

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ, ІМУНОЛОГІЇ ТА ЕПІДЕМІОЛОГІЇ

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ
З МЕДИЧНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ
ТА ІМУНОЛОГІЇ
(Модулі 1, 2)



ДНІПРОПЕТРОВСЬК 2010

Кременчуцький Г.М., Крушинська Т.Ю., Степанський Д.О., Юргель Л.Г., Турлюн С.Я., Шарун А.В., Смотров Н.Г. Практичні заняття з медичної мікробіології, вірусології та імунології (Модулі 1, 2). – Дніпропетровськ: ДДМА, 2010. – 288 с.

Навчально-методичний посібник створено відповідно до типової навчальної програми з дисципліни «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» для студентів вищих медичних закладів освіти III- IV рівнів акредитації, які навчаються за спеціальностями «Лікувальна справа», «Педіатрія» та «Медико-профілактична справа».

Зміст посібника відповідає сучасному рівню мікробіологічної науки, а його структура - вимогам методичного забезпечення навчального процесу за кредитно-модульною системою. Посібник містить методичні розробки до двох модулів: «Морфологія і фізіологія мікроорганізмів. Інфекція. Імунітет. Загальна і спеціальна вірусологія» - 22 теми, та «Спеціальна, клінічна та екологічна мікробіологія» - 16 тем. Матеріал до кожного заняття включає формулювання загальної та конкретних цілей, завдання для вхідного та вихідного контролю знань, орієнтовну основу дії для виконання практичних завдань, зразок протоколу роботи, граф - схему логічної структури теми, рекомендовану літературу. Надаються також еталони відповідей до контрольних завдань. Посібник можна використовувати як для організації роботи студентів на заняттях, так і для самостійної позааудиторної підготовки з відповідних тем.

Для викладачів та студентів вищих медичних навчальних закладів IV рівня акредитації.

Рецензенти:

доктор біологічних наук, професор А.І.Вінников - завідувач кафедри мікробіології та вірусології Дніпропетровського національного університету;

доктор медичних наук, професор С.І.Климнюк - завідувач кафедри медичної біології, мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського державного медичного університету ім.І.Я.Горбачеського.

**затверджено ЦМК з ВМО МОЗ України
протокол №5 від 28.12.20010**

З М І С Т

| | |
|---|----------|
| Методичні вказівки до проведення занять та критерії оцінювання роботи студентів..... | 7 |
|---|----------|

МОДУЛЬ 1

| | |
|--|-----------|
| Практичне заняття № 1.1 | |
| Тема: Організація бактеріологічної лабораторії. Мікроскопія. | 8 |
| Практичне заняття № 1.2 | |
| Тема: Морфологія і структура бактерій. Барвники і прості методи фарбування. | 13 |
| Практичне заняття № 1.3 | |
| Тема: Морфологія і структура бактерій. Фарбування бактерій за методом Грама..... | 20 |
| Практичне заняття № 1.4 | |
| Тема: Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів. Складні методи фарбування | 26 |
| Практичне заняття № 1.5 | |
| Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення чистих культур аеробних бактерій. | 33 |
| Практичне заняття № 1.6 | |
| Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення та ідентифікація чистих культур анаеробних бактерій. | 41 |
| Практичне заняття № 1.7 | |
| Тема: Мікробіологічні основи стерилізації та дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації..... | 48 |
| Практичне заняття № 1.8 | |
| Тема: Генетика мікроорганізмів..... | 53 |
| Практичне заняття № 1.9 | |
| Тема: Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики..... | 59 |
| Практичне заняття № 1.10 | |
| Тема: Неспецифічні фактори захисту організму | 68 |

| | |
|---|------------|
| Практичне заняття № 1.11 | |
| Тема: Серологічні реакції (I заняття) | 74 |
| Практичне заняття № 1.12 | |
| Тема: Серологічні реакції (II заняття)..... | 83 |
| Практичне заняття № 1.13 | |
| Тема: Вакцини та сироватки. | 90 |
| Практичне заняття № 1.14 | |
| Тема: Імунний статус організму. Імунопатологія. | 97 |
| Практичне заняття № 1.15 | |
| Тема: Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. | |
| Репродукція вірусів. Бактеріофаги..... | 106 |
| Практичне заняття № 1.16 | |
| Тема: Методи культивування та індикації вірусів | 111 |
| Практичне заняття № 1.17 | |
| Тема: Серологічні реакції в вірусології..... | 116 |
| Практичне заняття № 1.18 | |
| Тема: Ортоміксовіруси. Лабораторна діагностика грипу. | |
| Параміксовіруси. Лабораторна діагностика кору..... | 123 |
| Практичне заняття № 1.19 | |
| Тема: Аденовірусна і герпесвірусна інфекція. Мікробіологічна | |
| діагностика адено- і герпесвірусної інфекції. | 130 |
| Практичне заняття № 1.20 | |
| Тема: Пікорнавіруси. Лабораторна діагностика ентеровіру | |
| сних інфекцій. Рубовіруси. Лабораторна діагностика сказу. | 137 |
| Практичне заняття № 1.21 | |
| тема: Віруси гепатитів. Мікробіологічна діагностика | |
| вірусних гепатитів..... | 143 |
| Практичне заняття № 1.22 | |
| ТЕМА: Збудники ВІЛ-інфекції..... | 149 |

МОДУЛЬ 2

Практичне заняття № 2.1

Тема: Мікробіологічна діагностика стафілококових та стрептококових інфекцій. 156

Практичне заняття № 2.2

Тема: Мікробіологічна діагностика менінгококових, гонококових та пневмококових інфекцій 164

Практичне заняття № 2.3

Тема: Ешеріхії. Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених кишковою паличкою. Шигели. Мікробіологічна діагностика дизентерії..... 173

Практичне заняття № 2.4

Тема: Сальмонели. Мікробіологічна діагностика тифо-паратифозних захворювань та сальмонельозних гастроентеритів. 181

Практичне заняття № 2.5

Тема: Мікробіологічна діагностика харчових токсико-інфекцій та інтоксикацій. 188

Практичне заняття №2.6

Тема: Вібріони. Мікробіологічна діагностика холери. Хелікобактерії. Мікробіологічна діагностика хелікобактеріозів..... 195

Практичне заняття №2.7

Тема: Мікробіологічна діагностика дифтерії, кашлюку та паракашлюку..... 203

Практичне заняття № 2.8

Тема: Мікобактерії..... 210

Практичне заняття №2.9

Тема: Мікробіологічна діагностика клостридальних анаеробних інфекцій. 216

Практичне заняття №2.10

Тема: Мікробіологічна діагностика спірохетозів 222

| | |
|---|------------|
| Практичне заняття № 2.11 | |
| Тема: Рикетсії, хламідії, мікоплазми. Мікробіологічна | |
| діагностика рикетсиозів, хламідіозів та мікоплазмозів..... | 229 |
| Практичне заняття № 2.12 | |
| тема: Мікробіологічна діагностика зоонозних інфекцій | 236 |
| Практичне заняття № 2.13 | |
| Тема: Патогенні гриби та актиноміцети. | |
| Мікробіологічна діагностика мікозів та актиномікозів..... | 241 |
| Практичне заняття №2.14 | |
| Тема: Клінічна мікробіологія | 248 |
| Практичне заняття № 2.15 | |
| Тема: Санітарна мікробіологія..... | 261 |
| Практичне заняття № 2.16 | |
| Тема: Нормальна мікрофлора організму людини. | |
| Дисбактеріоз. Пробіотики..... | 270 |
| Еталони відповідей до завдань для самоперевірки і | |
| самоконтролю вихідного рівня знань-умінь..... | 278 |

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТЬ ТА КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

Запропоновані методичні розробки передбачають наступний план проведення занять. На початку заняття перевіряється вхідний рівень знань-умінь (перевірка виконання домашнього завдання за еталонами відповідей). Потім шляхом тестового контролю перевіряється засвоєння необхідного теоретичного матеріалу. Розуміння методики проведення дослідів з'ясовується у ході опитування. Після цього студенти приступають до практичних завдань, хід виконання яких контролюється викладачем. Отримані результати фіксуються у протоколі, проводиться їхній аналіз, робляться висновки, які заносяться до протоколу. Для узагальнення та систематизації отриманих теоретичних знань та практичних навичок, студенти виконують навчаючі завдання, отримані результати обговорюються. Заняття завершується підведенням підсумків самостійної та аудиторної роботи студентів, оцінка студента виводиться на підставі результатів всіх видів робіт з опрацювання даної теми.

Технологічна карта практичного заняття
(розраховано на 3 академічні години – 120 хвилин)

| № | Етапи | Час (хв.) | Засоби навчання | Обладнання та матеріали | Місце |
|---|--|-----------|---|--|-------------------|
| 1 | Організаційна частина | 3-5 | | | НАВЧАЛЬНА АУДИТІЯ |
| 2 | Перевірка вихідного рівня знань-умінь | 10-15 | Завдання для діагностики базового рівня знань-умінь | | |
| 3 | Перевірка засвоєння теоретичних питань. Корекція знань. | 20-25 | Тести (рекомендовано використання банку тестів до ліцензійного іспиту "Крок1"). Граф логічної структури, таблиці за темою | | |
| 4 | Перевірка готовності до виконання практичних завдань | 5-10 | Інструкція (ООД) | | |
| 5 | Самостійна практична робота під контролем викладача | 45-50 | Інструкція (ООД), зразок протоколу. | Мікробіологічне обладнання та матеріали в залежності від теми заняття. | |
| 6 | Узагальнення та систематизація отриманих теоретичних знань та практичних навичок | 15-20 | Навчальні завдання | | |
| 7 | Підведення підсумків заняття. Оцінювання роботи студентів. | 10-12 | | | |

МОДУЛЬ 1

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.1

ТЕМА: ОРГАНІЗАЦІЯ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ. МІКРОСКОПІЯ.

Актуальність теми. Бактеріологічні дослідження з діагностики інфекційних хвороб та санітарного контролю навколишнього середовища проводяться у спеціальних науково-практичних установах - мікробіологічних лабораторіях, які функціонують, в тому числі, при клінічних лікарнях та санітарно-епідеміологічних станціях. При роботі у мікробіологічній лабораторії необхідно дотримуватися умов та правил, які гарантують працівникам та оточуючим безпеку від можливого зараження.

Однією з важливих ознак, що використовується для індикації та ідентифікації мікроорганізмів, є їх морфологічні особливості. Вони дозволяють в більшості випадків визначити сімейство, до якого відноситься виявлений мікроорганізм, а іноді його рід і, навіть, видову приналежність. Таким чином мікроскопічний метод дослідження дає можливість поставити попередній або, навіть, остаточний діагноз. Для вивчення морфології бактерій застосовуються різні види мікроскопії.

Мета (загальна): Познайомитися з обладнанням та режимом роботи бактеріологічної лабораторії. Порівняти роботу різних типів мікроскопів.

Конкретні цілі – уміти:

1. Дотримуватись правил безпеки в бактеріологічній лабораторії.
2. Характеризувати призначення підрозділів та основного обладнання бактеріологічної лабораторії.
3. Пояснювати принцип дії різних видів мікроскопів.
4. Розраховувати збільшення мікроскопу.
5. Мікроскопувати готові мазки за допомогою імерсійної системи.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Трактувати основні фізичні характеристики світлових хвиль (кафедра фізики).
2. Пояснювати залежність коефіцієнту заломлення світлових хвиль від оптичних властивостей середовища (кафедра фізики).
3. Будувати схеми ходу променів в оптичних приладах (кафедра фізики).
4. Готувати до роботи світловий мікроскоп, пояснювати призначення окремих елементів його оптичної та механічної системи (кафедра медичної біології).
5. Пояснювати фізичні принципи роботи електронного мікроскопу (кафедра фізики).

Для того, щоб ви могли усвідомити чи відповідає вихідний рівень ваших знань – умінь необхідним вимогам, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання №1. Що означає термін «роздільна здатність»? Яку роздільну здатність має людське око? Як вона змінюється із застосуванням оптичного приладу?

Завдання №2. Схематично зобразити хід променів через об'єкти та окуляр мікроскопу. Пояснити, яке зображення буде отримано.

Завдання №3. Що відбувається при проходженні світла через середовища з різною оптичною щільністю? Яку властивість повинна мати імерсійна рідина?

Завдання №4. Деякі патогенні мікроорганізми, наприклад грибки, що уражують волосся, володіють природною здатністю до люмінесценції. У чому полягає це фізичне явище? Чи можна використовувати люмінесцентний мікроскоп для виявлення мікроорганізмів, які не мають власної люмінесценції?

Завдання №5. Чому у світловий мікроскоп принципово не можливо побачити об'єкт, менший за 0,2 мкм, а електронний мікроскоп дає таку можливість?

Інформацію для поповнення знань – умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Н.М. Ливенцев. Курс фізики для медвузів. М.: Медицина, 1974. С. 435-450
2. А.Н. Ремизов. Курс фізики, електроніки і кібернетики для медичинських інститутів. М.: Медицина 1982. С.336-350
3. Медична і біологічна фізика /Під ред. проф. О.В. Чалого. Київ: Вища школа, 2005. С.520-558

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Побудова біологічного мікроскопу з імерсійним об'єктивом. Порядок роботи з мікроскопом, розрахунок збільшення та роздільної здатності.
2. Відмінності темнопольної мікроскопії, її призначення.
3. Принцип фазово-контрасної мікроскопії, необхідне обладнання. Для чого використовується цей метод мікроскопії?
4. Принцип дії люмінесцентної мікроскопії, для чого використовується люмінесцентна мікроскопія.
5. Будова електронного мікроскопу і принципи електронної мікроскопії.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиологія. М.: Медицина, 2005. С. 3-30.
2. Вороб'єв А.А. і др. Микробиологія.- М.: Медицина, 1998. С. 3-7.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 3-19.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Вороб'єва.- М.:ООО "Медицинское информационное агенство", 2008 - С.310-316.
5. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С.24-30, 56-69, 83-93.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графіологічна структура теми: "Обладнання та режим роботи бактеріологічної лабораторії". Мікробіологічний метод дослідження (додаток №1).

Матеріали та обладнання: мікроскоп, імерсійне масло, готові фіксовані препарати мікроорганізмів.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи

1. Оглянути підрозділи мікробіологічної лабораторії, які існують на кафедрі (ознайомлення може бути також за допомогою таблиць або відеофрагментів), звернути увагу на наявне устаткування, з'ясувати його призначення. Уважно оглянути робоче місце лаборанта-мікробіолога, роздивитися найбільш використовувані інструменти та лабораторний посуд.

У протоколі відмітити підрозділи бактеріологічної лабораторії, основне обладнання, вказати призначення.

2. Ретельно вивчити правила техніки безпеки при роботі у мікробіологічній лабораторії за наведеною інструкцією

Техніка безпеки у бактеріологічній лабораторії:

а) заборонено – палити, приймати їжу.

б) робоче місце повинно бути чистим. Особисті речі зберігати в спеціальних місцях.

в) в разі потрапляння зараженого матеріалу на стіл, підлогу та ін. ці місця обробити дезинфікуючим розчином.

г) реєстрація, зберігання, нагляд та знищення патологічних мікробів повинно бути зроблено за спеціальною інструкцією.

д) по закінченню роботи необхідно старанно вимити руки, а при необхідності обробити дезинфікуючим розчином.

Зіставити вивчені правила із своїми спостереженнями під час виконання попереднього завдання. У протокол записати основні чинники небезпеки, що мають місце у бактеріологічній лабораторії.

3. Ознайомитися з основними видами мікроскопії:

а) темнопольна мікроскопія заснована на явищі дефракції світла при великому боковому освітленні виважених в рідині найдрібніших частинок. Це досягається за допомогою параболоїд або кардіоїд – конденсатора.

б) фазово - контрастна мікроскопія заснована на перетворенні змін по фазі, які виникають при проходженні світової хвилі через фазові (прозорі) об'єкти, в зміні по амплітуді які видимі оком. Позитивним фазовим контрастом називають темне забарвлення об'єктів в світлому полі зору, негативним фазовим контрастом – світле забарвлення об'єкту на темному фоні. Для фазово-контрасної мікроскопії використовують звичайні мікроскопи і фазово – контрастні пристрої КФ-1 або КФ-4.

в) люмінесцентна (флюорисцентна) мікроскопія основана на явищі фотолюмінесценції. Люмінесцентне випромінювання речовин виникає після дії на них якихось джерел енергії: світла, електричних променів, іонізуючого випромінювання, фотолюмінісценція - люмінісцюючого об'єкту під впливом світла.

Первинна люмінісценція – без пофарбування об'єктів, вторинна – (наведено) після фарбування препаратів спеціальними фарбами флюорохромами. Переважно - можливо виявлення живих бактерій в невеликих кількостях.

г) електронна мікроскопія дозволяє виявити об'єкти, розміри яких лежать за межами роздільної можливості світлового мікроскопа (0,2 мкм). Електронний мікроскоп використовується для вивчення вірусів, макромолекулярних

структур і інших субмікроскопічних об'єктів. Світлові промені в таких мікроскопах замінюють потоком електронів, які мають прискорення, довжину хвилі біля 0,005 нм., тобто в 1000000 разів коротше довжини хвилі видимого світла. Окрім цього використовують скануючі електронні мікроскопи які дозволяють рельєфно зображати поверхні об'єкту.

Відмітити у протоколі основні види мікроскопії та вказати фізичні принципи, на яких вони базуються.

4. Розглянути під мікроскопом готові фіксовані препарати мікроорганізмів.

Мікроскопія мазків за допомогою імерсійної системи : на підготовлений мазок наноситься крапля імерсійного масла, який ставиться на предметний столик, після чого повернути револьвер до відмітки імерсійного об'єктиву *90, потім опускати тубус мікроскопа до поглиблення об'єкту в краплю масла; встановити орієнтировочний фокус при допомозі макрогвинта; провести завершу-юче фокусування предмета макрогвинтом, повертаючи його в межах тільки одного оберту. Не припускаючи сплюснення об'єктиву з препаратом, так як це може визвати пошкодження препарату або фронтальної лінзи. Після закінчення роботи з мікроскопом спеціальною ганчіркою протерти масло з імерсійного об'єктиву і привести револьвер на малий сухий об'єктив *8.

Записати до протоколу етапи мікроскопії при використанні мікроскопу з імерсійною системою.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ході проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

- 1.** У навчальній лабораторії при дослідженні суспензії калу хворого черевним тифом студент розлив патологічний матеріал на лабораторному столі. Що необхідно зробити, щоб виправити цю недбалість?
- 2.** Вивчити морфологію бактерій, пофарбованих мазків використовують імерсійну систему світлового мікроскопу. За якою ознакою можна відрізнити імерсійні об'єкти?
- 3.** Студент одержав завдання вивчити морфологію бактерії у пофарбованому мазку. Для цього він помістив препарат на предметний столик мікроскопу, вибравши об'єкти зі збільшенням *40. Освітивши поле зору, знайшов забарвлення, встановив чіткість мікрогвинтом і пересунув кілька колів, зробив висновок, що розгледіти мікропрепарат майже неможливо. В чому помилився студент? Чому йому не вдалося детально розгледіти форму мікроорганізмів в препараті?

Графологічна структура теми:
“Обладнання та режим роботи в бактеріологічній лабораторії.”

Тема: Обладнання та режим роботи в бактеріологічній лабораторії.



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 1**

Тема: Організація бактеріологічної лабораторії. Мікроскопія.

