірусів із клітинами визначається наявністю у них біологічної спорідненості (тропізму) і специфічних рецепторів. Етапи взаємодії віруса з клітиною наведені у табл. 2.

Щодо процесу вірусного відтворення, то термін “розмноження” зазвичай не вживають, а говорять репродукція (від англ. *reproduce* – відтворення) або реплікація вірусів.



Мал. 4. Схема класифікації вірусів за Балтміором

Таблиця 2.

Етапи взаємодії вірусу з клітиною

№ п/п	Початковий етап (підготовчий період)	Середній етап (латентний період)	Кінцевий етап (заключний період)
1	Адсорбція вірусу на клітині	Транскрипція вірусного геному (синтез іРНК)	Складання віріонів
2	Проникнення вірусу до клітини	Трансляція (синтез вірусспецифічних ферментів і вірусних структурних білків)	Вихід вірусу з клітини
3	Депротейнізація вірусної нуклеїнової кислоти	Реплікація вірусного геному (синтез вірусних нуклеїнових кислот)	

Перший, підготовчий період починається етапом адсорбції вірусу на клітині. Процес адсорбції здійснюється за рахунок комплементарної взаємодії білків вірусу, що прикріплюються до клітинних рецепторів. Взаємодія вірусу і клітини розпочинається з неспецифічної адсорбції віріона на клітинній мембрані, а потім відбувається специфічна взаємодія вірусних і клітинних рецепторів за принципом комплементарності.

Другий етап – проникнення вірусу у клітину – може відбуватися двома основними шляхами. Перший (віропексис) дуже нагадує фагоцитоз і є варіантом рецепторного ендоцитозу. При проникненні вірусу до клітини шляхом злиття мембран відбувається взаємне злиття елементів оболонки вірусу і клітинної мембрани.

Третій період, або депротейнізація – звільнення вірусного геному від суперкапсиду і капсиду («роздягання» віріонів).

Середній етап взаємодії вірусу з клітиною називають **латентним (прихованим)** періодом, оскільки після депротейнізації вірус ніби «зникає» з клітини, його неможливо виявити на електроннограмах. У цьому періоді наявність вірусу виявляється лише за зміною метаболізму клітини-хазяїна.

П'ятий етап репродукції вірусів – складання віріонів може відбуватися по-різному, але в його основі лежить процес самозбирання вірусних компонентів, які транспортуються від місця їхнього синтезу до місця складання.

Шостий етап – вихід вірусу із клітини може відбуватися двома шляхами. Деякі віруси, які не мають суперкапсиду, виходять із клітини за «вибуховим» типом. Клітина при цьому гине.

Інші віруси, які мають ліпопротеїдну вторинну оболонку (віруси грипу), виходять із клітини шляхом відбрунькування з її оболонки. Клітина при цьому може довго зберігати життєздатність.

Можливі **три варіанти вірусної інфекції** у клітині:

I варіант – **продуктивна**, або вірулентна інфекція;

II варіант – **персистуюча** інфекція вірусу в клітині, коли відбувається дуже повільна продукція нових віріонів з виходом їх із клітини, але інфікована клітина довго зберігає життєздатність;

III варіант – **інтегративний** тип взаємодії вірусу і клітини, при якому відбувається інтеграція вірусної нуклеїнової кислоти у клітинний геном. При цьому здійснюється фізичне включення молекули вірусної нуклеїнової кислоти в хромосому клітини хазяїна.

У випадку інтеграції вірусного геному в клітинний вірусна нуклеїнова кислота реплікується разом із клітинною під час поділу клітин. Вірус у формі **провірусу** може довго зберігатися у клітині за рахунок постійної реплікації. Такий процес дістав назву **вірогенія**.

Вірогенія забезпечує своєрідну форму **зберігання вірусної генетичної інформації**. З іншого боку, інтеграція вірусного геному в клітинний **може призвести до пухлинної трансформації інфікованої клітини**, тобто інтегративний тип взаємодії вірусу і клітини є **паразитуванням вірусу на генетичному рівні**.

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Ознайомлення із спеціальним обладнанням, середовищами та реактивами вірусологічних лабораторій.

Контрольні питання:

1. Як і ким були відкриті віруси?

2. Як віруси отримали свою назву?
3. Які є відмінності між вірусами і мікроорганізмами?
4. Що таке віруси?
5. Коли почався розвиток вірусології як науки?
6. Охарактеризуйте основні етапи розвитку вірусології.
7. Коли стало можливим досліджувати молекулярну структуру вірусів?
8. Якими дослідниками були відкриті нетипові вірусні агенти – пріони?
9. Які форми існування характерні для вірусів?
10. Що таке віріон, капсид, кор?
11. Якої форми бувають віріони?
12. Чим відрізняються прості і складні віруси?
13. Які типи симетрії мають віріони в залежності від характеру розміщення капсомерів?
14. Які ви знаєте системи класифікації вірусів?
15. Які таксони виділені у царстві *Vira*?
16. Що таке порядок, родина, рід та вид?
17. Які ви знаєте етапи взаємодії віруса з клітиною?
18. Чому спосіб репродукції вірусів отримав назву диз'юнктивного?
19. Охарактеризуйте етап адсорбції віруса на поверхні клітини.
20. Яким чином вірус може проникати до клітини?
21. Що таке депротейнізація віруса?
22. Чим характеризується латентний період взаємодії віруса з клітиною?
23. Якими шляхами може відбуватись вихід віруса з клітини?
24. Які є можливі варіанти розвитку вірусної інфекції?
25. Чому вірогенія забезпечує своєрідну форму зберігання вірусної генетичної інформації?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 22

Тема: ЗАГАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ. МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ.

Знати:

- методи індикації та ідентифікації вірусів;
- типи та особливості вірусних інфекцій.

Уміти:

- відібрати назофаренгеальний матеріал на дослідження при гострих респіраторних вірусних інфекціях;
- підготувати вірусовмісний матеріал для транспортування до лабораторії;
- заражати курячі ембріони вірусовмісним матеріалом.

Матеріали і обладнання: овоскоп, свіжі харчові курячі яйця, курячі ембріони на 8–9-й та на 20–21-й добі інкубації, таблиці, відеофільм (за можливості), екскурсія до вірусологічної лабораторії (за можливості), розчин

Хенкса, розлитий у пробірки по 0,5 см³, стерильні сухі тампони для носа та зіва, стерильні шпателі для зіва, клейка стрічка, бланки направлень, пластикові пакети різного розміру (з урахуванням розміру пробірок), вата, термоізолюючий контейнер, пакет для направлень.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Діагностика вірусних хвороб ґрунтується на **клінічних діагностичних засадах і методах**, що відомі з курсу пропедевтики, однак існують певні особливості.

Так, під час обстеження хворого інфекційного профілю додатково до інших видів анамнезу збирають *епідеміологічний анамнез* – відомості про можливість передачі збудника інфекції від джерела інфекції до хворого, можливі фактори (шляхи) передачі збудника, тривалість інкубаційного періоду.

Отримана інформація дає змогу з допомогою епідеміологічного аналізу за певних інфекційних хвороб (сказ, кір та ін.) швидко встановити діагноз (часто остаточний).

Методи *неспецифічної лабораторної та інструментальної діагностики* переважно такі самі, як і в інших галузях медицини (вимірювання температури, тиску, пульсу, частоти дихання, аускультация грудної та черевної порожнин, загальний аналіз крові, сечі та калу).

Проте, за діагностики інфекційної хвороби є можливість підтвердити діагноз шляхом виявлення та ідентифікації самого збудника, а також розвитку імунних реакцій у відповідь на потрапляння збудника в організм (вироблення антитіл, реакції гіперчутливості та ін.).

У лабораторній діагностиці вірусних хвороб застосовують спеціальні методи з метою:

- 1. Виявлення збудника (ів) у досліджуваному матеріалі:**
 - **мікроскопічний** (світлова мікроскопія, імунофлуоресцентна мікроскопія; електронна мікроскопія);
- 2. Виділення збудника у чистій культурі** або культурі клітин чи на лабораторних тваринах:
 - **вірусологічний** (посів на курячий ембріон, у культурі клітин або тканин);
 - **біологічний** (уведення біологічного матеріалу хворого в організм лабораторних тварин з метою спричинити в них розвиток інфекції, виділити збудника у великій кількості для ідентифікації та вивчення його властивостей);
- 3. Виявлення антитіл проти збудників інфекційних хвороб:**
 - **серологічний** (виявлення антитіл в сироватці крові хворого у реакції аглютинації (РА), в реакції зв'язування комплементу (РЗК), в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), імуноферментним аналізом (ІФА) тощо);
- 4. Виявлення антигенів вірусів** чи тілець-включень вірусів, нуклеїнових кислот мікроорганізмів за допомогою:

- РІФ (реакція імунофлуоресценції) або МФА (метод флуоресціюючих антитіл),
- ІФА (іmunно-ферментний аналіз),
- РІА (радіо-іmunний аналіз),
- ПЛР (полімеразно-ланцюгова реакція), молекулярне клонування тощо);

5. **Виявлення геному збудника вірусної інфекції за допомогою молекулярно-генетичних методів (полімеразно-ланцюгової реакції).**

МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ.

Розроблення методів культивування вірусів мало надзвичайно велике значення для розвитку вірусології. Спершу для їх культивування використовували зараження різних тварин, але цей метод не дозволяв отримувати чисту культуру вірусів.

Оскільки *віруси не ростуть на штучних поживних середовищах*, потрібно було винайти прості та доступні методи їх культивування.

Великим досягненням вірусології стала пропозиція **Е. Гудпасчура** використовувати з цією метою *курячі ембріони*.

Але не всі віруси можуть в них розмножуватись, тому проблему культивування вірусів було вирішено тоді, коли було розроблено способи культивування клітин людини і тварин поза організмом.

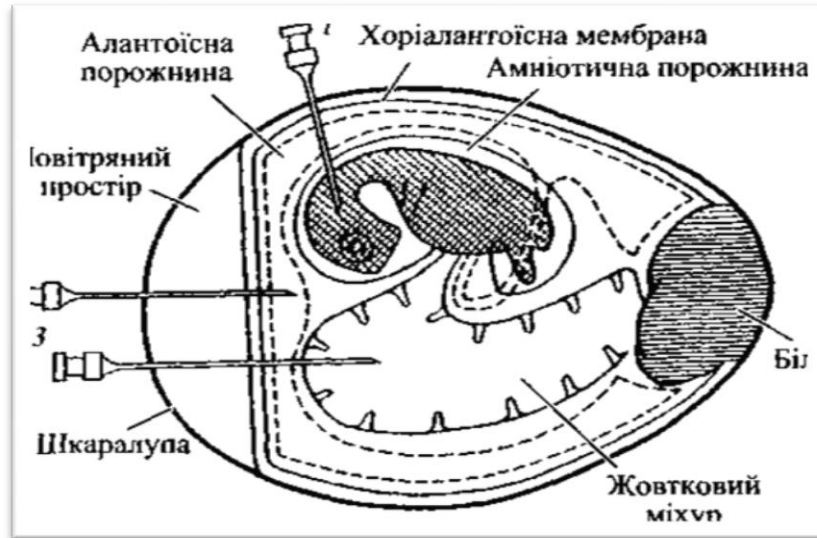
Здатність клітин макроорганізму рости поза організмом було виявлено ще у 1907 р.