Завдання № 1. Організація бактеріологічної лабораторії.

а). основні підрозділи бактеріологічної лабораторії:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

б) обладнання бактеріологічної лабораторії та його призначення:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

Завдання № 2. Техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії

Основні небезпечні чинники при виконання мікробіологічних досліджень:

- A. _____
- Б. _____
- В. _____
- Г. _____

Завдання № 3. Види мікроскопії

- A. _____
- Б. _____
- В. _____
- Г. _____

Завдання № 4. Порядок мікроскопії готових фіксованих препаратів:

- A. _____
- Б. _____
- В. _____
- Г. _____
- Д. _____
- Е. _____

Дата _____

_____ Підпис викладача

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.2
ТЕМА: МОРФОЛОГІЯ І СТРУКТУРА БАКТЕРІЙ. БАРВНИКИ І
ПРОСТІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ.

Актуальність теми. Прості методи фарбування дозволяють оцінити форму, розміри бактеріальних кліток і їхнє взаємне розташування. Правильно приготовлений препарат для мікроскопії і правильний метод його фарбування можуть вирішувати проблему точного встановлення діагнозу і призначення потрібного хворому лікування. Зневага до техніки готування мікропрепаратів і вибору адекватного способу їх фарбування ведуть до перекручування загальної форми мікробів, деталей їхньої побудови. Це або знижує, або цілком виключає можливість встановлення причини хвороби. У деяких випадках такі помилки ведуть до визначення неіснуючого у пацієнта захворювання.

Мета (загальна): уміти фарбувати фіксовані мазки бактерій простим методом. Визначати структурні та морфологічні ознаки бактерій та основні морфологічні групи.

Конкретні цілі – уміти:

1. Готувати фіксовані мазки мікроорганізмів.
2. Фарбувати мазки простим методом.
3. Розрізняти за морфологією різні форми бактерій.
4. Пояснювати принципи класифікації бактерій.
5. Користуватися «Визначником бактерій» Д.Берджі.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати відмінності клітин еукаріотів від прокаріотів (кафедра біології).
2. Описувати основні форми клітин (кафедра біології).

Для того, щоб ви могли усвідомити, чи відповідає вихідний рівень ваших знань – умінь необхідним вимогам пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання №1. Які з названих органоїдів входять до складу як еукаріотичної, так і прокаріотичної клітини: а) клітинна стінка, б) цитоплазматична мембрана, в) мезосоми, г) джгутики, д) війки, е) мітохондрії, ж) пластиди, з) цитоплазма, и) ядро, і) лізосоми, й) комплекс Гольджі, к) рибосоми, л) ендоплазматична сітка, м) включення .

Завдання №2. Назвіть основні форми клітин.

Інформацію для поповнення знань – умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Биология / под ред . В.Н. Яригина.- М: Высшая школа, 2004.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Принципи класифікації мікроорганізмів. До якого царства відносяться мікроорганізми (бактерії, віруси).
2. Класифікація прокаріотів за Берджі.
3. Основні форми бактерій.
4. Структурні елементи бактеріальної клітини. Чим відрізняється прокаріотична клітина від еукаріотичної?
5. Цитоплазматична мембрана та мезосоми.

6. Рибосоми прокаріотів, їхня роль.
7. Характеристика цитоплазми, нуклеоїда.
8. Прості методи фарбування.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиологія. М.: Медицина, 2005. С. 26-32.
2. Лекції з тем: Медична мікробіологія: предмет, задачі, методи, історія розвитку та систематика бактерій. Будова бактеріальної клітини. Морфологія та хімічний склад мікроорганізмів.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 3-19.
4. Воробьев А.А.и др.Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 3-7.
5. А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Санкт-Петербург, 1998 р. С. 7-13, 18-22, 31-46.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.–М.:ООО "Медицинское информационное агенство", 2008 - С.30-34.
7. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 71-73.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчанням, чому сприяє граф логічної структури теми: "Морфологія бактерій. Поверхні структури бактерій. Прості методи фарбування (додаток №1).

Матеріали та обладнання: готові мазки з різними культурами мікроорганізмів (стафілококи, діп्लокки, сарцини, палички, вібріони), предметне скло, стерильний фіз.розчин, набір фарб для фарбування (генціанвіолет, розведений фуксин, фільтрувальний папір), мікроскоп, бактеріологічні петлі, стерильні пробірки зі скошеним агаром.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Приготування фіксованих препаратів – мазків. Для приготування фіксованих препаратів – мазків, на обезжирене предметне скло наносять краплину фізіологічної рідини, в яку мікробіологічною петлею вносять досліджуваний матеріал таким чином, щоб одержати тонкий і рівномірний мазок діаметром біля 1-1,5см. Якщо досліджувальний матеріал знаходиться в рідкому середовищі, тоді петлею наносять краплю на предметне скло й одержують мазок. Мазки висушують на повітрі або теплим повітрям, або над полум'ям спиртівки.

Для фіксації мазка предметне скло (мазком догори) повільно проводять 3 рази (не протязі 3 секунд) через полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до поверхні скла і не змиваються при подальшій обробці. Більш тривале нагрівання може визвати деформацію клітинних структур.

Приготувати фіксований мазок із запропонованого матеріалу, коротко описати у протоколі існуючі способи фіксації мазків та призначення цього етапу дослідження.

2. Фарбування мазків простим методом.

Фіксований мазок фарбують якою-небудь однією фарбою, наприклад фуксином водним (1-2 хв) або метиленовим синім (3-5 хв), промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійним об'єктивом світлового мікроскопу.

Пофарбувати готовий мазок одним з наявних барвників, промікроскопувати його, малюнок занести до протоколу. За допомогою таблиць визначити морфологічну групу бактерій, що спостерігається, підписати малюнок.

3. На демонстраційних препаратах вивчити морфологію кокових та палочкоподібних мікроорганізмів. Звернути увагу на розмір клітин, та їх розташування.

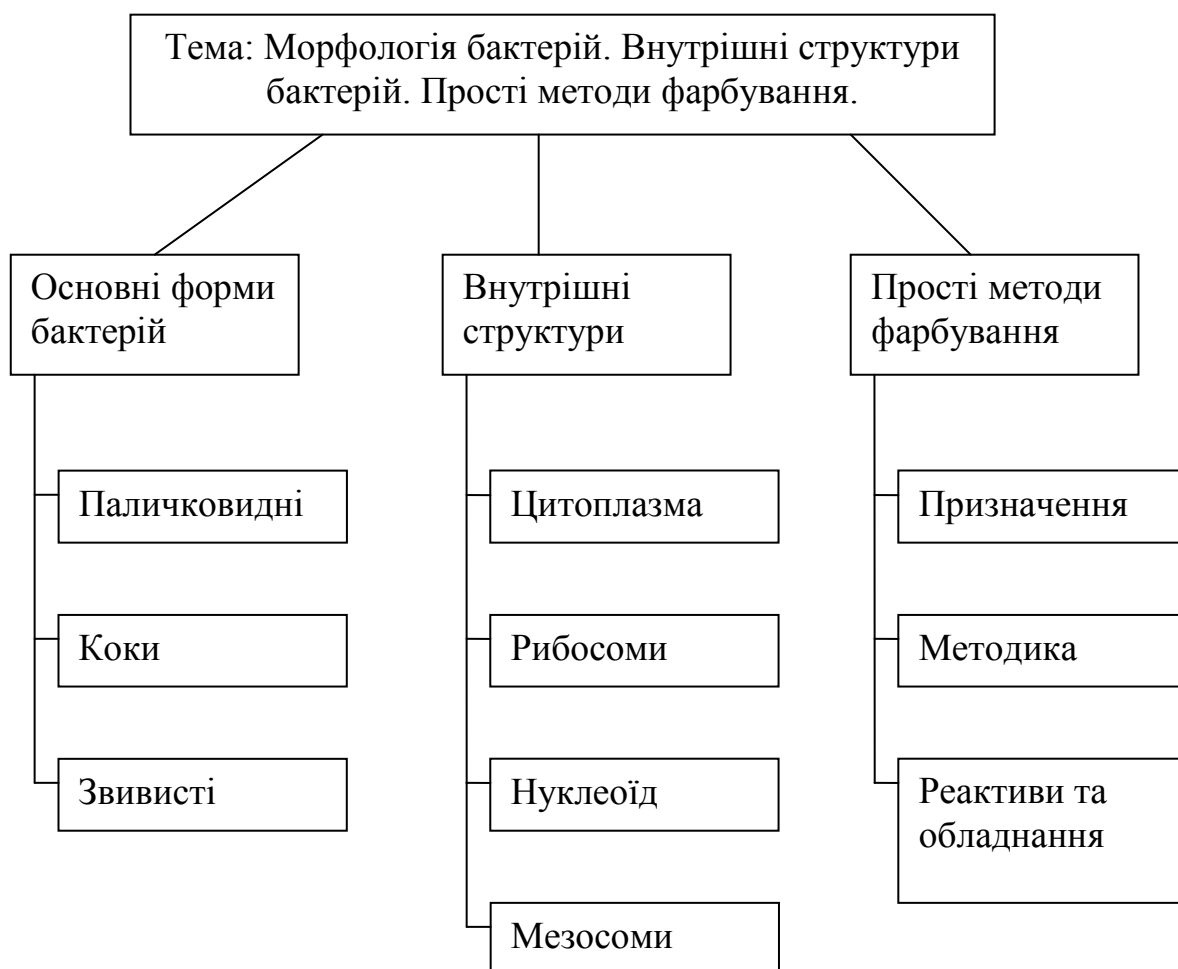
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати навчальні завдання.

Завдання №1. Мазок із харкотіння, пофарбований метиленовою синькою, в якому видно клітини, розташовані ланцюгом. Визначити, до якої морфологічної групи належить виявлений мікроорганізм.

Завдання №2. Збудник сибірки у пофарбованому метиленовою синькою мазку нагадує стебла бамбуку. Визначити, до якої морфологічної групи належить виявлений мікроорганізм.

Графологічна структура теми:

“Морфологія бактерій. Внутрішні структури бактерій. Прості методи фарбування”



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2**

Тема: Морфологія і структура бактерій. Барвники і прості методи фарбування.

Завдання №1. Виготовлення фіксованих мазків

Методи фіксації: 1. _____
2. _____
3. _____

Призначення

Завдання №2. Прості методи фарбування

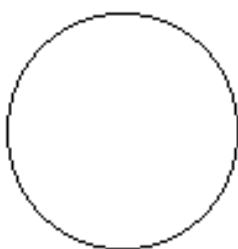


Рис.1

Завдання №3. Морфологія бактерій

Кокові форми

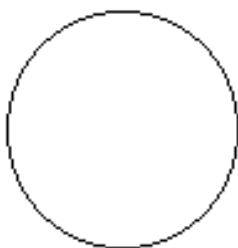


Рис2. Стафілококи

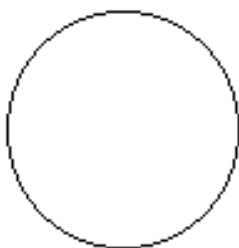


Рис3. Стрептококи

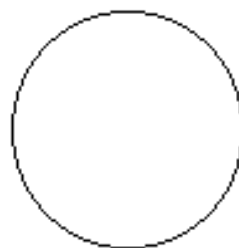


Рис4. Мікрококи

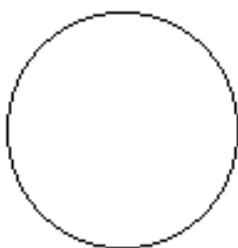


Рис5. Диплококи

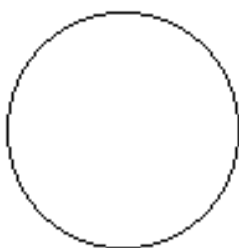


Рис6. Тетракоки

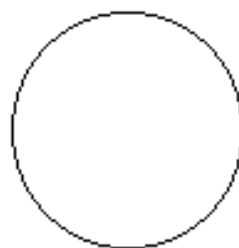


Рис7. Сарцини

Паличковидні форми

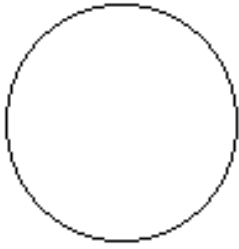


Рис.8. Дрібні палички

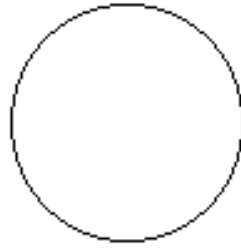


Рис.9. Середні палички.

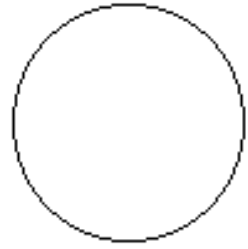


Рис.10. Великі палички

Звивисті форми

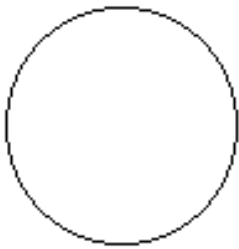


Рис.11. Вібріони

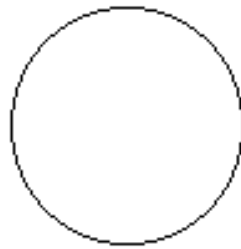


Рис.12. Спірили

Дата _____

Підпис виладача

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.3
ТЕМА: МОРФОЛОГІЯ І СТРУКТУРА БАКТЕРІЙ.
ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ ЗА МЕТОДОМ ГРАМА.

Актуальність теми. Вивчення поверхневих структур бактерій – важливий етап навчання студентів за темою «Морфологія та фізіологія мікроорганізмів». Капсула, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана – це органоїди бактеріальної клітини, котрі визначають багато її властивостей, також і патогенні. Капсула має антигенні властивості, захищає мікроорганізм от неспецифічних факторів захисту макроорганізму и несприятливих умов середовища. Клітинна стінка представляє собою біогетерополімер складного хімічного складу, котрий покриває всю поверхню клітини. Склад цього біогетерополімера не однакоий у різних бактерій. В залежності від будови клітинної стінки бактерії розділяються на дві величезні групи Гр. ⁻ і Гр. ⁺, котрі диференціюють по фарбуванню мазків за методом Грама. ЛПС клітинної стінки має антигенні і токсичні властивості. Пептидоглікан клітинної стінки є «мішенню» для дії пеніцилінів і лізоциму. Утворення L- форм бактеріями є причиною резистентності до антибіотиків. L – формі різних бактерій грають важливу роль в патогенезі багатьох інфекційних захворювань. Цитоплазматична мембрана виконує життєво - важливі функції, порушення яких призводить бактеріальну клітину до загибелі. Вивчення поверхневих структур бактеріальної клітини дозволяє лікарю скласти уяву про антигенні, патогенні та фізіологічні властивості збудників інфекційних захворювань. Особливо актуальним є питання механізму резистентності бактерій до антибіотиків. Знання цих питань дозволить лікареві зробити правильний вибір напрямку лікування хворих.

Мета (загальна): уміти оцінювати та аналізувати результати ідентифікації збудників інфекційних захворювань в залежності від стану поверхневих структур.

Конкретні цілі – уміти:

1. Приготувати фіксований препарат з бактеріальних структур.
2. Розрізняти при мікроскопії Гр⁺ та Гр⁻ мікроорганізми.
3. Фарбувати мазок за методом Грама.
4. Пояснювати роль поверхневих структур бактерій в діагностиці та патогенезі інфекційних захворювань.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати будову еукаріотичної клітини та функції клітинних органоїдів (кафедра біології).
2. Трактувати біологічну роль хімічних речовин, які входять у склад клітинних структур (кафедра біохімії).
3. Працювати з мікроскопом, знати імерсійну мікроскопію (кафедра фізики, мікробіології).
4. Пояснювати призначення темнопольної мікроскопії (кафедра мікробіології).
5. Готувати фіксовані мазки з бактерій (кафедра мікробіології).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань.

Завдання 1. Назвіть органоїди руху еукаріотичних клітин.

Завдання 2. Класифікація хімічних речовин, з яких складаються структури клітин еукаріотів та прокаріотів.

Завдання 3. Назвіть основні частини мікроскопу. Поясніть хід променів в оптичній частині мікроскопу. Яку назву мають деталі оптичної частини мікроскопу?

Завдання 4. Чи потрібно фіксувати препарати з бактерій, якщо вони вивчаються за допомогою темнопольного мікроскопу?

Завдання 5. У яких випадках використовують хімічні методи фіксації?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
2. Биология / Под ред.В.Н. Яригина. М. Высшая школа. - 2004.-т.1. - 431с.
3. Воробьев А.А.и др.Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 3-19
4. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005.-С. 30-32.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б. Борисова. М.: Медицина, 1984.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Капсула - будова та функції.
2. Клітинна стінка – будова та функції. Відмінності Gr^+ та Gr^- бактерій.
3. Протопласти, сферопласти та L – форми бактерій.
4. У чому полягає явище плазмолізу? Практичне використання.
5. Джгутики та війки бактерій, відмінності від відповідних структур еукаріотів. Виявлення рухливості у бактерій.
6. Методика фарбування за Грамом.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б. Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина, 2005.-С. 30-32.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.-С.96-104.
3. Воробьев А.А.и др.Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 3-19
4. Шлегель Г. Общая микробиология.М.: Мир.1972.-476 с.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Поверхні структури бактеріальної клітини. Окраска за методом Грама ” (додаток 1).

6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.– М.:ООО "Медицинское информационное агенство", 2008 - С.36-42.
7. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 74-75.

Матеріали та обладнання: бактеріальні культури, предметне скло, стерильний фіз. розчин, мікроскоп, набір фарб для фарбування за Грамом (геніціанвіолет,

розчин Люголя, розведений фуксин, спирт, фільтрувальний папір), мікроскоп, бактеріологічні петлі, стерильні пробирки зі скошеним агаром.