Спочатку використовували *метод переживаючих тканин*. Для цього шматочки тканини поміщали у колбу з поживним середовищем. Деякі тканини в таких умовах могли залишатися живими (але не розмножуватися) до 30 діб, і в клітинах цих тканин могли розмножуватися віруси. Цей метод давав дуже малий вихід вірусів.

Необхідно було створити такі умови, за яких клітини тканин могли б розмножуватись. Для цього слід було вирішити чотири головні проблеми:

- 1) отримати вільні (ізольовані одна від одної) клітини;
- 2) створити такі поживні середовища й умови, в яких ці клітини могли б активно розмножуватися;
- 3) забезпечити умови, за яких у цих клітинах не розмножувалися б бактерії;
- 4) розробити методи індикації (виявлення росту) та ідентифікації (визначення виду) вірусу в культурі цих клітин.

Всі ці проблеми було вирішено у 40–50-х роках ХХ ст.



Мал. 1. Способи зараження курячих ембріонів з метою виявлення та виділення чистих культур деяких патогенних вірусів.

Для виділення чистих культур вірусів найчастіше використовують:

- зараження курячих ембріонів,
- первинно-трипсинізовані,
- перещеплювані та
- диплоїдні культури клітин.

Первинно-трипсинізовані — отримують із подрібнених тканин людини та тварин шляхом їх обробки трипсином чи іншими ферментами. Витримують лише 5-10 поділів (пасажів).

Перещеплювані — клітини, які набули здатності до безмежного розмноження, оскільки є похідними пухлин людини та тварин.

Напівперещеплювані (диплоїдні) — можуть витримувати до 100 пасажів, зберігаючи при цьому вихідний диплоїдний набір хромосом.

Методи індикації вірусів. Індикацію вірусів здійснюють за їх цитопатичною дією, яку можна виявити:

- методом бляшкоутворення або
- за допомогою мікроскопії моношару клітин,
- за зміною кольору індикатора в поживному середовищі із зараженою культурою клітин,
- за допомогою реакцій гемаглютинації та гемадсорбції.

Методи ідентифікації вірусів. Визначення типу вірусу ґрунтується на **нейтралізації його біологічної активності** за допомогою типоспецифічних сироваток.

Кінцевий результат методу нейтралізації можна оцінити на основі таких ознак:

- 1) нейтралізація цитопатичної дії вірусу;
- 2) нейтралізація реакції гемадсорбції;
- 3) гальмування реакції гемаглютинації;
- 4) зміна прояву кольорової проби (ІФА);

- 5) нейтралізація біологічної дії вірусу у досліді на тваринах.
Крім того, для ідентифікації виділених культур вірусів використовують:
- ✓ РІФ, коли для ідентифікації виділеної культури вірусу застосовують мічені ФІТЦ специфічні сироватки, а також
 - ✓ молекулярно-генетичні методи (ДНК-зондів, ПЛР).

ХІД РОБОТИ

Завдання 1. Виділення вірусів на курячих ембріонах.

Перевагою курячих ембріонів є їх доступність для будь-якої вірусологічної лабораторії, порівняно невисока вартість і простота в роботі.

Використовують **курячі ембріони віком від 5 до 12–14 діб**. Вік ембріонів, спосіб їх зараження та термін отримання максимальної кількості вірусів залежить від біологічних властивостей вірусів і їх тропізму.

Перед зараженням курячі яйця витримують у термостаті **за температури 37 °С і 60–70% відносної вологості** (у термостат ставлять лотки з водою). Щоб ембріональні оболонки не злипалися, **яйця в термостаті повертають кілька разів на добу**. Через деякий час яйця овоскопують для визначення життєздатності ембріонів. Показником їх життєздатності є наявність самостійних рухів, добре виражений судинний малюнок, пульсація судин. Під час овоскопії на шкаралупі роблять позначки (межу повітряного мішка, місце розміщення ембріона – «темне око» ембріона тощо).

Існує декілька **способів зараження курячого ембріона** (мал. 1):

- ✓ у порожнину амніона й алантоїса,
- ✓ у жовтковий мішок,
- ✓ на хоріоалантоїсну оболонку.

Перед зараженням шкаралупу яйця протирають підпаленим спиртовим тампоном, потім 2 % спиртовим розчином йоду. Стерильною голкою для внутрішньом'язових ін'єкцій у шкаралупі роблять прокол і вводять в ембріон 0,1–0,2 см³ матеріалу, що досліджується. Для дослідження одного виду матеріалу заражають не менше 4 курячих ембріони. Отвір від голки закривають парафіном або лейкопластиром.

Після зараження ембріони інкубують у термостаті, **розміщуючи їх тупим кінцем догори**. Температура і тривалість інкубації залежать від біологічних властивостей вірусу.

Після закінчення інкубації ембріони охолоджують з метою досягнення максимального звуження кровоносних судин: при –10...–18 °С протягом 1–2 год, або при 4 °С протягом 16–18 год.

Розтин курячого ембріона проводять у стерильних умовах. Охолоджені яйця ставлять на підставку тупим кінцем догори, дезінфікують шкаралупу спиртом і розчином йоду, потім вирізають у ній отвір над повітряним мішком вище за позначену його межу.

Індикацію вірусу проводять на основі виявлення **вірусспецифічних ушкоджень** (посилення судинного малюнка його оболонки, гіперемії,

крововиливів), а також *появи специфічних утворень у вигляді бляшок чи віспин*.

Наслідком репродукції вірусу є затримання розвитку або загибель курячого ембріона.

Ідентифікацію вірусу проводять лише *за допомогою серологічних реакцій*. Для цього використовують реакцію ІФА, РІА, РГГА, РН, РЗК та ін.