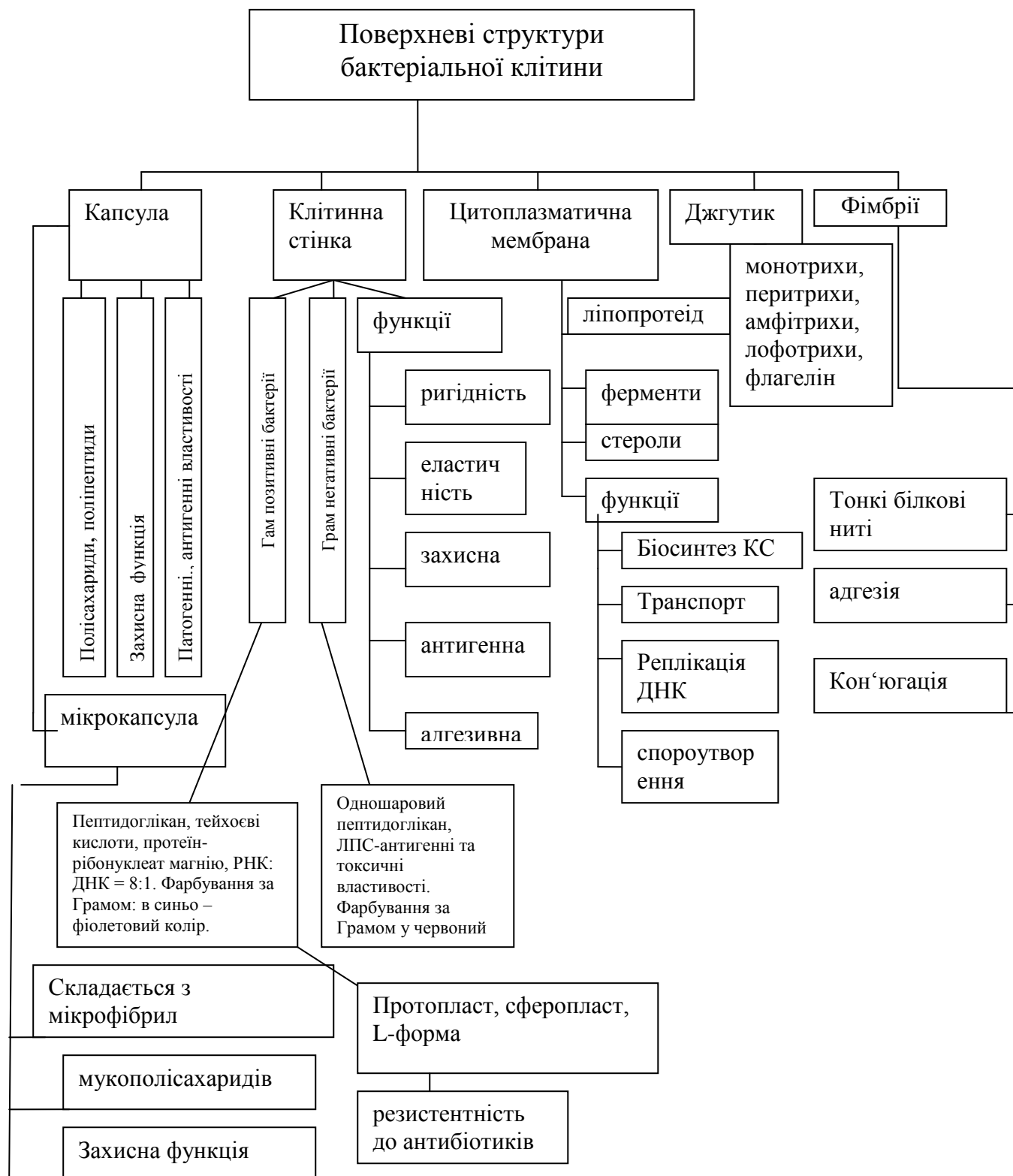
Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Приготувати фіксовані мазки з патологічного матеріалу, або із суміші бактерій. Користуючись практикумом (№ 2 у списку літератури), відібрати із запропонованого набору обладнання інструменти та реактиви, необхідні для фарбування. Занести до протоколу методику фарбування за Грамом.
2. Пофарбувати приготовлені мазки за Грамом, промікрископувати під імерсією, звернути увагу на забарвлення бактерій, визначити морфологічну групу. Занести до протоколу малюнки, позначити на них Гр+ та Гр- мікроорганізми.
3. Розглянути під мікроскопом демонстраційні препарати різних мікроорганізмів. Визначити їх тип фарбування за Грамом та морфологічну групу. Малюнки із підписами занести до протоколу.
4. Порівняти властивості Гр+ та Гр- бактерій та заповнити відповідну таблицю у протоколі.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання.

1. З перитонеальної рідини був приготовлений і пофарбований мазок. При мікроскопії мазка спостерігаються пофарбовані у фіолетовий колір коки, що розташовані неправильними скупченнями, і палички середніх розмірів із закругленими кінцями, розташованими хаотично і пофарбовані в рожевий колір. Що ви можете сказати про мікрофлору перитонеального ексудату? Який метод фарбування був використаний у даному випадку і які його основні етапи?
2. Для фарбування харкотиння хворого з підозри на крупозну пневмонію були використані такі реактиви: розчин генціанвіолету, розчин Люголя, 96° спирт, водний фуксин . Який засіб фарбування використаний у цьому випадку?

**Графологічна структура теми:
“Поверхневі структури бактеріальної клітини. Фарбування за Грамом”**



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 1.3**

Тема: Морфологія і структура бактерій. Фарбування бактерій за методом Грама.

Завдання 1. Етапи приготування препарату за методом Грама

Завдання 2. Фарбування суміші бактерій за Грамом

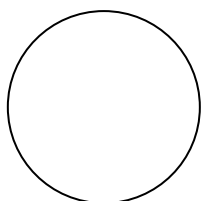


Рис.1

Завдання 3. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми.

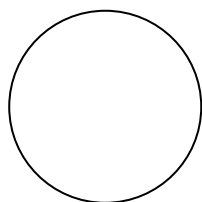


Рис.2

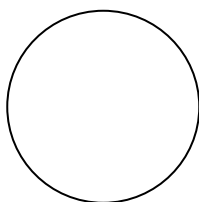


Рис.3

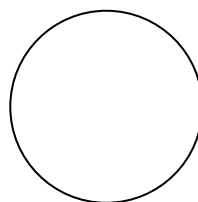


Рис.4

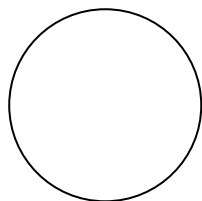


Рис.5

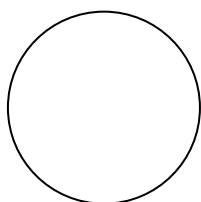


Рис.6

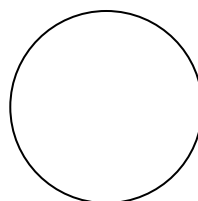


Рис.7

Завдання 4. Відмінності грампозитивних та грамнегативних бактерій.

| Властивості Гр+ бактерій | Властивості Гр- бактерії |
|--------------------------|--------------------------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.4
ТЕМА: МОРФОЛОГІЯ ТА СТРУКТУРА СПІРОХЕТ,
АКТИНОМІЦЕТІВ, ГРИБІВ. СКЛАДНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ

Актуальність теми. Оскільки морфологічне розмаїття бактерій невелике, мікроскопічний метод може лише приблизно дозволити їх ідентифікувати. Однак для деяких мікроорганізмів морфологічні та тинкторіальні ознаки з достатньою точністю визначають їх видову приналежність: кількість, та характер завитків у спірохет, капсула клебсієл, зерна волютина у корінебактерій дифтерії, кислотостійкий шар ліпідів у мікобактерій туберкульозу. Для актиноміцетів та грибів важливе діагностичне значення має будова їх міцелію та розташування спор. Вивчення складних методів фарбування – важливий етап навчання студентів за темою «Морфологія та фізіологія мікроорганізмів». Капсула, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, спора – це органоїди бактеріальної клітини, котрі визначають за допомогою складних методів фарбування. Хімічні речовини клітинної стінки мікобактерій туберкульозу грають важливу роль в патогенезі захворювання, а також мають діагностичне значення за методом фарбування Циля-Нільсена. Знання складних методів фарбування дозволяє лікарю скласти уяву про морфологічні, антигенні, патогенні властивості збудників інфекційних захворювань. Знання цих питань дозволить лікареві зробити правильний вибір методу діагностики.

Мета (загальна): уміти оцінювати та аналізувати результати ідентифікації збудників інфекційних захворювань в залежності від морфологічних та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів для використання цих умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Аналізувати морфологію та структуру спірохет, актиноміцетів, грибів.
2. Вибирати придатні методи фарбування спірохет, актиноміцетів, грибів.
3. Фарбувати мазки складними методами: Ожешко, Циля-Нільсена, Нейсера, Бурі-Гінса, Лефлера, Морозова.
4. Знаходити у пофарбованих мазках кислотостійкі та капсульні мікроорганізми, корінебактерії.
5. Виявляти у бактерій включення, спори, капсулу.

Базовий рівень знань – умінь:

1. Описувати будову та функції клітинних органоїдів мікроміцетів (кафедра біології).
2. Характеризувати біологічну роль спор та цист (кафедра біології).
3. Вміти схематично зобразити структурні елементи бактеріальної клітини (кафедра мікробіології).
4. Пояснювати фізико-хімічні властивості ліпідів (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Назвіть особисті структури та хімічний склад поверхневих структур мікроміцетів.

Завдання 2. Яке значення мають спори для мікроміцетів та бактерій?

Завдання 3. Назвіть структури спороутворення у грибів.

Завдання 4. Який зв'язок та значення мають структури бактеріальної клітини, та хімічний склад?

Завдання 5. У клітинній стінці мікобактерій міститься багато ліпідів, тому при фарбуванні звичайними методами барвники не потрапляють всередину клітини. Як можна обробити мазок з мікобактерій, що підвищити проникність клітинної стінки цих мікроорганізмів?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
2. Биология / Под ред.В.Н.Яригина. М. Высшая школа. - 2004.-т.1. - 431с.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина,2005.-С.30-41.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.
5. Воробьев А.А.и др.Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 26-33.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Спірохети (трепонери, борелії, лептоспіри). Особливості морфології та будови (оболонка, фібрили, блефаропласт), рухливість. Фарбування за Романовським – Гімзою.
2. Морфологічні особливості рикетсій, хламідій та мікоплазм.
3. Актиноміцети, особливості морфології. Повітряний та субстатний міцелій, друзи.
4. Спороутворення. Поняття про бацили та клостридії. Виявлення спор за методом Ожешко.
5. Структура клітини грибів. Основні форми грибів: дріжджі, дріжджеподібні гриби, нитчаті гриби. Гіфи, міцелій. Диморфізм грибів. Особливості структури цитоплазматичної мембрани і клітинної стінки. Механізм розмноження грибів: брунькування, утворення спор.
6. Вегетативні спори, ендоспори, екзоспори, статеві спори.
7. Методи вивчення морфології грибів.
8. Кислотостійкі бактерії - методи вивчення.
9. Включення у мікроорганізмів, їхня біологічна роль та методи виявлення.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина ,2005.-С. 41-46.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология.- М.: Медицина,1998.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С.96-104.
4. Шлегель Г. Общая микробиология.М.: Мир. -1972.- 476с.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів, найпростіших ” (додаток 1).

5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.– М.:ООО "Медицинское информационное агенство", 2008 - С.34-36, 42-45.
6. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 75-81.

Матеріали та обладнання: різноманітні бактеріальні культури, готові пофарбовані мазки з бактеріями, предметне скло, набір фарб для фарбування препаратів за методами Циля-Нільсена, Ожешкі, Бурі-Гінса, Нейсера, стерильний фізіологічний розчин, бактеріологічні петлі, спиртівка, мікроскоп.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Розглянути мазки спірохет (тушевий препарат, фарбування за Романовським-Гімзою), оцінити співвідношення довжини та ширини їх клітин, розміри та кількість завитків. Користуючись таблицею визначити, до якого роду належать розглянуті спірохети. Малюнки занести у протокол та підписати.
2. Розглянути мазки рикетсій (фарбування за Здродовським) – звернути увагу на розміри цих мікроорганізмів та їх розташування в середині клітин; мазки актиноміцетів (фарбування за Грамом) – знайти у мазках міцелій та окремі клітини. Порівняти зі схематичними малюнками на таблицях і занести до протоколу. Морфологію мікоплазм вивчити за таблицями, звернути увагу на дрібні розміри клітин та їх поліморфізм, малюнок занести у протокол, вказати придатний метод фарбування.
3. За практикумом (№3 у списку літератури) познайомитися з принципом виявлення кислортостійких бактерій, розібрати методику фарбування за Цилем –Нильсеном. У протоколі вказати необхідні реактиви та послідовність дій. Пофарбувати препарат із мокротиння за Цилем –Нильсеном, знайти у ньому мікроорганізми стійки та не стійки до дії кислот, занести малюнок до протоколу.
4. Структури бактеріальної клітини вивчити по демонстраційних препаратах: капсули, зерна волютина, спори (таблиці, препарати пофарбовані за методами Бурі-Гінса, Нейсера, Ожешко). Малюнки занести до протоколу, чітко відтворюючи кольори, у які забарвлені різні структури бактеріальних клітин.
5. Морфологію пліснявих грибів вивчити у нефарбованих мазках-відбитках з поверхні колоній та на нативних препаратах колоній (розглядаються на малому збільшенні, без імерсії). Знайти у отриманих препаратах гіфи, конідії та спори гриба. Морфологію дріжджеподібних грибків розглянути на мазках, пофарбованих за Грамом, порівняти розміри їх клітин із бактеріями, знайти клітини, що брунькуються. Малюнки пліснявих та дріжджеподібних грибків занести у протокол.

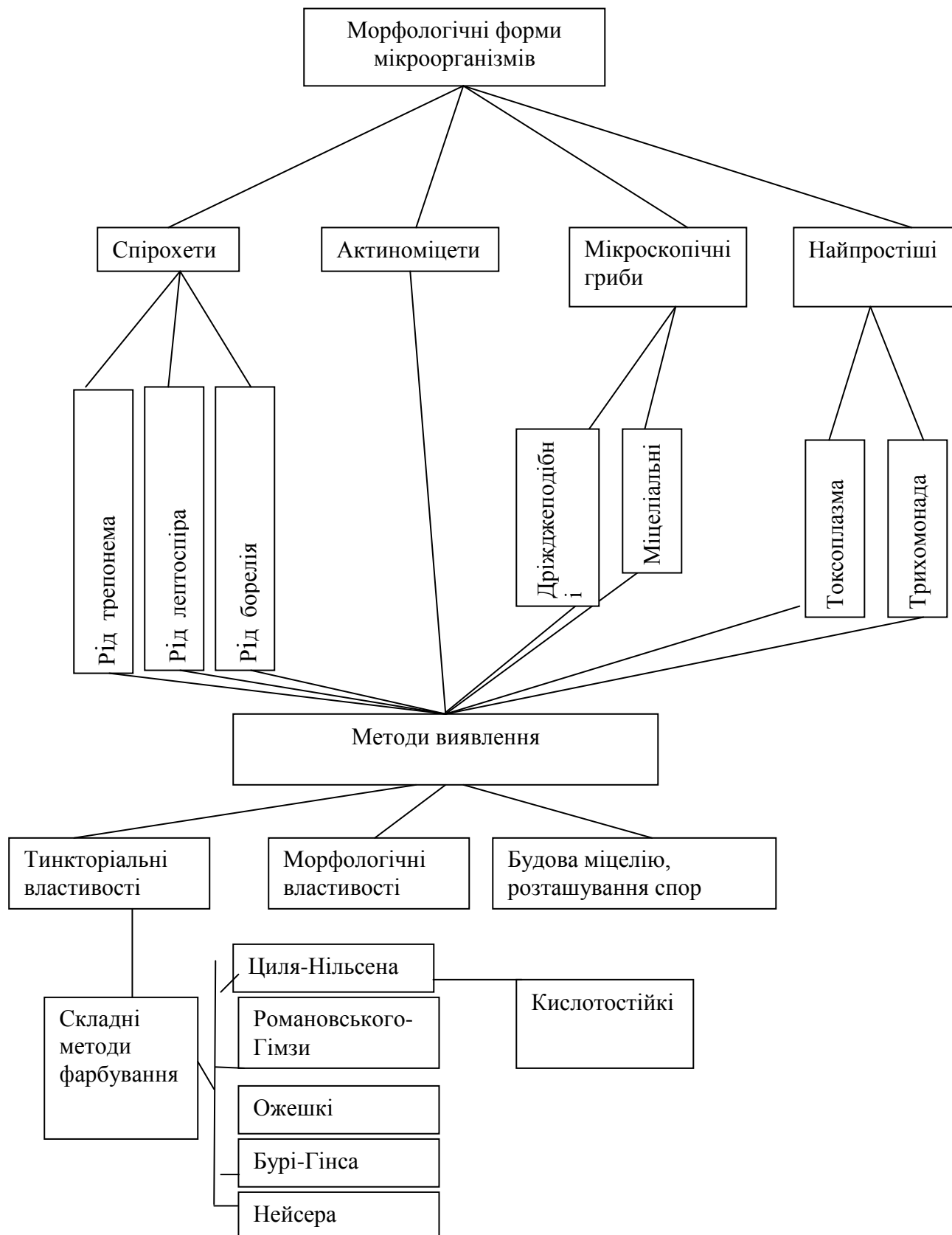
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У лабораторію надійшла сеча хворого з підозрою на туберкульоз нирок. Які методи фарбування можна рекомендувати для виявлення *M. tuberculosis* в осаді сечі?

2. При мікроскопії мазків харчового продукту (крохмалю) виявлені великі Гр+ палички, подібні *Bacillus cereus*. Які структурні компоненти клітин можуть це підтвердити? Який метод фарбування варото використати для їх виявлення?
3. В баклабораторію надійшов з хірургічного відділення кетгут з направленням, де міститься прохання перевірити кетгут на стерильність. В отриманій відповіді зазначено, що кетгут забруднений бацилами. Що було знайдено у мікробів, виділених з кетгуту?
4. Назвіть: Включення мікробної клітини: а) Краплі жиру, в) Зерна волютину, с) Вакуолі, d) Гранули глікогену і крохмалю, е) Рібосоми.
5. Назвіть умови спороутворення: а) несприятливе навколишнє середовище, в) потрапляння в організм людини або тварини, с) висушування, d) низька температура, е) потрапляння до ґрунту.
6. Значення спор у бацил: а) для розмножування, в) для збереження виду в несприятливих умовах, с) для накопичення резервних живильних речовин, d) захисна реакція при потрапленні в макроорганізм, е) ознака старіння клітини.
7. Спроможністю до спороутворення володіють: а) клострідії, в) бацили, с) спірохети, d) найпростіші, е) рикетсії
8. Кислотостійкість мікроорганізмів пов'язана з присутністю: а) нуклеїнових кислот, в) жирно-воскових речовин, с) капсул, d) вуглеводів, е) білків.

Графологічна структура теми:

“Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів. Складні методи фарбування”



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 1.4**

Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів. Складні методи фарбування

Завдання 1. Морфологія спірохет.

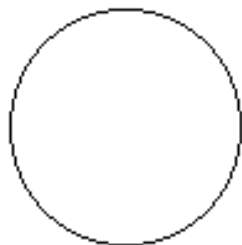


Рис.1

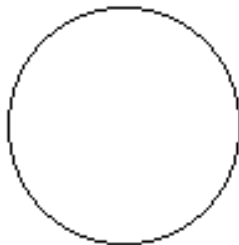


Рис.2.

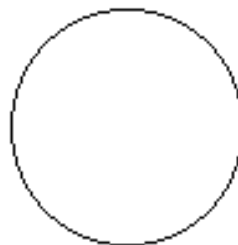


Рис.3

Завдання 2. Морфологія рикетсій, актиноміцетів, мікоплазм.

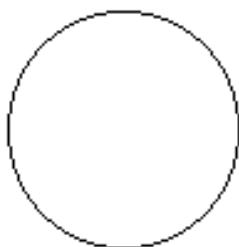


Рис.4

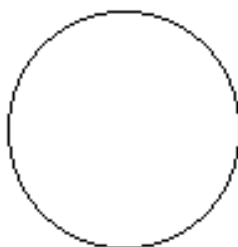


Рис.5

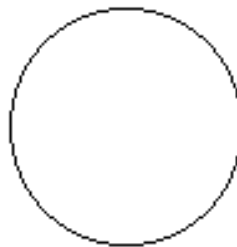


Рис.6

Завдання 3. Виявлення кислотостійких бактерій.

Методика фарбування за Цилем-Нільсеном:

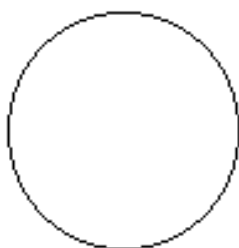


Рис.7

Завдання 4. Структури бактеріальної клітини.

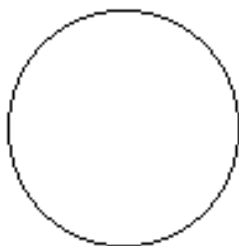


Рис.8

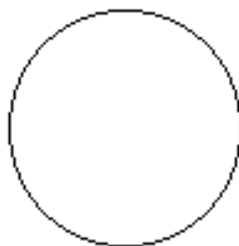


Рис.9

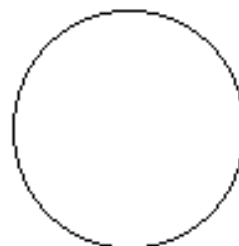


Рис.10

Завдання 5. Морфологія грибів.

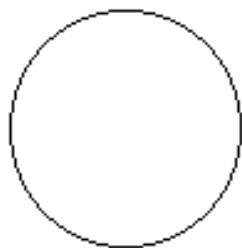


Рис.11

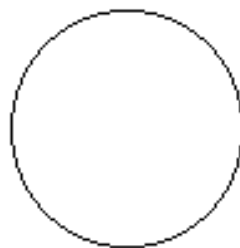


Рис.12

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.5
ТЕМА: ФІЗІОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ.
ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР АЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ.

Актуальність теми. Мікроорганізмам як всьому живому властиві три основні фізіологічні функції: живлення, дихання і розмноження.

Живлення необхідне для синтезу в клітині всіх органічних структур, воно здійснюється з поглинанням енергії. Основним джерелом енергії є окислювально-відновні процеси (дихання). За типом живлення мікроби діляться на аутотрофів і гетеротрофів. Аутотрофи засвоюють азот і вуглець з неорганічних речовин (CO_2 і ін.), а гетеротрофи — з складних органічних сполук (амінокислоти, моноцукру та ін.), синтезованих раніше іншими живими організмами. Гетеротрофи у свою чергу діляться на сапрофітів і паразитів.

Дихання мікроорганізмів — біологічне окислення субстрата з виділенням необхідної для метаболізму енергії. За типом дихання мікроорганізми діляться на три основні групи: аероби, анаероби, факультативні анаероби/аероби.

Розмноження бактерій відбувається шляхом простого поперечного ділення клітини.

Культивування мікроорганізмів здійснюють при створенні ряду умов з урахуванням типів живлення, дихання і швидкості розмноження. Для культивування сапрофітів і факультативних паразитів використовують штучні живильні середовища, які по своєму призначенню бувають прості, елективні і диференціально-діагностичні, а по консистенції — рідкі, напіврідкі і щільні.

Бактеріологічний метод є основним при діагностиці інфекційних захворювань. Його суть полягає у визначенні виду збудника інфекції, отже, на підставі результатів бактеріологічного методу можна поставити етіологічний (остаточний) діагноз.

Знання фізіології мікроорганізмів дозволяє правильно підібрати живильне середовище і умови культивування для виділення бактерій з патологічного матеріалу і накопичення їх чистої культури. Біохімічна активність мікроорганізмів генетично детермінована. Певний набір ферментів є надійною видовою ознакою. Це широко використовується при діагностиці інфекційних захворювань, коли біохімічна ідентифікація бактерій доповнює і уточнює попередній діагноз, отриманий на основі вивчення їх морфологічних і тинкториальних особливостей.

Мета (загальна): уміти проводити виділення та ідентифікацію аеробних бактерій для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати особливості мікробного метаболізму.
2. Класифікувати мікроорганізми за типом дихання та типом живлення.
3. Описувати найбільш вживані поживні середовища та їх приготування.
4. Визначати біохімічні властивості бактерій за допомогою диференційно-діагностичних середовищ.
5. Застосовувати методи виділення чистих культур аеробних бактерій.

6. Трактувати результати ідентифікації виділених чистих культур бактерій та робити висновок.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати хімічний склад клітини: вода, хімічні елементи та мінеральні речовини, нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи. Особливості хімічного складу еукаріотичних клітин (кафедра біології).
2. Інтерпретувати дві сторони обміну речовин та енергії клітини: конструктивний і енергетичний обмін, їх взаємозв'язок (кафедра біохімії).
3. Пояснювати роль азоту, вуглецю, мінеральних речовин і ростових факторів у живленні клітин (кафедра біохімії).
4. Характеризувати джерела та шляхи одержання енергії клітиною (кафедра біології).
5. Трактувати біологічну роль ферментів, давати їх класифікацію (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Встановіть зв'язок між хімічними складовими клітини та їх функцією у клітині еукаріотів:

| | |
|-----------------------|--|
| А. білки | 1. є основним джерелом енергії |
| Б. ліпіди | 2. входять до складу клітинних стінок |
| В. вуглеводи | 3. входять до складу цитоплазматичної мембрани |
| Г. нуклеїнові кислоти | 4. відповідають за спадковість |
| | 5. виступають запасними речовинами |
| | 6. виконують роль біологічних каталізаторів |
| | 7. забезпечують біосинтез білків |

Завдання 2. Яка властивість характерна для речовин - амфіболітів?

Завдання 3. Розподіл живих організмів за джерелом енергії.

Завдання 4. Що таке фактори росту клітин?

Завдання 5. Як відбувається дихання на клітинному рівні?

Завдання 6. Роль ферментів у живій клітині.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Березов Т.Т., Коровкін В.Ф. Біологічна хімія.- М.: Медицина.- 1998.
2. Афанасьєв Ю.И., Юріна Н.А. Гістологія, цитологія і ембріологія.- М.: Медицина.- 1999.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Хімічний склад бактеріальної клітини: вода, хімічні елементи та мінеральні речовини, нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи. Особливості хімічного складу бактерій порівняно з еукаріотичними клітинами.
2. Особливості обміну речовин та енергії у бактерій (інтенсивність обміну речовин, різноманітність типів метаболізму, метаболічна пластичність, надлиш-

ковий синтез метаболітів та енергії). Конструктивний та енергетичний обмін, їх взаємозв'язок.

3. Живлення бактерій. Джерела азоту, вуглецю, мінеральних речовин і ростових факторів. Аутотрофи та гетеротрофи. Голофітний спосіб живлення. Механізми перенесення поживних речовин у бактеріальну клітину: енергонезалежний (проста та полегшена дифузія), енергозалежний (активний транспорт), значення ферментів периплазми та пермеаз. Класифікація бактерій за типами живлення.
4. Дихання бактерій. Енергетичні споживи бактерій. Джерела та шляхи одержання енергії у фотоаутоτροφів, хемоаутоτροφів.
5. Типи біологічного окислення субстрату і способи одержання енергії у гетерохемоорганотрофів: окислювальний метаболізм; гниття – як сукупність анаеробного і аеробного розщеплення білків; бродильний метаболізм та його продукти; нітратне дихання. Аероби, анаероби, факультативні анаероби, мікроаерофіли, капнічні бактерії.
6. Ферменти бактерій та їх класифікація. Конститутивні та індуктивні ферменти, генетична регуляція. Специфічність дії ферментів. Екзо- та ендоферменти. Використання мікробів та їх ферментів у біотехнології для одержання амінокислот, пептидів, органічних кислот, вітамінів, гормонів, антибіотиків, кормового білка, для обробки харчових та промислових продуктів, біологічної очищення стічних вод, одержання рідкого та газоподібного палива.
7. Використання мікробів та їх ферментів у біотехнології.
8. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 2005.-С.46-55.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. - М.: Медицина, 1984.- С.96-104.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. О.В.Бухарина. -М.: Медицина.-2002.-С.32-40.
4. Склея Л.З., Нехорошева Н.Г., Лукин И.Н., Груднина С.А. Практические аспекты современной клинической микробиологии.-М. : Медицина -2004. - С.9 – 18.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С. 52-53, 55-62.
6. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 96-100, 115-118.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Фізіологія мікрорганізмів” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: живильні середовища: МПА, Левіна, Плоскірєва, Ендо, Чистовіча, Гісса, Ресселя, ЖСА, кров'яний агар, набір індикаторних смужок, набір для фарбування за Грамом, мікроскоп, тести для біохімічної ідентифікації м/о.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити типи живильних середовищ (демонстрація) та апаратуру для

культивування мікроорганізмів. У протоколі відмітити основні вимоги до поживних середовищ та умови культивування, сприятливі для більшості патогенних мікроорганізмів. Розглянути та описати у протоколі ознаки росту мікроорганізмів на різних поживних середовищах.

2. Зробити посів досліджуваного матеріалу на агар в чашці Петрі методом механічного роз'єднування в цілях отримання окремих колоній (1-й день). Для цього простерилізованою в полум'ї пальника і охолодженою петлею беруть матеріал для посіву і вносять у чашку, злегка відчинивши кришку. На поверхні живильного середовища матеріал розподіляють петлею таким чином: з краю чашки частими штрихами утворюють овальний майданчик, на якому залишається значна частина матеріалу, потім проводять паралельні штрихи на відстані 0,5 см від одного краю чашки до іншого. При посіві петлю її слід тримати паралельно агару, щоб не дряпати його (Рис.2.2, а на вклейці). Після розсівання петлю виймають з чашки і негайно обпалюють в полум'ї, одночасно закриваючи чашку Петрі кришкою. Чашку маркірують і поміщають вверх дном в термостат. Ріст мікроорганізмів можна буде спостерігати приблизно через добу. Це складає 1-й етап (1-й день) бактеріологічного дослідження.

За демонстраційним зразком розглянути особливості росту мікроорганізмів, отриманих при посіві патологічного матеріалу різними інструментами:

- а) бактеріологічною петлею;
- б) тампоном;
- в) шпателем

Зробити у протоколі відповідні малюнки. Вказати, у якому разі використовується той чи інший спосіб посіву.

3. Вивчити культуральні властивості мікроорганізмів за демонстраційними посівами. На запропонованих чашках Петрі знайти різні типи колоній, визначити їх розмір, колір, форму, прозорість, характер поверхні (гладка, шорстка) і краю (рівний, зазублений). Ознаки колоній відмітити у протоколі.

З матеріалу частини колоній приготувати мазок, пофарбувати за Грамом і промікроскопувати, замалювати пофарбовані мазки з двох колоній. Зробити висновок про чистоту виділеної культури.

Залишок колонії, що вивчається, відсіяти петлею в пробірку на скошений живильний агар для накопичення чистої культури та поставити в термостат на добу. Врахування культуральних властивостей, мікроскопічний контроль чистоти виділеної культури та пересві для її накопичення складають 2-й етап (2-й день) бактеріологічного дослідження.

На третю добу чисту культуру, що виросла, ідентифікують за основними видовими ознаками. Вивчають морфологію при мікроскопії мазка з чистої культури. Здійснюють посів чистої культури на диференціально-діагностичні тест-системи (стафітест, ентеротест) для вивчення біохімічної активності. Для цього готують 1-мільярдну суспензію бактерій у фізіологічному розчині, потім дозаторними або пастерівськими піпетками вносять 0,1 мл суспензії до лунок тест-системи. Планшет відносять в термостат на добу.

Цей 3-й етап бактеріологічного дослідження під час практичної роботи не виконується.

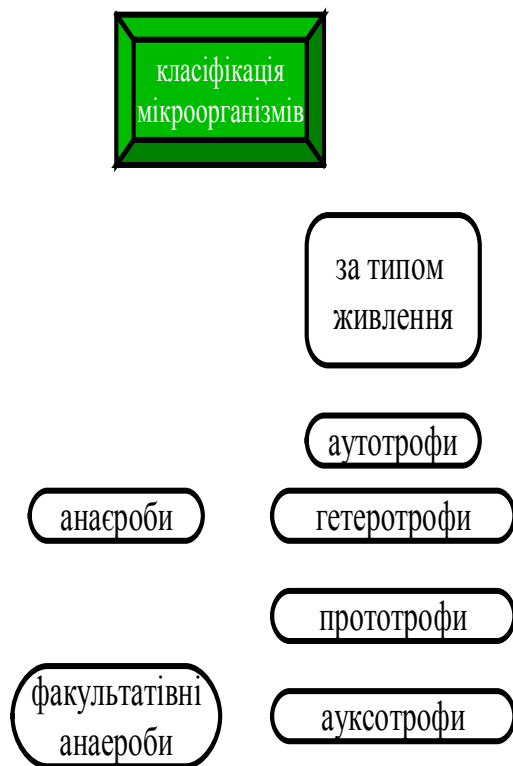
4. Провести ідентифікацію виділеної культури. Для цього розглянути демонстраційні посіви на тест-системах, оцінити наявність біохімічної активності за зміною кольору індикатора в лунках та відмітити у таблиці протоколу. Зіставити результат з диференціюючими таблицями тест-системи та визначити вид бактерій. Біохімічна ідентифікація виділеної чистої культури складає 4-й етап (4-й день) бактеріологічного дослідження.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

- 1.** У лабораторію надійшов матеріал (відокремлюване з рани) для бактеріологічного дослідження. Які живильні середовища будуть використані для виділення бактерій аеробів? Який метод посіву можна використовувати для виділення їх чистої культури?
- 2.** При бактеріологічному дослідженні випорожнювань хворого виділена культура грамнегативних паличок. Які живильні середовища будуть використані для вивчення їх ферментативних властивостей?
- 3.** При посіві випорожнювань людини, яка перенесла черевний тиф, на середовищі Ендо виявляється зростання колоній, які мають різне забарвлення і розміри: 1) великі, червоні; 2) дрібні, безбарвні. Чи одного вигляду присутні мікроорганізми в матеріалі, який досліджується? До якої групи середовищ (за призначенням) належить указане вище середовище? Які ще середовища використовуються для цієї ж мети?

Графологічна структури теми:

“Фізіологія мікроорганізмів”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.5

Фізіологія мікроорганізмів. Виділення чистих культур аеробних бактерій.

Завдання №1. Поживні середовища та умови культивування мікроорганізмів

а) вимоги до поживних середовищ

| |
|----|
| 1. |
| 2. |
| 3. |
| 4. |

б) умови культивування

| |
|----|
| 1. |
| 2. |
| 3. |
| 4. |

в) Облік зростання мікроорганізмів на різних середовищах

| Назва середовища | МПА | Ендо | Кров'яний агар | ЖСА |
|------------------|-----|------|----------------|-----|
| Облік зростання | | | | |

Завдання № 2. Механічне розсівання патологічного матеріалу (суміш мікробів) на щільне живильне середовище з метою отримання ізолюваних колоній.

Розсів петлею, шпателем, тампоном.

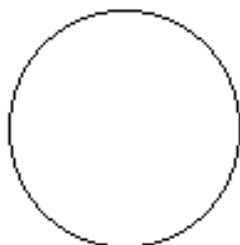


Рис.1

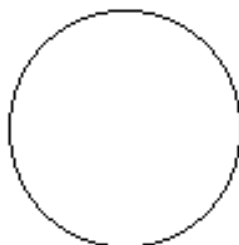


Рис.2

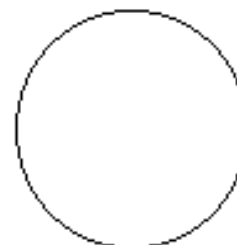


Рис.3

Відмітити призначення кожного способу посіву:

а) тампоном – _____

б) шпателем – _____

в) петлею – _____

Завдання №3. Облік посіву. Виявлені колонії:

| Колонії | № 1 | № 2 |
|---------------|-----|-----|
| форма | | |
| розмір (у мм) | | |
| кольор | | |
| консистенція | | |

Мікроскопія половинок ізолюваних колоній різного типу.

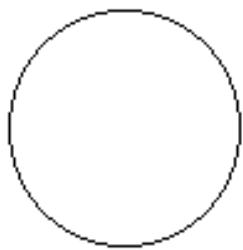


Рис.4.

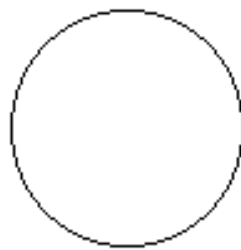


Рис..5

Завдання №4. Ідентифікація виділеної культури.

Облік біохімічних властивостей. Біохімічна ідентифікація культури.

| № | Назва виду м/о | Ферментація вуглеводів | | | | Виділення | | |
|----|----------------|------------------------|---------|----------|---------|-----------|--------|------------|
| | | глюкози | лактози | сахарози | манніту | аміаку | індолу | сірководню |
| 1. | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | |

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.6

ТЕМА: ФІЗІОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ.

Актуальність теми: При розмноженні на щільних живильних середовищах бактерії утворюють на поверхні середовища і усередині неї типові для кожного мікробного виду колонії. Колонії можуть бути опуклими або плоскими, з рівними або нерівними краями, з шорсткою або гладкою поверхнею і мати різне забарвлення: від білого до чорного. Всі ці особливості (культуральні властивості) враховують при ідентифікації бактерій, а також при виборі колоній для отримання чистих культур. Щоб знати, як отримати чисту культуру того або іншого мікроорганізму, треба уважно ознайомитися з практичною частиною даного розділу.

Мета(загальна): вивчити методи культивування анаеробів.

Загальна мета – уміти:

- а) вибрати придатні середовища для анаеробів;
- б) враховувати культуральні та біохімічні ознаки анаеробів.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати види розмноження мікроорганізмів.
2. Трактувати статистичні закономірності зростання бактерійної культури на рідкому живильному середовищі.
3. Використовувати спеціальні методи культивування анаеробних бактерій.
4. Пояснювати особливості культивування рикетсій, хламідій, спірохет у зв'язку з їх біохімічними властивостями.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Характеризувати види розмноження клітин еукаріотів (кафедра біології)
2. Трактувати клітинне дихання як окислювально-відновлювальний процес (кафедра біохімії).
3. Використовувати індикатори рН (кафедра біохімії).
4. Розраховувати відсоткові концентрації розчинів (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Які існують способи поділу клітин у еукаріотів?

Завдання 2. Анаеробне дихання відбувається без участі кисню. Які інші речовини можуть виступати при цьому кінцевими акцепторами електронів?

Завдання 3. При зануренні у рідину лакмусовий папірець почервонів. Яка реакція середовища?

Завдання 4. Скільки треба взяти речовини та розчинника, щоб отримати 100 г 3% розчину?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Березов Т.Т., Коровкін В.Ф. Біологічна хімія.- М.: Медицина.- 1998.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Ріст і розмноження мікроорганізмів. Способи розмноження мікроорганізмів
2. Періодична культура. Фази розвитку мікроорганізмів у рідкому середовищі в періодичній культурі.
3. Безперервне культивування, його значення в біотехнології (одержання ферментів, білків, антибіотиків).
4. Асоціації мікроорганізмів та чисті культури. Колонії мікроорганізмів, особливості їх формування, властивості.
5. Пігменти мікроорганізмів.
6. Методи культивування анаеробних бактерій (поживні середовища для облигатних анаеробів, анаеробні бокси).
7. Особливості культивування рикетсій, хламідій, спірохет.
8. Значення бактеріологічного (культурального) методу у діагностиці інфекційних захворювань.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 2005.-С.55-66.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова. – М.: Медицина, 1984.- С.96-104.
3. Керівництво до практичних зайнять з мікробіології, вірусології і імунології. Під ред. О.В.Бухаріна-М.Медицина.-2002.-С.32-40.
4. Скеля Л.З., Нехорошева Н.Г., Лукин И.Н., Груднина С.А. Практичні аспекти сучасної клінічної мікробіології.-М.-2004.-С.9 – 18.
5. Пиріг Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. для студ.вищ.навч.зак.-Л.; НУХТ,2004.-459 с.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 -С. 51-52, 62-68.
7. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С.118-124, 128.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: „Фізіологія мікрорганізмів ” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: поживні середовища (Кита-Тароці, Віліса-Хобса, Вільсон –Блера, середовище для трубок Віньяль-Вейона), демонстрація біологічного методу культивування анаеробів, методу Перетца, високі агарові стовпчики.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. За таблицями та демонстраційними зразками вивчити основні типи поживних середовищ. Приклади записати до протоколу, вказати сферу їх застосування. Розглянути зростання різних бактерійних культур на щільних і рідких живильних середовищах.
2. Ознайомитися з технікою приготування живильних середовищ. Визначити рН МПБ. Коротко описати необхідне обладнання та отриманий результат. Розрахувати кількість агар-агару для приготування щільного та напіврідкого середовища.
3. На демонстраційних матеріалах вивчити метод виділення чистої культури анаеробних бактерій, живильні середовища і апаратуру, які використовують

для культивування анаеробів. Стисло характеристику середовищ і устаткування занести до протоколу.