Завдання 2. Ознайомлення з упаковкою та умовами транспортування вірусомісного матеріалу до лабораторії.

Для транспортування до вірусологічної лабораторії вірусомісний матеріал упаковують у пробірки, які щільно закривають кришками, що закручуються. Крім того, верх пробірки разом із кришкою заклеюють водонепроникною клейкою стрічкою або лейкопластиром. Цю пробірку потім кладуть у пластиковий пакет відповідного розміру разом із невеликою кількістю адсорбуючого матеріалу, наприклад, ватою (мал. 3). Пластиковий пакет закривають на «замок», заклеюють чи запаюють.

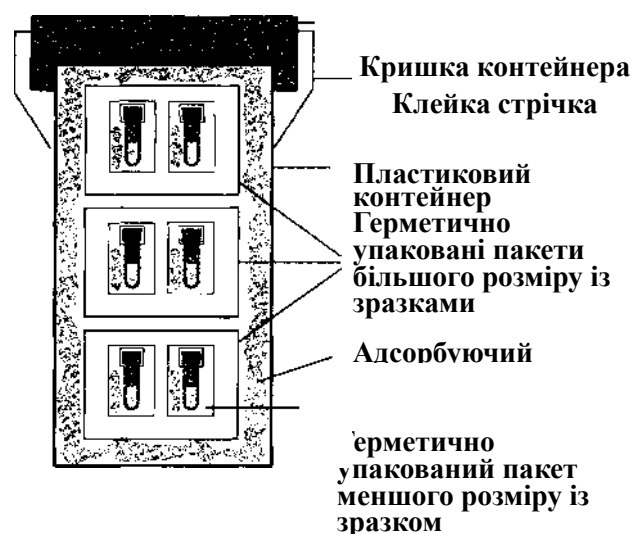
Всі матеріали повинні бути двічі упаковані, тому підготовлені пакети поміщають у пластикові пакети більшого розміру. Якщо від одного пацієнта відбирають декілька

зразків, їх пакують окремо у пакети меншого розміру, а в пакет більшого розміру можна покласти всі зразки від одного пацієнта. Зразки, отримані від різних пацієнтів, пакують окремо у різні пакети більшого розміру.

Зразки, що упаковані у два пластикові пакети, кладуть у пластиковий транспортний контейнер і закривають кришкою, що закручується. Верхню частину контейнера і кришку заклеюють лейкопластиром. Двічі упаковані зразки від одного чи різних пацієнтів транспортують в одному пластиковому контейнері. У цей контейнер також кладуть адсорбуючий матеріал. Направлення приклеюють до зовнішньої стінки контейнера. Щільно закриті з заклесними кришками контейнери кладуть у термоізолюючий контейнер, який пристосований для транспортування біологічних матеріалів (мал. 3).

Упаковка зразків має повністю відповідати спеціальній інструкції міжнародного агентства ІАТА № 650 з упаковки і транспортування небезпечних вантажів.

У термоізолюючому контейнері повинні бути заморожені холодильні елементи або інші пластикові пакети з льодом (але не з сухим льодом!). Його



Мал. 3. Пластиковий контейнер для транспортування матеріалу, що містить віруси

також заклеюють широкою клейкою стрічкою. На термоізолюючому контейнері вказують ім'я та адресу відправника, ім'я та адресу отримувача, а також інші необхідні та застережучі написи.

Контрольні запитання:

1. Який метод ЛД (лабораторної діагностики) використовують для виявлення збудників вірусних хвороб (ВХ) у досліджуваному матеріалі?
2. Які методи ЛД використовують для виділення збудників ВХ у досліджуваному матеріалі?
3. Які методи ЛД використовують для виявлення антитіл проти збудників ВХ?
4. Який із методів лабораторної діагностики ВХ є найефективнішим?
6. В чому полягає суть мікроскопічного методу виявлення збудників ВХ?
7. В чому полягає суть імунофлуоресцентного методу?
8. В чому полягає суть вірусологічного методу?
9. В чому полягає суть біологічного методу?
10. В чому полягає суть серологічного методу?
11. Який із методів лабораторної діагностики ВХ є найдостовірнішим?
12. В чому полягає суть реакцію нейтралізації за діагностики ВХ?
13. З якою метою проводять культивування вірусів?
14. Які методи виділення чистих культур вірусів використовують у сучасних вірусологічних лабораторіях?
15. Що таке первинні (або первинно-трипсинізовані) культури клітин? Як їх отримують?
16. Що таке перещеплювані культури клітин? З чого їх отримують?
17. Що таке диплоїдні клітини? У якому разі їх використовують?
18. Які середовища використовують для вирощування культур клітин і для підтримання їх життєздатності?
19. На основі яких ознак можна оцінити кінцевий результат методу нейтралізації?
20. Як проводять зараження культури клітин вірусами? За якими ознаками проводять індикацію та ідентифікацію вірусів у культурі клітин?
21. Як проводять виділення вірусів на курячих ембріонах?
22. Назвіть основні способи зараження курячого ембріона.
23. Яким вимогам повинна відповідати упаковка вірусомісного матеріалу?
24. У яких умовах транспортують і зберігають вірусомісний матеріал?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 23

Тема: ЗАГАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ. ВИДІЛЕННЯ І ТИТРУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ. ФАГОТИПУВАННЯ ЯК МЕТОД ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВИДІЛЕНИХ КУЛЬТУР.

Навчальна мета

Знати:

- Суть і способи фаготипування виділених культур мікроорганізмів;

Уміти:

- Поставити реакцію фаготипування стафілокової культури із типоспецифічними фагами.