Розглянути прилад - анаеростат і ознайомитись з принципом його роботи.

Анаеростат — прилад для створення безкисневого середовища — є товстостінною металевою місткістю для розташування чашок Петрі або пробірок. Система газовід-відних трубок і вакуумметр дозволяють відкачувати з місткості повітряну суміш, одночасно заміщаючи її інертним газом (гелієм) і заміряти тиск (малий. 2.4.).

Ознайомитись з умовами створення анаеробіозу в ексикаторі (свічка, тіогліколієва кислота). Ексикатор — товстостінна скляна ємність з притертою кришкою і підставкою для чашок Петрі. На дно ексикатору ставиться свічка, що горить, або наливається кислота (хімічний редуцент кисню), потім кришка притирається.

4. Розглянути чашку з культивуванням аеробів і анаеробів (спосіб Фортнера). У чашку Петрі на поверхню живильного агару, розділеного навпіл посередині чашки, проводять посів: на одній половині — аеробів, на іншій — анаеробів. Чашку герметизують парафіном і поміщають в термостат. При залишковому кисні ростуть аероби, після його утилізації починають рости анаероби.

Розглянути і вивчити склад спеціальних середовищ для культивування анаеробів. Середовище Кіта—Тароці — це живильний бульйон з глюкозою і шматочками свіжих органів тварин. Глюкоза і шматочки органів володіють редукуючою здатністю. Середовище зверху заливають шаром стерильного масла. Середовище контролю стерильності (СКС) — 0,3 %-й агар з додаванням тіогліколієвої кислоти (редуцент O_2), посів уколом. Середовище Вільсона-Блера — це високий стовпчик живильного агару з додаванням солей натрію і заліза, посів уколом. Анаероби утворюють чорні колонії в глибині стовпчика за рахунок хімічної реакції з солями металів.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і перебігом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У яку фазу розвитку бактеріальної культури мікроорганізми мають найбільшу біохімічну активність?
2. Чи можна отримати чисту культуру анаеробних бактерій шляхом механічного розсіву петлею на поверхні поживного середовища?
3. Чому поживні середовища, навіть із факторами росту, непридатні для культивування рикетсій?

1. Основні процеси, які є складовими фізіології мікрорганізмів:

- Живлення, дихання, розмноження, мінливість

2. Групи бактерій за типом дихання:

1. Облігатні аероби
2. Облігатні анаероби
3. Факультативно-анаеробні мікроорганізми
4. Мікроаерофіли

3. Живильні середовища для культивування облігатних анаеробів:

- Кіта-Тароці, Вільсона-Блера, СКС

4. Групи бактерій по здатності утилізувати вуглець і азот:

- Аутотрофі
- Гетеротрофи

5. Класифікація груп гетеротрофів:

- Сапрофіти і паразити

6. Класифікація груп паразитів:

- Облігатні і факультативні

7. Облігатні паразити (визначення):

- Мікроорганізми, повністю позбавлені здібності жити поза клітинами живого організму (віруси, рикетсії, хламідії)

8. Умови культивування бактерій:

1. Живильне середовище
2. Оптимальна температура
3. Умови аеробів або анаеробів
4. Час культивування

9. Типи живильних середовищ за призначенням:

1. Прості
2. Елективні
3. Диференціально-діагностичні

10. Спосіб розмноження у бактерій:

- Поперечне ділення

11. Колонія (визначення):

- Потомство однієї клітини при розмноженні на твердому живильному середовищі

12. Чиста культура (визначення):

- Популяція мікроорганізмів, що складається з особин одного виду

13. Принципи виділення чистих культур бактерій:

1. Механічне роз'єднання мікроорганізмів при посіві
2. Використання біологічних властивостей бактерій

14. Етапи бактеріологічного методу діагностики:

- Виділення чистої культури
- Ідентифікація чистої культури

Життєві функції мікроорганізмів: живлення, дихання, зростання і розмноження — вивчає фізіологія. У основі фізіологічних функцій лежить безперервний обмін речовин (метаболізм). Суть обміну речовин складають два протилежних, але взаємозв'язаних процеси: асиміляція (анаболізм) і дисиміляція (катаболізм).

Асиміляція — це засвоєння живильних речовин і використання їх для синтезу клітинних структур.

При процесах дисиміляції живильні речовини розщеплюються і окислюються, при цьому виділяється енергія, необхідна для життя мікробної клітини. Всі процеси синтезу і розпаду живильних речовин здійснюються за участю ферментів. У мікроорганізмах відбувається інтенсивний обмін речовин, за добу 1 мікробна клітина може переробити живильних речовин в 30—40 разів більше її маси.

Мікробна клітина використовує живильні субстрати для синтезу складових частин свого тіла, ферментів, пігментів, зростання.

Зростання — це збільшення розмірів окремої особини.

Розмноження — здібність організму до відтворення.

Основним засобом розмноження у бактерій є поперечне ділення, яке відбувається в різних площинах з формуванням багатобразних поєднань, клітин (грони, ланцюжки, пакунки і т. д.). У бактерійних клітин діленню передують подвоєння материнської ДНК. Кожна дочірня клітина отримує копію материнської ДНК. Процес ділення вважається закінченим, коли цитоплазма дочірніх клітин розділена перегородкою. Клітини з перегородкою ділення розходяться в результаті дії ферментів, які руйнують серцевину перегородки.

Швидкість розмноження бактерій різна і залежить від виду мікроба, віку культури, живильного середовища, температури.

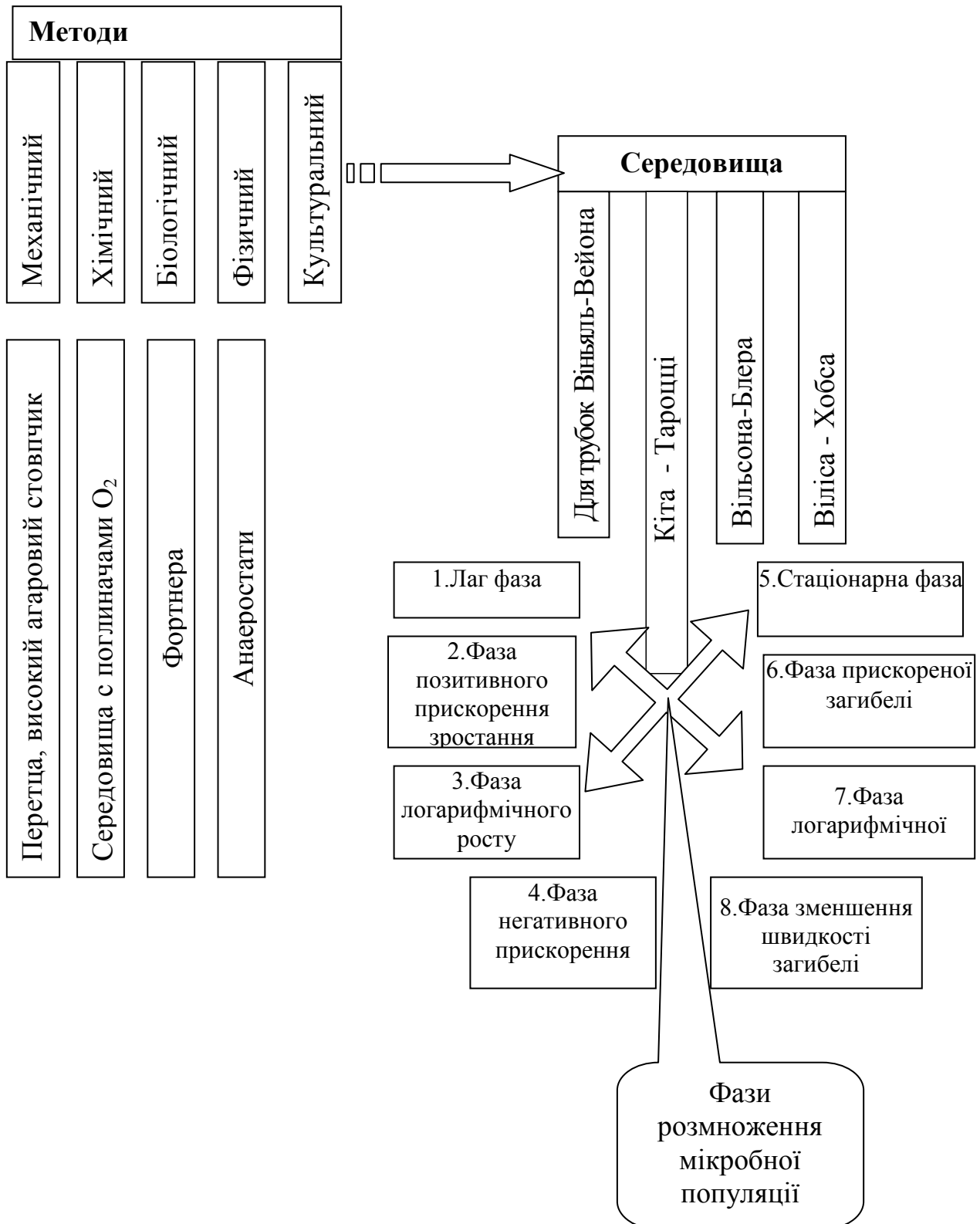
При вирощуванні бактерій в рідкому живильному середовищі спостерігається декілька фаз зростання культур:

1. Фаза підсумкова (латентна) — мікроби адаптуються до живильного середовища, збільшується розмір клітин. До кінця цієї фази починається розмноження бактерій.
2. Фаза логарифмічного інкубаційного зростання — йде інтенсивне ділення клітин. Триває ця фаза близько 5 годин. За оптимальних умов бактерійна клітина може ділитися кожні 15—30 хвилин.
3. Стаціонарна фаза — число бактерій, що знов з'явилися, рівне числу відмерлих. Тривалість цієї фази виражається в годинах і коливається від виду мікроорганізмів.
4. Фаза відмирання — характеризується загибеллю клітин в умовах виснаження живильного середовища і накопичення в ній продуктів метаболізму мікроорганізмів.

Якщо живильне середовище, в якому культивуються мікроорганізми, оновлюватиметься, то можна підтримувати фазу логарифмічного зростання.

Графологічна структура теми:

“Фізіологія мікроорганізмів. Культивування анаеробів”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.6

Фізіологія мікроорганізмів. Культивування анаеробів

Завдання 1. Знайомство з різними живильними середовищами для виділення аеробів:

Таблиця 1

| Середовища | Приклади мікрорганізмів | Назва середовища |
|-----------------------------|-------------------------|------------------|
| елективні | | |
| диференціально-діагностичні | | |
| основні | | |

Завдання 2. Техніка приготування поживних середовищ.

а) рН МПБ визначається за допомогою _____
перевірка показала рН _____, що означає МПБ (придатний/непридатний) для використання

рН можна виправити _____

б) для приготування щільного (5%) поживного МПА на _____ чашок Петрі (по 20 мл на чашку) потрібно _____ г агар-агару, та _____ мл МПБ

в) для приготування напіврідкого (0,5%) середовища Гіса на _____ пробірок (по 2 мл на пробірку) потрібно г агар-агару, та _____ мл пептоної води

Завдання 3. Виділення чистої культури анаеробів:

а) Таблиця 2. Середовища та методи культивування анаеробів

| Метод, середовище | Умові створення анаеробіозу |
|--|-----------------------------|
| Фізичний | |
| Хімічний | |
| Біологічний | |
| Кіта—Тароцці | |
| Вільсона-Блера | |
| СКС (середовище контролю стерильності) | |
| Високий стовпчик агару | |

б) умови посіву анаеробів _____

в) ознаки росту, вигляд колоній _____

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.7
ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ
ТА ДЕЗІНФЕКЦІЇ. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ СТЕРИЛІЗАЦІЇ.

Актуальність теми: Виконання правил асептики й антисептики, стерильність використовуваного інструмента і матеріалів є одним з найважливіших вимог у роботі лікаря будь-якої спеціальності. Застосовувані в кожному випадку методи асептики, антисептики, дезінфекції і стерилізації будуть ефективні, якщо вони обрані з урахуванням механізму впливу фізичних і хімічних факторів на мікроорганізми, стійкості бактерій до цих факторів.

Мета(загальна): уміти використовувати методи асептики, антисептики і дезінфекції, пояснювати принципи роботи апаратури для стерилізації, визначити ефективність стерилізації та дезінфекції.

Конкретні цілі - уміти:

1. Пояснювати дію фізичних та хімічних факторів на мікроорганізми.
2. Вибирати оптимальні методи знезараження для інструментів, поживних середовищ, лабораторного посуду тощо.
3. Пояснювати устрій та принципи роботи автоклаву, сухожарової шафи, бактеріальних фільтрів.
4. Пояснювати суть та призначення дрібних методів стерилізації.
5. Контролювати якість стерилізації за допомогою плавких індикаторів, тест - культур та контрольних посівів.

Вихідний рівень знань — умінь:

1. Пояснювати залежність температури кипіння рідини від тиску (кафедра фізики).
2. Пояснювати зміни у структурі білків під дією високої температури. Дію ультрафіолету на ДНК (кафедра біохімії).
3. Вміти розраховувати концентрацію розчинів (кафедра хімії).

Для, того щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань -умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Яка залежність температури кипіння рідини від тиску? А.Лінійна В.Квадратична С.Обернено-пропорційна залежить Е.Немає вірної відповіді

Завдання 2. Чи зміниться структура білків під дією високої температури?

А.Так,крім первинної

В.Так,крім вторинної

С.Ні,крім первинної

Б.Не зміниться

Е.Природну властивість білка повернути неможливо

Завдання 3. Концентрація розчинів це:

А.Маса речовини, яка може розчинитись у 100 г розчинника

В.Скільки грамів розчиненої речовини міститься в 100 гр розчину

С.Скільки молей розчиненої речовини міститься в 1 л розчину

Б.Вміст розчиненої речовини в об'єму розчину або одиниці маси

Е.Вміст розчиненої речовини в одиниці маси або об'єму розчину

Інформацію для поповнення знань - умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Биохимия /Под ред. акад. А.Баева М: Изд.Мир, 1976. С.21-43.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія -М.:Київ; "Укрмедкнига" 2000.-115с.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Механізм дії на мікроби високих і низьких температур, тиску, ультразвуку, різних видів променистої енергії, рН, рО, рСО₂, осмотичного тиску і різних груп хімічних сполук.
2. Поняття про стерилізацію і її види.
3. Однократні, дрібні і комбіновані способи стерилізації.
4. Сучасна апаратура для стерилізації.
5. Поняття про асептику і її зміст.
6. Поняття про антисептику. Розробка наукових принципів антисептики (І. Земельвейс, Д. Лістер).
7. Поняття про дезінфекції і її зміст.
8. У чому полягає відмінність понять асептики, антисептики, стерилізації і дезінфекції, хоча всі вони спрямовані проти мікроорганізмів?
9. Як визначити ефективність стерилізації, асептики, антисептики і дезінфекції?

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиологія. М.: Медицина, 2005.-С. 150-158.
2. Матеріал лекції «Фізіологія мікроорганізмів».
3. Керівництво до лабораторних робіт по мікробіології під ред. Л.Б.Борисова. С. 36-42.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С. 97-100, 136.
5. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 45-56.

Матеріали та обладнання: автоклави, пальники, піч Пастера, ультрафіолетові лампи, бактеріальні фільтри, індикатори плавлення, дезінфікуючі розчини, лабораторний посуд, поживні середовища, дрібний металевий інструмент.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Ознайомитися з апаратурою, яка використовується для стерилізації проточним паром, паром під тиском, сухим жаром. Відмітити у протоколі, які саме об'єкти стерилізують кожним з цих методів, як їх готують до стерилізації.
2. Вивчити правила і техніку стерилізації бактеріологічних петель і голок, дрібного інструментарію відкритим полум'ям, простерилізувати дрібні метали і нейтралізувати. Вивчити принцип використання і призначення механічних засобів стерилізації (фільтри Зейтца, свічі Шамберлана, сито Перфильєва, мембранні нітроцелюлозні та пластинчасті азбестові фільтри).

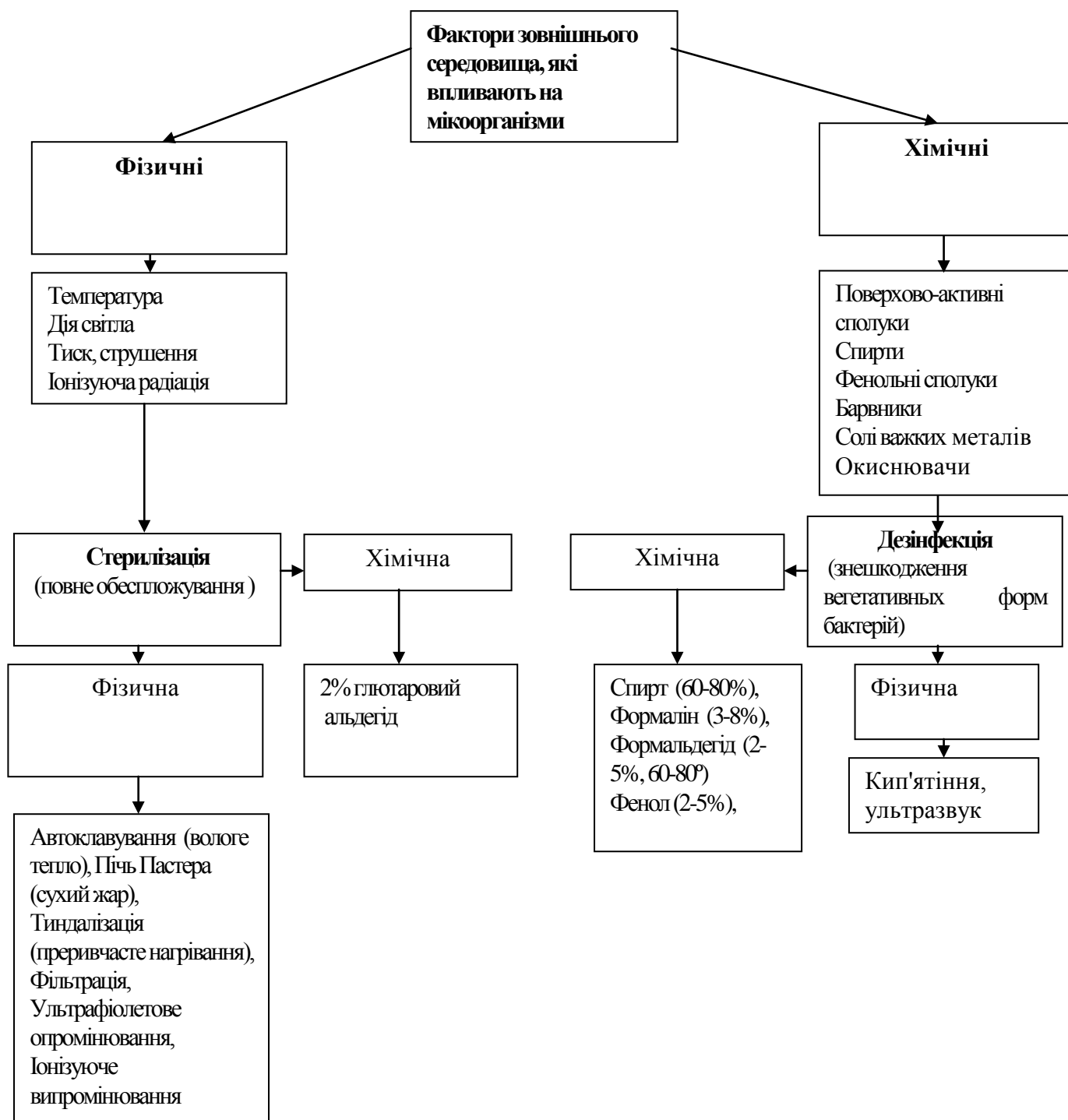
3. Ознайомитись з дезинфекуючими речовинами, які використовуються в мікробіологічній практиці. Відмітити в протоколі назви цих речовин, використовуванні концентрації та сферу застосування.
4. Вивчити методи контролю якості стерилізації (використати індикацію плавлення, тест-культури), записати до протоколу відповідні приклади.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання.