Матеріали і обладнання: Кювети, спиртівки, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, шпателі, груші для посівів, стерильний фізрозчин у пробірках і колбах, чисті культури стафілококів на МПБ і МПА, МПБ і МПА (в пробірках, в чашках і розплавлений та охолоджений до 50 в колбах по 100 мл), водяна баня, термостат, холодильник, набір типоспецифічний стафілококових фагів, дезінфекційний розчин (3 % розчин хлораміну) у високих стаканах.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Уперше спонтанний лізис бактерій описав **М. Ф. Гамалія** в 1898 р. Детальніше явище розчинення дизентерійних бактерій якимось невідомим агентом дослідив канадський мікробіолог **Ф. д'Ерель** у 1917 р. Він назвав цей агент **бактеріофагом** (*bacteriophaga* – той, що пожирає (руйнує) бактерії).

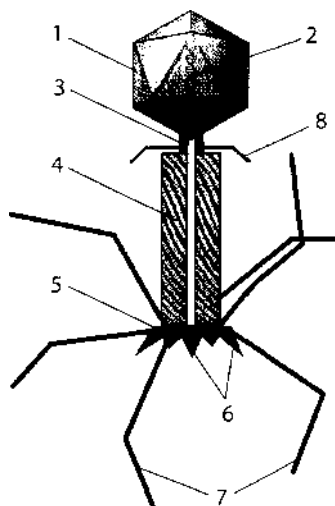
На основі вивчення феномену бактеріофагії були вирішені дуже важливі проблеми молекулярної біології та генетики. Зокрема, **бактеріофаги** виявились основною моделлю для дослідження

- тонкої структури гена,
- універсальності генетичного коду,
- впливу радіації на спадкові структури організмів.

Відомі на сьогодні **бактеріофаги за своїми морфологічними особливостями** поділено на 6 груп.

- У I групи входять *ниткоподібні фаги*,
- у II - *сферичні*;
- у III - *сферичні з рудиментом хвостика*,
- у IV - з *коротким хвостиком*,
- у V - з *довгим хвостиком, який не скорочується*,
- у VI - з *довгим хвостиком, який скорочується*.

Найкраще вивчена VI група фагів, наприклад, T-парні фаги кишкової палички. Вони мають форму сперматозоїда і складаються з гексагональної головки, в якій міститься нуклеїнова кислота, хвостового відростка (стрижня, оточеного білковим чохлам), базальної пластинки з фібрилами-рецепторами (мал. 1).



Мал. 1. Схема будови бактеріофага 6-ї морфологічної групи:

1 - головка; 2 - ДНК; 3 - стрижень; 4 - чохол; 5 - базальна пластинка; 6 - шипи; 7 - хвостові фібрили; 8 - комірець

Між головою та хвостиком розташований комірець, а на кінці хвостика є 6-кутова базальна пластинка, від якої відходять 6 шипів (зубців) і 6 ниток (фібрил). За допомогою шипів і фібрил бактеріофаг прикріплюється на поверхні бактеріальної клітини. Розмір головки 60-100 нм. Її двошарова оболонка утворена капсомерами, які оточують одну щільно скручену молекулу ДНК. Порожнистий відросток довжиною 100-200 нм служить для прикріплення до поверхні бактеріальної клітини та її інфікування. Адсорбується фаг на клітині за допомогою базальної пластинки та фібрил-рецепторів.

Хімічний склад фагів, як і інших вірусів, представлений нуклеїновою кислотою, білками, невеликою кількістю ліпідів у оболонці.

Переважає більшість (більше 90 %) *фагів містить ДНК* і лише окремі - РНК. За своїм складом фагові нуклеїнові кислоти не відрізняються від аналогічних структур інших мікроорганізмів і вірусів. В середині головки є невелика кількість "внутрішнього білка". У дистальній частині відростка, під чохлом, міститься *фермент лізоцим*, який відіграє велику роль у проникненні фагової нуклеїнової кислоти в бактеріальну клітину.

Розмножуючись у бактеріях, бактеріофаги викликають їх загибель і лізис. При цьому лізис бактерій під впливом фагів характеризується строгою специфічністю. *Для кожного виду як патогенних, так і сапрофітних мікроорганізмів існує свій індивідуальний бактеріофаг, який вибірково діє лише на "свій" мікроб.*

Ця вибіркова спеціалізація дії може бути спрямована тільки на певну різновидність (або навіть певний штам), *що має велике значення для ідентифікації збудників інфекційних хвороб*, їх окремих фаговарів.

Це допомагає епідеміологам і клініцистам встановити джерело інфекції та намітити раціональні шляхи для її профілактики.

Такі високоспеціалізовані бактеріофаги називають *монофагами*.

Але в природі існують і *поліфаги*, які здатні лізувати кілька близьких

між собою видів бактерій.

Бактеріофаги стійкі до дії багатьох факторів зовнішнього середовища. Зокрема, вони витримують високий тиск, зберігають активність при дії іонізуючого та рентгенівського випромінювання, а також широкий діапазон рН - 2,5-8,5. Однак **вони швидко втрачають свої властивості при кип'ятінні, дії дезінфікуючих розчинів та ультрафіолетових променів.**

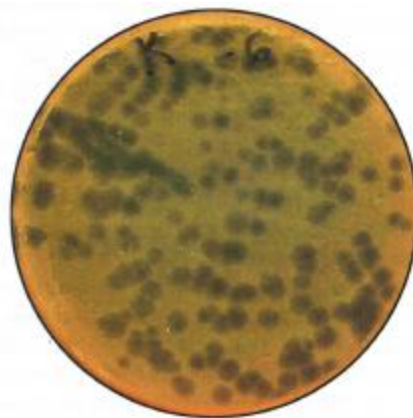
Феномен бактеріофагії можна спостерігати як на рідких, так і на щільних поживних середовищах.

Інфекційну активність бактеріофагів визначають за допомогою титрування.

Титрування в рідкому середовищі здійснюють **за методом Аппельмана** (роблять серійні розведення бактеріофага в рідкому поживному середовищі, після чого в кожен пробірку вносять культуру чутливих до даного фага бактерій. Відзначають **найвище розведення, де ще відбувається лізис бактерій**).

Більш точним (визначення окремих фагових частинок) є **метод агарових шарів за Граціа**.

Суть методу полягає в наступному. Спочатку в чашку Петрі наливають шар 2 %-ного поживного агару. Після застигання агару на нього вміщують 2 мл розплавленого і охолодженого до 45 °С 0,7 %-го агару, в який попередньо додають краплину концентрованої суспензії бактерій і певний об'єм суспензії бактеріофага. Після застигання верхнього шару агару чашку інкубують у термостаті. Бактерії розмножуються всередині м'якого, верхнього шару поживного агару, утворюючи суцільний непрозорий фон, на якому добре видимі колонії фага у вигляді прозорих плям – **бляшок** (мал. 2). За розміром, формою бляшки різних видів бактеріофагів можуть бути різними. Крім того, у генетичних варіантів одного виду бактеріофага бляшки також розрізняються, що дозволяє використовувати цей метод у молекулярно-генетичних дослідженнях.



Мал. 2. Бляшки бактеріофага MS2 на газоні *E. coli* (за методом Граціа)

Залежно від наслідків взаємодії фагів з бактеріальною клітиною, вони поділяються на **вірулентні** та **помірні**.

Вірулентні бактеріофаги проникають всередину клітини,

спричиняючи її лізис. Взаємодія їх з клітиною складається з ряду етапів, які притаманні практично всім вірусам.

Коли з клітиною взаємодіють **помірні бактеріофаги**, частина клітин залишається не ушкодженою ними, тому що спостерігається **явище лізогенії** – інтеграції геному бактеріофага в геном клітини.

Такий вмонтований в хромосому клітини фаг називають **профагом**.

Бактерії з профагом називаються **лізогенними бактеріями**, і при дії деяких факторів (іонізуючого й ультрафіолетового випромінювання, мутагенів) вони втрачають свою лізогенність і здатні до продукції помірною фага.

Лізогенізація має велике біологічне значення й поширена у мікробному світі. Бактерії під впливом бактеріофагів можуть суттєво змінювати свої біологічні властивості. Таке явище називають **фаговою конверсією**.

Доведена можливість **перетворення нетоксигенних дифтерійних паличок у токсигенні під впливом лізогенізації їх помірним бактеріофагом**, який несе у своєму геномі *tox+*-гени. Саме вони забезпечують синтез дифтерійними паличками сильного екзотоксину і спричинення захворювання дифтерії.

Доведена **роль бактеріофагів у забезпеченні продукції токсинів збудниками ботулізму, стафілококами** та іншими бактеріями.

В деяких випадках під впливом помірних бактеріофагів можуть змінюватись **антигенні властивості бактерій** кишкової групи, вібріонів, ферментативна активність мікробів, їх резистентність до антибіотиків.

Помірні бактеріофаги нагадують плазміді. Їх використовують як моделі для вивчення актуальних проблем генетики мікроорганізмів, у генно-інженерних дослідженнях і біотехнологічних процесах.

Бактеріофаги широко розповсюджені у природі. Вони зустрічаються в будь-яких середовищах довкілля: ґрунті, воді, стічних водах – всюди, де є відповідні їм види мікроорганізмів. Фаги знайдено в кишечнику та виділеннях людей, тварин, птахів, плазунів, риб. Відповідно звідси в навколишнє середовище потрапляють бактеріофаги численних збудників інфекційних захворювань: черевного тифу та паратифів, сальмонельозів, ешерихіозів, дизентерії, холери та ін.

Одержують бактеріофаги :

- з лізогенних культур мікроорганізмів, або
- з навколишнього середовища, заражаючи досліджуваним матеріалом відповідні бактерії.

Для цього досліджуваний матеріал центрифугують для осадження твердих частинок, а надосадову рідину в об'ємі 1 мл вносять у 30 мл м'ясо-пептонного бульйону, який попередньо засіяний 1 мл 6–18-годинної культури бактерій. Через 18–24 год. інкубації при температурі 37 °С посів фільтрують через бактеріальний фільтр і титрують за методом Аппельмана або Грація (принципи методів викладено вище).

Титруючи фаги за методом Грація, після добової інкубації підраховують число “негативних” колоній бактеріофагів (бляшок). Кількість цих плям відповідає кількості фагів у засіяній суспензії. Виходячи з цього, можна підрахувати число фагових частинок в 1 мл вихідної суспензії (**титр бактеріофагів**): число колоній множать на розведення бактеріофагів. Наприклад, при розведенні 10^4 з’явилося 50 колоній, отже, титр фагів дорівнює: 50×10^{-4} або 5×10^{-5} в 1 мл.

Для визначення титру бактеріофагів за методом Аппельмана готують ряд пробірок із м’ясо-пептонним бульйоном, в яких розводять досліджуваний фаг (табл. 1).

Таблиця 1. Титрування бактеріофагів за методом Аппельмана

Компоненти	Пробірки										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Культури	Фага
М’ясо-пептонний бульйон	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Досліджуваний фаг	0,5	→	→	→	→	→	→	→	→	↑	–	0,5
Розведення	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	–	–
Суспензія мікроорганізмів	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Облік результатів												

Після цього в них додають по 0,05 мл індикаторних мікроорганізмів (культури бактерій). Паралельно готують контрольні пробірки: одну - з культурою бактерій без фага, а другу – з бактеріофагом без мікробів. Посіви інкубують при 37 °С протягом 18–24 год. Бактеріофаги за цих умов інкубування викликають лізис бактерій, і середовище в пробірці залишається прозорим. **Титром бактеріофага** вважають найбільше його розведення, яке викликає повний лізис бактерій.