1. Виберіть режими стерилізації таких живильних середовищ: прості (МПА, МПБ), з вуглеводами, молоком, желатином, білкові чи яєчні (цільні), білкові рідкі.
2. У хворого з випорожнень виділена культура збудника холери. Які речовини й у якій концентрації будуть використані для дезінфекції посуду, предметів побуту, білизни?
3. Для одержання бактеріальних екзотоксинів мікроорганізми засівають на рідке живильне середовище, де вони культивуються і куди виділяють ці токсини. На першому етапі необхідно видалити із середовища мікробні клітини, тобто відокремити токсини від мікробів. Які прилади необхідні для цього? Чи буде повною стерилізація і як це можна перевірити?
4. Лікар-бактеріолог одержав завдання організувати бактеріологічну лабораторію в лікарні. Яке устаткування він повинний закупити для вирощування мікроорганізмів, стерилізації, проведення мікробіологічних досліджень?

Графологічна структура теми:

“Мікробіологічні основи стерилізації та дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.7

Мікробіологічні основи стерилізації і дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації.

Завдання № 1. Ознайомились з апаратурою для стерилізації, її обладнанням і принципом роботи:

Завдання № 2. Ознайомились с фізичними і механічними методами стерилізації (перелічити і вказати режими):

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Завдання № 3. Ознайомились с дезінфікуючими розчинами, що використовують для різних видів дезінфекції:

- | | |
|----------|----------|
| 1. _____ | 5. _____ |
| 2. _____ | 6. _____ |
| 3. _____ | 7. _____ |
| 4. _____ | 8. _____ |

Завдання № 4. Контроль якості стерилізації та дезінфекції

| Назва методу | Приклади |
|--------------|----------|
| | |
| | |
| | |
| | |

Дата _____ Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.8

ТЕМА: ГЕНЕТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ.

Актуальність теми. При діагностиці інфекційних захворювань використовуються головним чином спадкові, генетично обумовлені ознаки, характерні для даного виду, штаму, біовару, серотипу, коліцинотипу та ін. бактерій. Знайшли широкого використання методи діагностики, засновані на специфічності мікробної ДНК – полімеразна ланцюгова реакція та ДНК - гібридизація. Генетичний критерій (визначення % Г-Ц пар) є одним з основних при класифікації бактерій. Дія антимікробних препаратів може бути заснована на пошкодженні їхнього генетичного апарату. В той же час, зі спадковою мінливістю пов'язана поява лікарської стійкості мікроорганізмів. Сучасний розвиток біотехнології та генної інженерії, завдяки якому медицина отримала численні лікарські засоби та біологічно-активні препарати, також став можливим на основі ґрунтовного вивчення генетики мікроорганізмів. Одержання мутантних форм патогенних бактерій, що зберігають антигенну структуру, але втрачають патогенні властивості, лежить в основі створення живих вакцин. Тому знання генетики бактерій є важливим елементом в освіті лікаря, його практичній лікувально-профілактичній роботі.

Мета (загальна): уміти використовувати спадкові ознаки бактерій для діагностики інфекційних захворювань і при епідеміологічному аналізі.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати особливості генетичного апарату бактерій, роль позахромосомних факторів спадковості.
2. Розрізняти фенотипову та генотипову, комбінативну та мутаційну мінливість у бактерій.
3. Виявляти антибіотико-резистентні форми бактерій, використовувати цю ознаку для визначення джерела інфекції.
4. Використовувати ауксотрофні мутанти як біологічні індикатори наявності певних органічних речовин у досліджуваному субстраті.
5. Враховувати та інтерпретувати результати дослідження з визначення коліцинотипу бактерій.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Тракувати роль нуклеїнових кислот у живій клітині, та їхню хімічну структуру (біохімія).
2. Розкривати сутність понять „генотип” та „фенотип”, „спадковість” та „мінливість” (медична біологія).
3. Пояснювати механізми мутагенної дії фізичних та хімічних чинників (біохімія).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Які речовини є носіями спадкової інформації у клітинних форм життя? а) нуклеотиди; б) білки – гістони; в) і- РНК, г) ДНК; д) азотисті основи.

Завдання 2. Які з вказаних хімічних сполук є складовими молекул ДНК? 1- лактоза, 2- рибоза, 3-фосфорна кислота, 4- ізолимонна кислота, 5-аденін, 6-цитозин, 7- урацил, 8- лігаза.

Завдання 3. Від чого залежить фенотип будь-якого організму?

Завдання 4. Як відрізнити спадкову мінливість від неспадкової?

Завдання 5. Які з названих фізичних чинників мають мутагенну дію? 1- УФ- випромінювання, 2- альфа- випромінювання, 3- гама- випромінювання, 4- різкі коливання температури, 5- вібрація, 6- високий тиск.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Биология /под ред. В.Н.Яригина.- М.: Высшая школа.- 2004.

2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Генотип і фенотип бактеріальної клітини. Модифікаційна мінливість у мікроорганізмів.

2. Збереження та передача спадкових ознак у бактерій. Генетичний апарат прокариотної клітини. Карти хромосом, "генетичні маркери".

3. Поняття про плазмиди. Їхні види й основні властивості, біологічне значення.

4. Види мутацій. Мутагени. Поняття про репарації в клітинах бактерій. Практичне використання бактерій-мутантів.

5. Поняття "генетична рекомбінація". Фізіологічне значення явища.

6. Трансформація. Механізм. Поняття про стан компетентності.

7. Трансдукція. Механізм. Поняття про трансдукуючі фаги. Лізогенія та лізо-генна конверсія.

8. Кон'югація. Механізм. Поняття про фертильність.

9. Генна інженерія, її методи та досягнення.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005.С. 92-118.

2. Воробьев А.А.и др. Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 81 - 104.

3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 68-75.

4. Лекція "Генетика мікроорганізмів".

5. Броду П. Плазмиды. М.: Мир, 1984.

6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С.105-123.

7. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 392-404, 415-418.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Генетика мікроорганізмів” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: таблиці: „Трансформація”, „Кон'югація”, „Трансдукція”, чашки Петрі з МПА, з елективними середовищами, диски з антибіо-

тиками, диски з фенілаланіном і досліджуваними сироватками, культури *S.aureus*, *B.subtilis*, *S.sonne*, *E.coli*.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

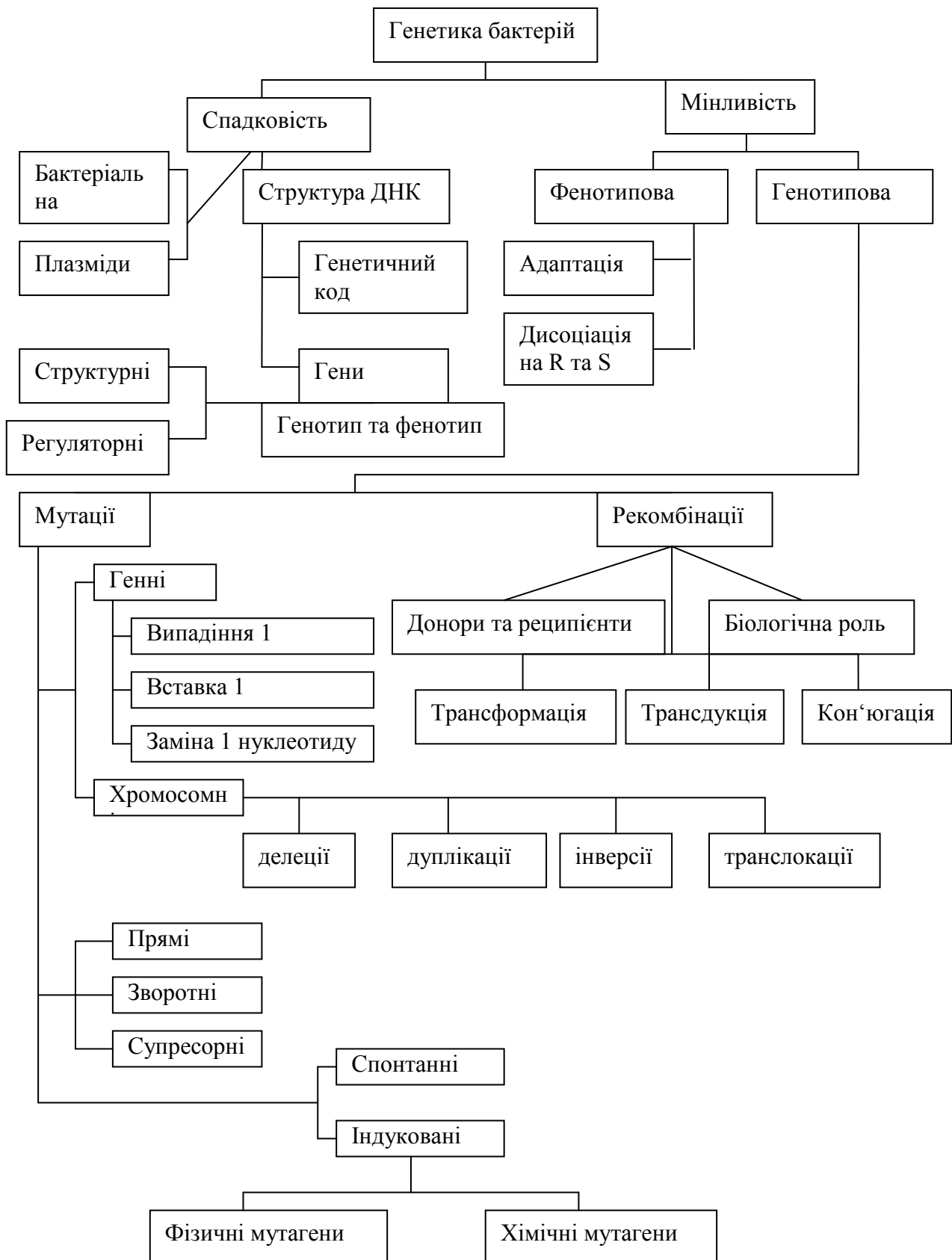
1. Виявлення антибіотикорезистентних мутантів *S.aureus*. Розглянути посів *S.aureus* газоном на МПА з дисками антибіотиків, знайти зони затримки росту та визначити їх діаметр. Знайти колонії, які виросли у зоні затримки росту - передбачувано це мутаційні форми, стійкі до цих речовин. Перевірити, чи є антибіотикорезистентність спадковою, відсіявши колонії, які виросли в зоні затримки росту на скошений агар із середовищем, що містить відповідний антибіотик. Врахувати результат посіву, зробити висновок про природу мінливості, що спостерігається.
2. Провести мікробіологічну діагностику фенілкетонурії - генетичного захворювання, що виявляється методом скрінінга в немовлят. Для цього використовується ауксотрофний мутант *B.subtilis*, якому для росту необхідна амінокислота фенілаланін. Його засівають газоном на мінімальне живильне середовище без цієї амінокислоти. На поверхню середовища поміщають диски фільтрувального папера, просочені сироваткою обстежуваних. Контроль - диск із фенілаланіном. Фенілкетонурія діагностується за ростом культури навколо диска.
3. Дослідження трансдукції гену *lac* у кишкової палички. Розібрати схему постановки досліду за таблицею, розглянути посіви донора та реципієнта на середовищі Ендо, порівняти колір колоній. Врахувати результати посіву рекомбінантів на цьому ж середовищі. Підрахувати загальну кількість колоній (a) та кількість колоній рекомбінантів (b). Обчислити частоту трансдукції за формулою: $(b / a) \times 100\%$.
4. Дослідження переносу гену *leu+* при кон'югації. Розібрати за таблицею схему постановки досліду кон'югації, відмітити у протоколі властивості донора та реципієнта. Врахувати результати досліду. Для визначення загальної кількості живих клітин у 1 мл (a) підрахувати кількість колоній на 3 чашках з МПА, поділити на розведення (звичайно $10^{-5} - 10^{-8}$) та об'єм засіяної рідини (звичайно 0,1 мл). Для визначення кількості рекомбінантів (b) підрахувати кількість колоній на елективному середовищі, поділити на розведення (звичайно $10^{-1} - 10^{-3}$) та об'єм засіяної рідини (звичайно 0,1 мл). Обчислити частоту переносу гену при кон'югації за формулою, аналогічної попередній.
5. Визначити коліцинотип збудника дизентерії прискореним методом. Розглянути посів досліджуваного штаму на МПА зроблений „газоном”, знайти посіви трьох еталонних коліциногенних штамів кишкової палички, зроблені „бляшками” поверх посіву досліджуваного штаму. Відмітити затримку росту досліджуваної культури навколо еталонних штамів, зробити висновок про її коліцинотип.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. Як довести, що ознака, виявлена у культури бактерій, є спадковою?
2. Як визначити частоту рекомбінацій у дослідах кон'югації і трансдукції?

3. Що таке ауксотрофні мутанти і як вони можуть бути використані?
4. Як можна використовувати коліцинотипування з метою епідеміологічного аналізу?
5. Для постановки досліду трансдукції використовувалася культура *E.coli lac-* і вірулентний фаг, отриманий на культурі *E.coli lac+*. На живильному середовищі, яке містить лактозу як єдине джерело вуглецю, ріст колоній трансдуктантів не виявлений. Як це можна пояснити?

Графологічна структура теми : “Генетика бактерій”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.8 Генетика бактерій

Завдання 1. Виявлення антибіотикорезистентних мутантів *S.aureus*.

Врахування чутливості до антибіотиків за діаметром зони затримки росту навколо стандартних дисків, які містять

пеніцилін _____ мм стрептоміцин _____ мм тетрациклін _____ мм

У зоні затримки росту навколо диска з _____ спостерігається ріст одиничних колоній, які є _____ до цього антибіотика.

При відсіві цих колоній на середовище з антибіотиком культура _____. Це означає, що признак стійкості до антибіотика _____.

Завдання 2. Мікробіологічний метод діагностики фенілкетонурії.

Умовні позначення:

1. Контрольний диск з фенілаланіном
2. Диск із сечею хворого №1
3. Диск із сечею хворого №2
4. Ріст тест-культури навколо дисків

Рис.1. Схема постановки досліду

Висновок: _____

Завдання 3. Дослідження трансдукції гену *lac* у кишкової палички.

Штам-донор _____

Штам- реципієнт _____

Спосіб переносу донорської ДНК у клітину реципієнта _____

Елективне середовище для виявлення рекомбінантів _____

Колонії реципієнта _____, колонії рекомбінантів _____

Частота трансдукції: _____

Завдання 4. Дослідження переносу гену *leu+* при кон'югації.

Штам-донор _____

Штам- реципієнт _____

Спосіб переносу донорської ДНК у клітину реципієнта _____

Середовище для підрахунку загальної кількості живих клітин _____, кількість колоній _____

Елективне середовище для виявлення рекомбінантів _____

_____ кількість колоній _____.

Штам-донор на ньому не росте, тому що _____,

а штам- реципієнт не росте, тому що _____

Частота рекомбінації _____

Завдання 5. Визначення коліцинотипа збудника дизентерії прискореним методом за 3 еталонними коліциногенними штамми кишкової палички.

Умовні позначення:

Посіви еталонних штамів

1).K₁₂, 2).B, 3)G

4)ріст досліджуваної культури навколо еталонних штамів

Рис.2. Схема постановки досліду

Висновок: _____

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.9

ТЕМА: ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНІ ПРЕПАРАТИ. АНТИБІОТИКИ.

Актуальність теми. Хіміотерапія інфекційних захворювань – це лікування бактеріальних, вірусних, грибкових і протозойних захворювань за допомогою хіміотерапевтичних засобів. Ці речовини мають дуже важливу властивість – вибірковість дії проти патогенних мікроорганізмів в умовах макроорганізму. У випадку, коли такі ж лікарські засоби використовують з профілактичною метою, це – хіміопрофілактика.

Сучасному лікарю потрібно не тільки правильно призначити антибіотик чи інший антибактеріальний препарат, але чітко дотримуватися дози та ритму його введення. Концентрація антибіотика в тканинах і рідинах організму поряд з антимікробною активністю є одним з основних параметрів, що визначають ефективність антибіотикотерапії.

Мета (загальна): уміти оцінювати антибіотикограму для правильного призначення та вибору ефективного препарату для лікування інфекційних хвороб, запальовальних процесів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі:

1. Користуватися одиницями виміру антимікробної активності антибіотиків та розраховувати їх хіміотерапевтичний індекс.
2. Визначати чутливість бактерій до антибіотиків методами стандартних дисків та серійних розведень.
3. Аналізувати антибіотикограму збудника захворювання.
4. Оцінювати концентрацію антибіотиків у біологічних рідинах.
5. Пояснювати механізми лікарської стійкості бактерій та принципи боротьби з нею.
6. Тракувати принципи раціональної антибіотикотерапії.

Базовий рівень знань - умінь:

1. Готувати кратні розведення біологічної рідини, визначати їх концентрацію у отриманих розведеннях (кафедра біохімії).
2. Пояснювати будову бактерій, грибів та актиноміцетів (кафедра медичної біології).
3. Тракувати генетичні механізми лікарської резистентності.
4. Описувати відмінності структур еукариотичної клітини від прокариотичної.

Для того, щоб Ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Якщо у пробірку з 1 мл біологічної рідини додати 9 мл фізіологічного розчину, то отримуємо розведення 1:10. Як отримати розведення 1:100?

Завдання 2. Поясніть будь ласка характерні морфологічні особливості актиноміцетів.

Завдання 3. Як називається фактор, який підтримує лікарську резистентність у бактеріальній клітині.