Оскільки фаги мають специфічну літичну дію на мікроорганізми, їх можна використовувати для **фагоіндикації** – визначення виду відповідних бактерій в інфекційному матеріалі та об’єктах зовнішнього середовища.

З цією метою у дві пробірки з м’ясо-пептонним бульйоном засівають досліджувану культуру бактерій. Потім в одну з них додають кілька крапель індикаторного фага. Пробірки інкубують при оптимальній температурі протягом 18–24 год. Порівнюють мутність бульйону в контрольній та дослідній пробірках і роблять висновок про чутливість мікроорганізмів до літичної дії бактеріофагів.

Або на щільне поживне середовище газonom засівають досліджувану культуру бактерій. Після підсушування чашок на них бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять краплю робочого розведення бактеріофага, яке вказується на ампулі. Посіви інкубують у термостаті при 37 °С протягом 18-24 год. і враховують наявність прозорих круглих плям, які свідчать про літичну дію бактеріофага. Позитивний результат свідчить про належність бактерій до певного виду.

Фаготипування бактерій проводять з метою аналізу епідеміологічної ситуації для визначення джерела інфекції. Найчастіше його виконують при діагностиці стафілококових, кишкових та інших інфекцій. Цей метод ґрунтується на використанні специфічної чутливості бактерій до своїх бактеріофагів, що свідчить про спільне (тотожне) походження бактерій, які мають однаковий фаготип.

В основі тесту лежить визначення фаговаріантів (фаговарів) збудників. Для цього чашку з м'ясо-пептонним агаром поділяють на квадрати за числом досліджуваних бактеріофагів. Вирощують 4-годинну бульйонну культуру досліджуваного штаму і 1 мл її засівають на поверхню середовища. Розподіляють рівномірно культуру по поверхні середовища і надлишок її зливають. Чашку підсушують у термостаті при 37 °С протягом 30–40 хв. і на поверхню чашки в кожний квадрат капають піпеткою бактеріофаги відповідних (робочих) розведень, яке вказується на ампулі із бактеріофагом. Посіви ставлять у термостат або залишають при кімнатній температурі протягом 18–20 год., після чого оцінюють результати. Облік результатів проводять на темному фоні за допомогою лупи. Залежно від ступеня чутливості культури до бактеріофагів виділяють **різні ступені лізису бактерій**, який оцінюється за чотириплюсовою системою: від лізису, який зливається, до його відсутності.

Враховуючи, що чутливість бактерій до фага є достатньо постійною ознакою, порівнюють фаготипи до досліджуваних культур з фаготипом мікробів, які було виділено від вірогідного джерела інфекції. При їх збігові роблять висновок про виявлене джерело інфекції

ХІД РОБОТИ

Задання 1. Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою бактеріофагів.

Бактеріофаги мають виражену специфічну літичну дію на окремі види мікроорганізмів. **Фагова приналежність** є маркером, що дозволяє встановити ідентичність штамів, навіть у випадку коли інші характеристики змінилися. Цю особливість використовують для визначення їх виду. Так, для фаготипування *S. aureus* існує міжнародний набір фагів, який включає 21 фаготип, які в свою чергу об'єднані у 5 фагогруп (I–V).

Техніка фаготипування зводиться до наступного.

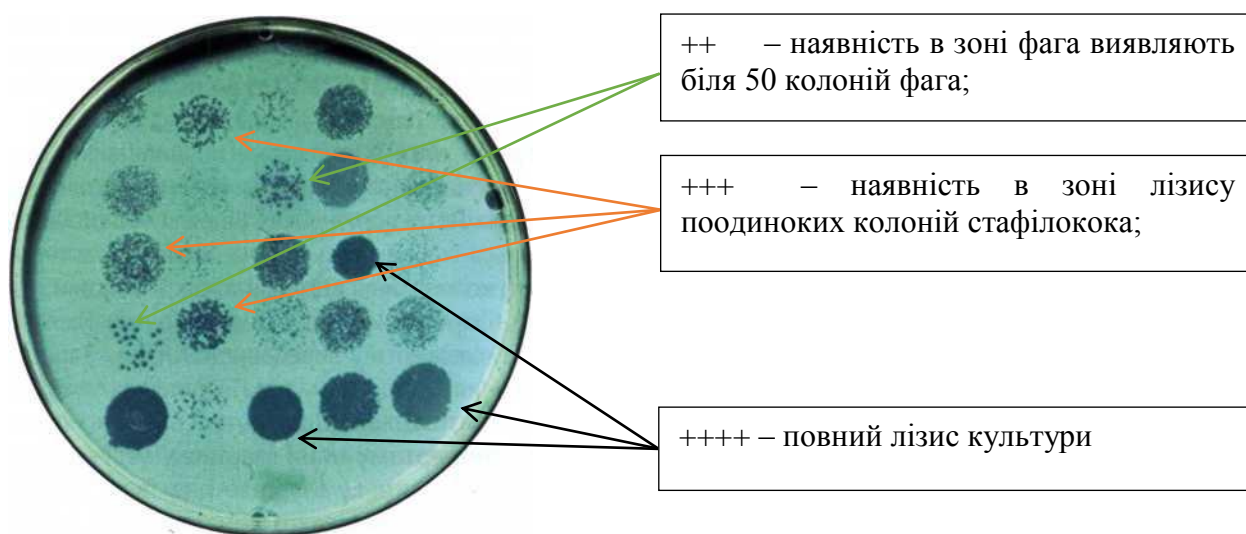
1-й спосіб. З цією метою у **дві пробірки з м'ясо-пептонним бульйоном** засівають досліджувану культуру бактерій. Потім в одну з них додають декілька крапель індикаторного фага. Пробірки інкубують при оптимальній температурі протягом 18–24 год. Порівнюють мутність бульйону в контрольній та дослідній пробірках і роблять висновок про чутливість мікроорганізмів до літичної дії бактеріофагів.

2-й спосіб. Можна з цією метою використати **щільне поживне середовище**, на яке газоном засівають досліджувану культуру бактерій. Після

підсушування чашок на них бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою наносять краплю відповідного розведення бактеріофага, яке вказане на ампулі. Посіви інкубують у термостаті при 37 °С протягом 18–24 год. і фіксують наявність прозорих круглих плям, які свідчать про літичну дію бактеріофага. Позитивний результат свідчить про належність бактерій до певного виду.

Фаготипування мікроорганізмів проводять з метою аналізу епідеміологічної ситуації для визначення джерела інфекції. Найчастіше його виконують при діагностиці стафілококових, кишкових та інших інфекцій.

В основі тесту лежить визначення фаговаріантів (фаговарів) збудників. Для цього дно чашки з м'ясопептонним агаром по числу набору бактеріофагів поділяють на квадрати. Вирощують чотиригодинну бульйонну культуру досліджуваного штаму і 1 мл її засівають на поверхню середовища. Розподіляють рівномірно культуру по поверхні середовища і надлишок її видаляють. Чашку підсушують у термостаті при 37 °С протягом 30–40 хв. і на поверхню агару в кожний квадрат капають піпеткою бактеріофаги відповідних розведень. Посіви ставлять у термостат або залишають при кімнатній температурі протягом 18–20 год., після чого оцінюють результати. Облік результатів проводять на темному фоні за допомогою лупи.



Мал. 1. Фаготипування стафілококів.

Залежно від ступеня чутливості культури до бактеріофагів виділяють різні ступені лізису бактерій, який оцінюється за чотириплюсовою системою:

- ++++ – повний лізис культури;
- +++ – наявність в зоні лізису поодиноких колоній стафілокока;
- ++ – наявність в зоні фага виявляють біля 50 колоній фага;
- + – повна відсутність лізису колоній стафілококу.

Враховуючи, що чутливість бактерій до фага є достатньо постійною ознакою, порівнюють фаготипи досліджуваних культур з фаготипом мікробів, який було виділено від вірогідного джерела інфекції. При їх збігу роблять висновок про виявлене джерело інфекції.

Контрольні запитання:

1. Дайте визначення терміну «бактеріофаг».
2. Назвіть імена вчених, які причетні до відкриття бактеріофагів.
3. Назвіть всі основні групи, на які діляться бактеріофаги за своїми морфологічними особливостями.
4. Опишіть будови бактеріофага 6-ї морфологічної групи.
5. В чому полягає відмінність між монофагами і поліфагами?
6. За допомогою яких методів визначають інфекційну активність бактеріофагів?
7. В чому полягає їх суть основних методів титрування фагів?
8. Що розуміють під терміном «титр бактеріофага»?
9. Що стається із бактеріальною клітиною у разі її інфікування вірулентним фагом?
10. Що стається із бактеріальною клітиною у разі її інфікування помірним фагом?
11. Дайте визначення терміну «профаг».
12. Дайте визначення терміну «лізогенія».
13. Дайте визначення терміну «лізогенна бактерія».
14. З яким явищем у загальній вірусології асоціюється явище лізогенії?
15. Яке явище називають фаговою конверсією?
16. Як поширені бактеріофаги в природі і яка їх загально біологічна роль?
17. В чому полягає суть фагоіндикації?
18. В чому полягає суть фаготипування?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Основна

1. Медична мікробіологія вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищих мед. навч. закладів / за ред. В.П. Широбокова. 3-тє вид., оновл. та допов. Вінниця : Нова Книга, 2021. 920 с.

2. Практична мікробіологія: Посібник / С.І. Климнюк, І.О.Ситник, В.П. Широбоков; за ред. В.П. Широбокова і С.І. Климнюка. Вінниця : Нова книга, 2018. 576 с.

3. Люта В.А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник / В.А. Люта, О.В. Кононов. К.: ВСВ «Медицина», 2017. 576 с.

4. Посібник з медичної вірусології / [За ред. проф. В.М. Гиріна.] - К.: Здоров'я, 1995. 472 с.

5. Medical microbiology, virology and immunology : a textbook for English-speaking students of higher medical schools translation from ukr. Published / T.V. Andrianova, V.V. Bobyr, V.V. Danyleichenko, etc. Vinnytsia : Nova Knyha, 2019. 744 p.

6. Review of Medical Microbiology and Immunology, 12 edition/ Warren E. Levinson / McGraw-Hill Prof Med.-Tech., 2012. 688 p.

Додаткова

1. Практична мікробіологія: навчальний посібник / С.І. Климнюк, І.О. Ситник, В.П. Широбоков ; за ред. В.П. Широбокова, С.І. Климнюка: Вінниця : Нова Книга, 2018. 576 с.

2. Данилейченко В.В. Мікробіологія з основами імунології: підручник для медичних вузів / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук . 2-ге вид., перероб. та доп . Київ : Медицина, 2009 . 391 с.

3. Практична мікробіологія: навчальний посібник / С.І. Климнюк, І.О. Ситник, М.С. Творко, В.П. Широбоков. Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. 440 с.

Підписано до друку . .2025. Формат 60×84 1\16
Ум. Друк. Арк. __,__. Замовлення № ____. Наклад 100.
Папір офсетний. Гарнітура Times. Друк офсетний.

Друк ФОП Іванюк В. П.
43021, м. Луцьк, вул Винниченка, 65.
Свідоцтво Держкомінформу України
ВЛн № 31 від 04.02.2004 р.