Завдання 4. Різниця будови прокариотичної клітини від еукариотичної.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.Медицина.-1998..
2. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.:Медицина.-2002.-725с.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология/ Под ред. Л.Б.Борисова.- М.:МИА.-2005.-С. 30-32, 42, 94-99,110-114.
4. Медицинское информационное агенство.-Москва.-2002.-С.30-32, 96.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Поняття про хіміотерапію і хіміопрофілактику.
2. Властивості хіміотерапевтичних препаратів. Хіміотерапевтичний індекс.
3. Визначення поняття "антибіотики". Історія відкриття антибіотиків.
4. Класифікація антибіотиків за походженням. Приклади.
5. Класифікація антибіотиків за механізмом дії. Навести приклади.
6. Класифікація антибіотиків за спектром дії.
7. Лікарська стійкість мікроорганізмів.
8. Мікробіологічні основи раціональної антибіотикотерапії.
9. Негативні наслідки застосування антибіотиків.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С. 160-183.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.105-115.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Л.Б.Борисова, М.: Медицина,1984.- С.75-79.
4. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982. – 475 с.
5. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина, 1982.- С.35-40, 170-181.
6. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. - С.207-212.
7. Лекція з теми «Антибіотики».
8. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С. 124-135.
9. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 129-132.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з МПА, суспензія *S.aureus*, набір дисків з антибіотиками, розчин бензилпеніциліну, піпетки, пінцети.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Познайомилися з основними властивостями хіміотерапевтичних препаратів:
а) **нешкідливість** (визначається по хіміотерапевтичному індексу)

min терапевтична доза

$ХТІ = \frac{\text{min терапевтична доза}}{\text{макс переносима доза}} < 1$

макс переносима доза

якщо індекс < 1 , препарат може бути використаний для лікування, якщо > 1 , то введення препарату буде супроводжуватися токсичними явищами.

Користуючись таблицями, розрахувати ХТІ для двох антибіотиків. Визначити який з них менш шкідливий.

б) виборча дія на мікроорганізми (антимікробний спектр).

За допомогою таблиці навести приклади антибіотиків кожної групи (2-3) назви.

- на Гр - бактерії;

- на Гр + бактерії;

- на патогенні гриби і т.і.

в) бактеріостатична дія – пригнічення росту і розмноження мікробів;

бактеріцидна дія – викликає загибель бактерій;

Записати до протоколу назви антибіотиків кожної групи.

г) формування лікарсько-стійких форм мікроорганізмів.

Користуючись підручником, визначити та записати до протоколу основні механізми лікарської стійкості мікроорганізмів.

2. Визначення чутливості до антибіотиків *S.aureus* методом стандартних дисків.

На поверхню живильного середовища в чашці Петрі, де "газоном" засіяна досліджувана культура, помістити на рівній відстані один від одного стандартні паперові диски, що містять певні дози різних антибіотиків. Зробити вимір діаметру зони затримки росту культури *S.aureus* навколо дисків з антибіотиками. Результати занести до протоколу. За допомогою табл.1 (додаток) визначити ступінь чутливості культури до антибіотиків. Дати рекомендації щодо призначення антибіотиків для лікування хворого.

3. Визначити МПК антибіотика методом серійних розведень. Для цього готують основний розчин, що містить 1000 ОД/мл бензілпеніциліну, а, також, потім його декілька двократних розведень у МПБ. Додають до кожного розведення 0,1 мл суспензії *S.aureus*, що містить 1 млрд мікробних клітин в 1 мл. Культивують у термостаті 18-24 години. Вивчають результати: остання пробірка з прозорим живильним середовищем вказує на концентрацію антибіотика, що міститься в ній. Результати занести до протоколу. Використовуючи таблицю №2 (додаток), порівняти МПК *in vitro* з тією, що досягається у крові. Зробити висновок про доцільність лікування даним антибіотиком.

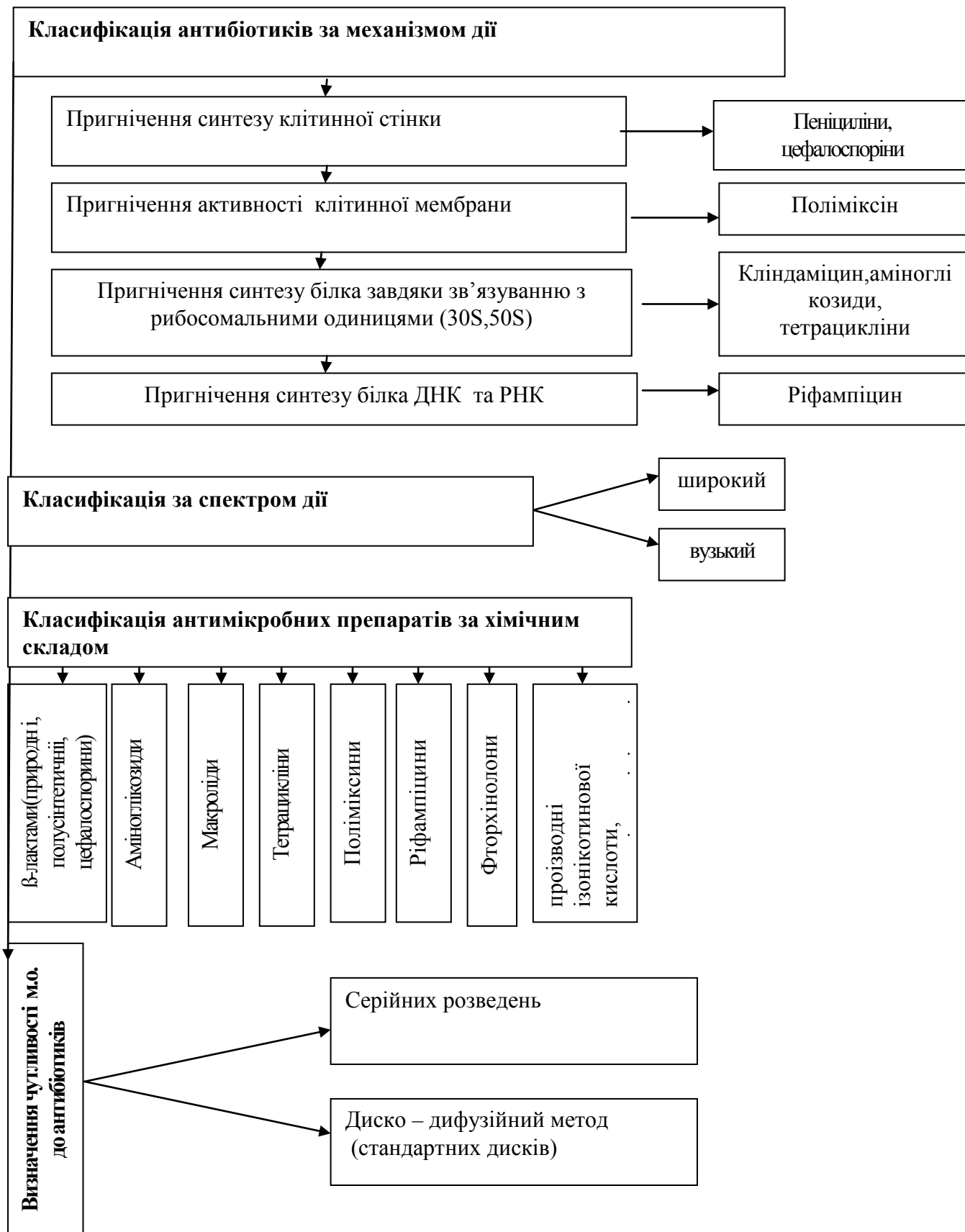
4. Визначити концентрацію антибіотика (тетрацикліну) у крові людини. В штатив встановлено 2 ряди пробірок: 1 ряд – розведення еталонного штаму антибіотика (тетрацикліну), 2 ряд – розведення крові, взятої у хворого, якого лікують тетрацикліном. В кожен пробірник внесена суспензія *S.aureus*, що вирос на середовищі Гіса з глюкозою. Посіви інкубують добу. Результати оцінюють по помутнінню середовища і його фарбування індикатором внаслідок розщеплення глюкози стафілококом. Концентрація антибіотиків мкг/мл визначається множенням найбільшого розведення крові, що затримує ріст стафілокока, на мінімальну концентрацію еталонного антибіотика, що затримує ріст цього мікроба. Робиться висновок про ефективність проведеної антибактеріальної терапії.

Навчальні завдання:

1. У хворого на підставі огляду встановлений попередній діагноз – „піодермія”. Які попередні дослідження необхідно призначити перед антибіотикотерапією ?
2. З крові хворого з клінічним діагнозом „сепсис” виділена культура клебсієли. МПК полімексіну у МПБ складає 7 мкг/ мл . Яку дозу антибіотика на добу необхідно вводити хворому?(таблиці у „додатку”).
3. У післяопераційних хворих хірургічного відділення в 55% випадків загоєння ран ускладнюється нагнійними процесами. Які дослідження необхідно провести, щоб виявити джерело захворювання?

Графологічна структура теми:

“Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики”



Зразок протоколу до практичного заняття № 11

Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики

Завдання 1. Познайомилися з властивостями хіміотерапевтичних препаратів

1. Нешкідливість для людини

Назви антибіотиків:

1.

2.

ХТІ (1)= ; ХТІ(2)= .

Менш шкідливий є -

2. Вибірча дія на мікроорганізми (антимікробний спектр):

- на Гр – бактерії _____

- на Гр + бактерії _____

- на патогенні гриби _____

- на найпростіші _____

3. Бактеріостатична дія чи бактеріцидна дія

бактеріостатична _____

бактеріцидна дія _____

4. Формування лікарсько-стійких форм мікроорганізмів _____

Завдання 2. Визначення чутливості до антибіотиків *S.aureus* методом стандартних дисків.

Зони затримки росту *S.aureus* навколо дисків з антибіотиками (мм)

| Назва бактерій | Назва антибіотиків | | | | |
|---------------------|--------------------|--|--|--|--|
| Зона затримки росту | | | | | |
| <i>S.aureus</i> | | | | | |

Висновок: для лікування хворого рекомендовано антибіотики

_____, тому що _____

Завдання 3. Визначення чутливості бактерій до антибіотика методом серійних розведень (визначення МПК)

| Назва бактерій | Доза бензілпеніциліну (мкг/мл) | | | | | | | | | Контроль МПБ |
|-----------------|--------------------------------|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|--------------|
| | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,2 | 15,6 | 7,8 | 3,9 | 1,9 | 0 |
| <i>S.aureus</i> | | | | | | | | | | |

(+) – ріст мікробів

(-) – затримка росту

Висновок: затримка росту *S.aureus* спостерігається при концентрації бензілпеніциліну мкг / мл. Отже, МПК антибіотика.

Завдання 4. Визначення антибіотика (тетрацикліну) у кровіОблік дослідження (тест-мікроб) - *S.aureus*

| Компоненти | Розведення компонентів | | | | | | |
|---|------------------------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Еталонний антибіотик (тетрациклін) мкг / мл | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 |
| Облік результатів | | | | | | | |
| Досліджувана рідина (кров) у розведеннях | 1:8 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 |
| Облік результатів | | | | | | | |

Облік: (+) – ріст мікробів

(-) – затримка росту

Висновок: _____

Дата _____

Підпис викладача _____

Таблиця 1

Мінімальні пригнічуючі концентрації антибіотиків.

| Антибіотики | Вміст антибіотика в диску, мкг | МПК, мкг/мл | |
|----------------|--------------------------------|-------------|---------|
| | | стійкі | чутливі |
| Бензілпеніцилі | 6 | - | 0,1 |
| Ампіцилін | 10 | - | 0,2 |
| Карбеніцилін | 25 | 32 | 16 |
| Метіцилін | 10 | - | 3 |
| Оксацилін | 10 | - | 3 |
| Цефалексін | 30 | 32 | 10 |
| Цефалотін | 30 | 32 | 10 |
| Стрептоміцин | 30 | 15 | 6 |
| Неоміцин | 30 | - | 10 |
| Канаміцин | 30 | 25 | 6 |
| Мономіцин | 30 | - | 10 |
| Гентаміцин | 10 | 6 | 4 |
| Рістоміцин | 30 | - | 5 |
| Сизоміцин | 10 | 6 | 4 |
| Тетрациклін | 30 | 12 | 2 |
| Доксициклін | 10 | 12 | 2 |
| Еритроміцин | 15 | 8 | 2 |
| Лінкоміцин | 15 | 8 | 2 |
| Левоміцетин | 30 | 15 | 8 |
| Рифампіцин | 5 | 8 | 2 |
| Фузидін | 10 | 16 | 2 |
| Поліміксін | 300 ОД | 500Д/мл | |

Таблиця 2

**Значення граничних концентрацій антибіотиків в крові для поділу
мікроорганізмів на чутливі та стійкі**

| Антибіотик | Терапевтична концентрація у крові (мкг/мл) при використанні середніх доз. | Антибіотик | Терапевтична концентрація в крові (мкг/мл) при використанні середніх доз |
|-----------------|---|--------------|--|
| Бензілпеніцилін | 0,5-2 (ОД/мл) | Еритроміцин | 3-5 |
| Метіцилін | 10-15 | | |
| Оксацилін | 4-6 | Ванкоміцин | 10-15 |
| Ампіцилін | 15-25 | Фузидін | 10-20 |
| Карбеніцилін | до 250 для до 32 для і ін.м/о | Тетрациклін | 3-5 5-Ю 20- |
| | | Левоміцетин | 25 |
| | | Стрептоміцин | |
| Цефалотін | 15-25 | Канаміцин | 15-20 |
| Цефалоспін | 15-25 | Гентаміцин | 6-8 |
| Цефалексін | 15-25 | Тобраміцин | 6-8 |
| Лінкоміцин | 10-15 | Сизоміцин | 6-8 |
| Рифампіцин | 15-25 | Поліміксін | 10-15 |

Таблиця 3

Зміна концентрації антибіотиків у крові в залежності від застосованих доз.

| Антибіотик | Середнь о - добова доза | Метод введенн я | Концентра ція антибіотик а в крові | Максимальна добова доза | Метод введення | Концентрація антибіотика в крові, мкг/мл |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------|---|--|-------------------|--|
| Бензілпеніцил ін | 500000 ОД | в/м | 0,5 ОД/мл | 500000 ОД натрієвої чи калієвої солі | в/м | 5 ОД/мл |
| Еритроміцин | 1,5 | per os | 5 | 1,5 | в/в | 15 |
| Олеандоміцин | 2,0 | | 2 | 2 | -/- | 5 |
| Новобіюцин | 1,5 | -/- | 20 | 3 | per os | 40 |
| Тетрациклін | 1.0 | -/- | 2 | 2 | в/в | 10 |
| Левоміцетин | 2,0 | -/- | 15 | - | - | - |
| Стрептоміцин | 1,0 | в/м | 10 | 3 | в/м | 30 |
| Канаміцин | 1,0-1,5 | | 20 | 2 | -/- | 40 |
| Поліміксін В | 0.1-1,5 | -/- | 1-2.5 | 0,2 | -/- | 4-8 |

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.10

ТЕМА: НЕСПЕЦИФІЧНІ ФАКТОРИ ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ

Актуальність теми. Неспецифічна резистентність – важливіша ланка захисту організму від агресивних агентів зовнішнього та внутрішнього середовища. Опір організму інфекціям, його захист від мікроорганізмів значною мірою залежить від непроникності шкірних та слизових покривів для більшості бактерій та вірусів, наявності бактерицидних речовин у секреті шкірних залоз, кислотності вмісту шлунку, присутності у крові та інших рідинах організму таких ферментних систем, як лізоцим, комплемент, пропердин, фібрoneктин, інтерферон, бета-лізіни тощо, від кількості та активності фагоцитів крові і тканин. Особливість функціонування цих факторів захисту полягає у тому, що воно здійснюється без включення специфічних імунологічних механізмів і не супроводжується спеціальною перебудовою імунної системи. Дещо особливе місце займають фагоцити та система компліменту: акт фагоцитозу не є специфічним, але макрофаги беруть участь у переробці антигенів та у кооперації з лімфоцитами, необхідній для імунної відповіді; система комплементу разом з антитілами забезпечує лізіс чужерідних клітин. Дослідження факторів неспецифічної резистентності дозволяє лікарю скласти уяву про загальний стан реактивності організму хворого, що має як діагностичне, так і прогностичне значення.

Мета (загальна): уміти оцінювати стан неспецифічних факторів захисту організму людини для визначення на наступних кафедрах відхилень від норми при різних патологічних процесах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати роль факторів неспецифічної резистентності у захисті організму від агресивних агентів зовнішнього та внутрішнього середовища.
2. Оцінювати бактерицидні властивості шкіри.
3. Визначати титр лізоциму у слині.
4. Визначати вміст комплементу у сироватці крові.
5. Розраховувати показники фагоцитарної активності.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати будову шкіри, функції шкірних залоз (кафедра анатомії).
2. Інтерпретувати хімічний склад слини та сироватки крові (кафедра біохімії).
3. Готувати кратні розведення біологічних рідин, визначати їхню концентрацію у отриманих розведеннях (кафедра біохімії).
4. Пояснювати морфологічні та функціональні властивості фагоцитуючих клітин, розпізнавати фагоцити у мікропрепаратах крові (кафедра гістології).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Поясніть: а) яким чином здійснюється природне видалення з поверхні шкіри мікробних та інших забруднень; б) яка речовина забезпечує механічну міцність шкіри, у якому шарі шкіри вона розташована.

Завдання 2. а) Відмітьте ферменти, які входять до складу слини: 1) протеаза; 2) амілаза; 3) лактозопероксидаза; 4) ендонуклеаза; 5) ліпаза. б) Відмітьте білки,

які входять до складу сироватки крові людини: 1) альбумін; 2) глобулін; 3) гемоглобін; 4) пепсин; 5) фібріноген.

Завдання 3. а) Скільки треба взяти сироватки і фізіологічного розчину, щоб отримати розведення 1:10? б) Ви маєте нерозведену слину, 5 пробірок з 1 мл фізіологічного розчину у кожній та одну порожню пробірку і піпетку на 1 мл. Як приготувати розведення слини 1:32?

Завдання 4. Назвіть клітини людського організму, здатні до фагоцитозу, вкажіть їхню локалізацію.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Привес М.Г., Лисенко Н.И., Бушков В.И. Анатомия человека.- М.: Медицина.- 2001.
2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
3. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.- 2002.-725 с.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Поняття "інфекційний процес" і "інфекційна хвороба". Відмінність інфекційного захворювання від інших хвороб.
2. Форми інфекційного процесу.
3. Патогенність і вірулентність бактерій. Одиниці виміру.
4. Фактори патогенності бактерій.
5. Захисна функція шкіри та слизових оболонок. Лізоцим.
6. Фагоцитоз як клітинний фактор неспецифічного захисту організму. Показники фагоцитарної активності.
7. Бактерицидні речовини сироватки крові.
8. Протівірусні гуморальні і клітинні фактори неспецифічного захисту.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 2005. С. 209-236.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С. 136-144.
3. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-С.41-66.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С.96-104.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С.137-165, 194-200.
6. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 –С.17-60, 177-192.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Неспецифічні фактори захисту організму” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: суспензія E.coli., пластинки із середовищем Ендо, стерильні чашки Петрі, сироватка крові, суспензія еритроцитів, гемолітична сироватка, фізіологічний розчин, пробірки, предметне скло, слина, кров.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Визначити бактерицидні властивості шкіри.

- 1) Обробити шкіру передпліччя ватяним тампоном, змоченим 1 млрд. суспензією добової культури *E.coli*. Звернути увагу на те, що ділянка шкіри, яку обробляють суспензією живих бактерій не повинна мати подряпин чи інших ушкоджень.
- 2) Через 5, 15 і 45 хв. зробити відбитки на пластинці із середовищем Ендо.
- 3) Пластинки помістити в чашки Петрі і інкубувати протягом 18-24 год.
- 4) Підрахувати кількість колоній, що вирости.
- 5) Зробити висновок про бактерицидність шкіри, користуючись таблицею.

| Оцінка бактерицидності шкіри | Кількість колоній <i>E.coli</i> через | | |
|------------------------------|---------------------------------------|----------|----------|
| | 5 хв | 15 хв | 45 хв |
| Висока | багато | немає | немає |
| Задовільна | багато | одиничні | немає |
| Незадовільна | багато | багато | одиничні |

2. Визначити титр лізоциму в слині.

- 1) Приготувати у ряду пробірок розведення слини - похідне-1:25 і далі дворазові до 1:3200.
- 2) Додати суспензію тест-культури *M.lysodecticus* і помістити пробірки у термостат.
- 3) Врахувати результати дослідження, занести їх до протоколу (титром вважається останнє розведення, яке викликало повний лізис тест-мікроба).

3. Визначити комплементарну активність сироватки крові за 100% гемолізом. Сироватку розвести фізіологічним розчином за схемою, додати гемолітичну систему (еритроцити барана + гемолітична сироватка). Результати записати до протоколу. (Титр комплементу - мінімальна кількість сироватки, що викликає гемоліз 0,5 мл гемолітичної системи. У нормі в сироватці міститься 0,04-0,006 комплементу за титром). При виконанні роботи слід уникати безпосереднього контакту із кров'ю та її складниками.

4. Визначити фагоцитарну активність.

- 1) Розглянути мазок крові, інкубований із суспензією *E.coli*.
- 2) Підрахувати не менш 25 нейтрофілів і кількість бактерій, фагоцитованих цими клітинами.
- 3) Визначити фагоцитарний показник - % фагоцитуючих нейтрофілів (у нормі $\geq 50\%$).
- 4) Визначити фагоцитарне число - середня кількість фагоцитованих бактерій на 1 нейтрофіл.
- 5) Розрахувати ПОФР за формулою: $ПОФР = 3a + 2b + 1c + 0d$, де
 - a – кількість нейтрофілів, що містять понад 41 бактерію;
 - b – кількість нейтрофілів, що містять 21-40 бактерій;
 - c – кількість нейтрофілів, що містять 1-20 бактерій;
 - d – кількість нейтрофілів, що не містять бактерій.

ПОФР = 10-24 реакція слабопозитивна;

ПОФР = 25-49 реакція ясно виражена;

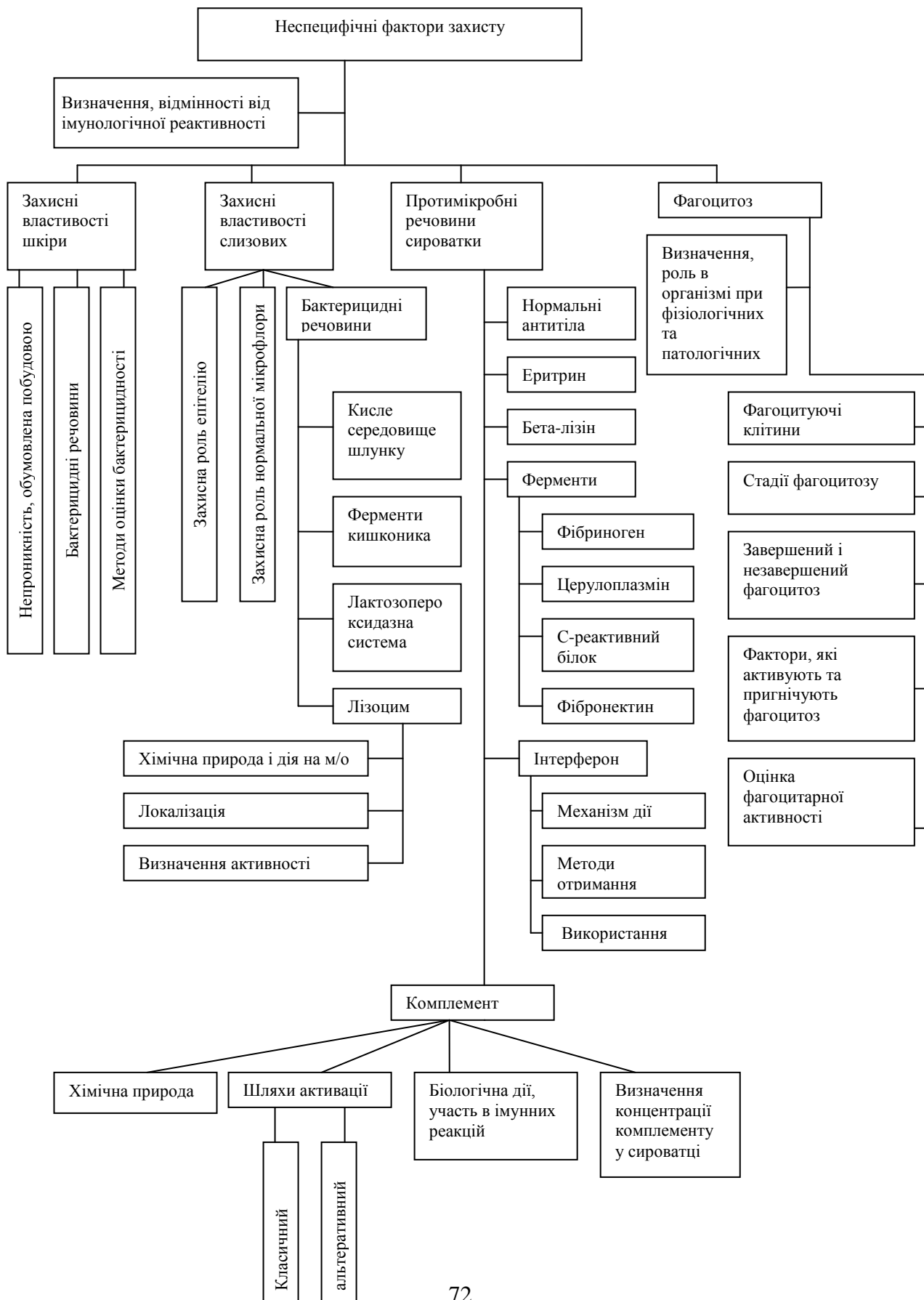
ПОФР = 50-75 реакція різко позитивна.

Зробити висновок про стан фагоцитарної активності.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

- 1.** У лабораторію з метою оцінки стану неспецифічної резистентності організму хворого К., що страждає на рецидивуючу стафілококову інфекцію, була поставлена серологічна реакція з його сироваткою для визначення вмісту комплементу. Яку серологічну реакцію потрібно використовувати для цього? Який механізм цієї реакції?
- 2.** З гнійних виділень уретри хворого лікар приготував мазок і пофарбував його за Грамом. При мікроскопії в препараті виявлена маса лейкоцитів, у цитоплазмі яких знаходилася велика кількість Гр- бобоподібних диплококів. Результати якого явища спостерігаються в препараті? Як буде називатися цей процес, якщо в ньому не здійснюється перетравлювання фагоцитованого мікроба?
- 3.** Захворювання ока в хворого супроводжується зменшенням виділення слізної рідини. Які ускладнення може викликати цей симптом? Яке провести дослідження, щоб підтвердити передбачуване ускладнення і простежити за ходом лікування?
- 4.** На лікуванні знаходиться група дітей, що прибули з Чорнобиля. Яким методом без застосування ін'єкцій можна багаторазово досліджувати реактивність організму?

Графологічна структура теми: “Неспецифічні фактори захисту організму”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.10

Неспецифічні фактори захисту організму

Завдання 1. Визначення бактерицидних властивостей шкіри у відношенні тест-мікроба (кишкової палички).

| | | | |
|------------------------------------|-------|--------|--------|
| Тривалість експозиції | 5 хв. | 15 хв. | 45 хв. |
| Кількість колоній кишкової палички | | | |

Висновок: бактерицидність шкіри _____.

Завдання 2. Визначення комплементарної активності сироватки крові за 100% гемолізом.

| | | | | | | | | | | |
|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Об'єм сироватки (мл) | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,09 | 0,1 |
| Наявність гемолізу | | | | | | | | | | |

Висновок: титр комплементу _____.

Завдання 3. Визначення титру лізоциму в слині.

| | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Розведення слини | 1:25 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 |
| Наявність росту тест-культури | | | | | | | | |

Висновок : титр лізоциму _____.

Завдання 4. Визначення фагоцитарної активності.

| Групи нейтрофілів за кількістю поглинутих бактерій | Варіант 1 | | Варіант 2 | |
|--|-------------|----------|-------------|----------|
| | кількість | | кількість | |
| | нейтрофілів | бактерій | нейтрофілів | бактерій |
| Більше 41 тест-бактерії | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21-40 тест-бактерії | 0 | 0 | 3 | 80 |
| 1-20 тест-бактерії | 10 | 50 | 20 | 120 |
| 0 тест-бактерії | 15 | 0 | 2 | 0 |

Фагоцитарний показник _____

Фагоцитарне число _____

ПОФР _____

Висновок: функція фагоцитів _____.

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.11

ТЕМА: СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ (І ЗАНЯТТЯ)

Актуальність теми. Серологічними називають реакції, які відбуваються між антигенами та антитілами. Антигени – це речовини, що мають ознаки генетичної чужерідності і при потраплянні до організму викликають імунну відповідь. Антигенні властивості мають компоненти мікробної клітини і речовини, що виділяються нею. Більшість бактеріальних антигенів відрізняється високою специфічністю і є важливою діагностичною ознакою, що дозволяє визначити не тільки вид, але і серотип збудника інфекційного захворювання. Настільки ж специфічні антитіла, що утворюються В-клітинами імунної системи у відповідь на проникнення збудника в організм людини. Визначення титру антитіл у сироватці хворого лежить в основі серологічної діагностики інфекційних хвороб. Для серологічної ідентифікації і діагностики найчастіше використовується реакція аглютинації. Її застосовують у діагностиці тифо-паратифозних захворювань, кашлюка, дизентерії, бруцельозу, рикетсіозів та ін. Досить поширені у медичній практиці варіанти реакції аглютинації – РПГА, РГГА, РГПГА - їх використовують для діагностики як бактеріальних, так і вірусних інфекцій, визначення напруженості антитоксичного імунітету, виявлення гормонів у біологічних рідинах, реакція Кумбса використовується для виявлення неповних антитіл, що є одним з методів діагностики резус-конфлікту. Застосування антитіл, мічених флюорохромом, тобто реакція імунофлуоресценції, дозволяє виявити збудника у патологічному матеріалі без виділення чистої культури.

Мета (загальна): уміти ставити реакцію аглютинації та її варіанти для діагностики інфекційних захворювань для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Тракувати роль центральних та периферичних органів імунної системи.
2. Описувати властивості та функції лімфоцитів.
3. Характеризувати молекулярну структуру антитіл та особливості основних класів імуноглобулінів.
4. Інтерпретувати властивості антигенів, антигенну будову мікроорганізмів.
5. Ставити орієнтовну РА на склі з метою серологічної ідентифікації мікроорганізмів.
6. Ставити розгорнуту РА з метою серологічної діагностики інфекційного захворювання.
7. Ставити РПГА, враховувати та інтерпретувати результати РА та РПГА.
8. Пояснювати механізм та спосіб врахування прямої та непрямой РІФ.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Визначати анатомічне положення центральних та периферичних органів імунної системи (кафедра анатомії).
2. Пояснювати структуру червоного кісткового мозку, тимусу, лімфовузлів (кафедра гістології).
3. Пояснювати формування органів імунної системи в онтогенезі (кафедра гістології).

4. Інтерпретувати особливості структури і властивостей складних білків (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Стисло опишіть анатомічне положення а) червоного кісткового мозку; б) тимусу; в) селезінки; г) пейєрових бляшок. Де знаходяться найбільші скупчення лімфовузлів?

Завдання 2. Де знаходяться ствольні клітини, від яких беруть початок лімфоцити?

Завдання 3. Селезінка складається з червоної та білої пульпи, причому клітини імунної системи розташовані саме у білій. Вкажіть локалізацію білої пульпи.

Завдання 4. У лімфовузлах клітини імунної системи розташовані у паракортикальній області. Як вона позначена на малюнку?

Завдання 5. Стисло опишіть морфологію лімфоцитів.

Завдання 6. З яких частин ембріону формується тимус? Які вікові зміни з ним відбуваються?

Завдання 7. Молекула імуноглобуліну G складається з чотирьох поліпептидних ланцюжків та вуглеводного компоненту. До якого класу органічних сполук він належить?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Привес М.Г., Лисенко Н.И., Бушков В.И. Анатомия человека.- М.: Медицина.- 2001.

2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.

3. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.- 2002.-725 с.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Сучасне визначення імунітету. Його головні функції.

2. Імунна система. Її особливості як системи. Побудова імунної системи.

3. Формування імунокомпетентних Т і В лімфоцитів. Їхнє розселення.

4. Антитіла. Структура молекули імуноглобуліну (на прикладі Ig G).

5. Класи імуноглобулінів

6. Генетичний контроль утворення антитіл.

7. Поняття про антигени. Умови антигенності. Повноцінні та неповноцінні антигени. Ад'юванти.

8. Антигени мікроорганізмів.

9. Антигенні властивості мікробних токсинів.

10. Антигени тварин: видові, органі, ізоантигени, аутоантигени.

11. Гетерогенні антигени.

12. Специфічність антигенів. Значення для діагностики і специфічної профілактики.

13. Механізм реакції аглютинації, її варіанти.

14. Механізм прямої та непрямой РІФ.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиологія. М.: Медицина, 2005. С.236-256.
2. Вороб'єв А.А. и др. Микробиологія. М.: Медицина, 1998. С.128-136, 144-157.
3. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-С. 5-13, 22-36.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С.109-114.
5. Ройт А. Основы иммунологии.- М.: Мир, 1991.
6. Вейсман И.Л. и др. Введение в иммунологию.- М.: Высшая школа, 1983. - 160с.
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Вороб'єва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 201-227, 235-244, 283-285.
8. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С. 61-176, 480.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Побудова імунної системи. Антитіла та антигени. Реакція аглютинації” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: пробірки, піпетки, предметне скло, фізіологічний розчин, діагностикуми, діагностична сироватка, досліджувана сироватка, суспензія невідомих бактерій, демонстрація РПГА, біопрепарати за темою.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Поставити розгорнуту реакцію аглютинації з метою визначення титру антитіл у сироватці.

1) Приготувати основне розведення досліджуваної сироватки (1:50).

2) Зробити 2 серії дворазових розведень (до 1:800) шляхом послідовного переносу 1 мл з попередньої пробірки ряду в наступну.

3) З останньої пробірки видалити 1 мл розведеної сироватки для збереження однакового обсягу.

4) У пробірку "контроль антигену" внести 1 мл фізіологічного розчину.

5) У пробірки серії 1 внести по 2 краплі коклюшного діагностикума, серії 2 - паракоклюшного. Пробірка "контроль антитіл" містить тільки 1 мл основного розведення досліджуваної сироватки без фізіологічного розчину і діагностикуму.

6) Пробірки інкубують 2 год. при 37⁰ С и витримують протягом доби при кімнатній температурі. Реакцію враховують як позитивну при наявності виразної аглютинації в дослідній пробірці і відсутності аглютинації в обох контрольних пробірках.

7) Результати відмітити у таблиці, зробити висновок про виявлення антитіл до певного збудника, визначити титр антитіл.

2. Поставити реакцію аглютинації на склі з метою серологічної ідентифікації збудника дизентерії.

1) Предметне скло розділити на три частини: на одну нанести краплю фізіологічного розчину, на іншу - краплю сироватки, що містить антитіла до *S.flexneri*, на третю - краплю сироватки, що містить антитіла до *S.sonnei*.

2) Петлею внести в кожную краплю невелику кількість виділеної від хворого бактеріальної культури і перемішати до одержання рівномірної суспензії.

3) Облік зробити через 3-5 хв. по появі зерен аглютината в краплях. Реакція враховується як позитивна, якщо спостерігається утворення осаду у вигляді зерен або пластівців, негативна - рівномірно мутна суспензія.

4) Зробити висновок про видову приналежність виділеного збудника дизентерії. Зробити у протоколі малюнок, який ілюструє проведений дослід.

3. Поставити реакцію пасивної аглютинації з метою серологічної діагностики мікоплазменної пневмонії.

1) У лунках пластмасових пластин чи пробірках приготувати послідовні розведення досліджуваної сироватки.

2) У кожную лунку (пробірку) внести однаковий об'єм (0,05 мл) 3% еритроцитарного мікоплазменного діагностикуму.

3) Результат врахувати через 2 год. інкубації при 37⁰ С, оцінюючи зовнішній вигляд осаду. Визначити титр сироватки.

Негативна реакція - осад у виді "гудзичка", позитивна - у виді "парасольки". Титр сироватки - це її найбільше розведення, яке дає позитивну реакцію. Механізм реакції пояснити схематичним малюнком.

4. За таблицями вивчити механізм реакції Кумбса для виявлення неповних антитіл, схематично відобразити його у протоколі, зробивши необхідні пояснення.

5. За таблицями розібрати механізм прямої та непрямой реакції імунофлуоресценції, схематично відобразити його у протоколі, зробивши необхідні пояснення. Із запропонованого набору біопрепаратів відібрати ті, що використовуються у цих реакціях, записати їх назви до протоколу. Відмітити, яке обладнання необхідне при проведенні дослідження цим методом.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У хворого, переведеного з терапевтичного відділення в інфекційне, на 12-й день хвороби був поставлений клінічний діагноз "дизентерія?" Триразове бактеріологічне дослідження калу виявилось негативним - шигели (збудники дизентерії) не виявлені. Для підтвердження клінічного діагнозу в бак.лабораторію направлений досліджуваний матеріал. Який матеріал був направлений у лабораторію в даному випадку? Яку реакцію можна використовувати для підтвердження чи спростування клінічного діагнозу? Який результат реакції підтвердить діагноз?

2. У лабораторію надійшла кров від хворого на черевний тиф для постановки реакції аглютинації. Які реактиви необхідні для її постановки? Який показник реакції буде використаний у якості діагностичного?

3. При ідентифікації збудника харчової токсикоінфекції з'ясувалося, що за своїми біохімічними властивостями він відноситься до роду *Salmonella*. Які дослідження треба провести, щоб визначити вид збудника?

4. У бак.лабораторії досліджується сироватка крові клінічно здорової людини з підозрою на черевнотифозне бактерионосійство. Для цього було використано РПГА з еритроцитарним черевнотифозним Ві-діагностикумом. У пробірках, де були розведення сироватки від 1:10 до 1:80 спостерігався осад у вигляді „парасольки”, а розведення 1:160 та 1:320 дали осад у вигляді „гудзичка”. Що означає отриманий результат?

Графологічна структура теми:

“Імунна система організму”

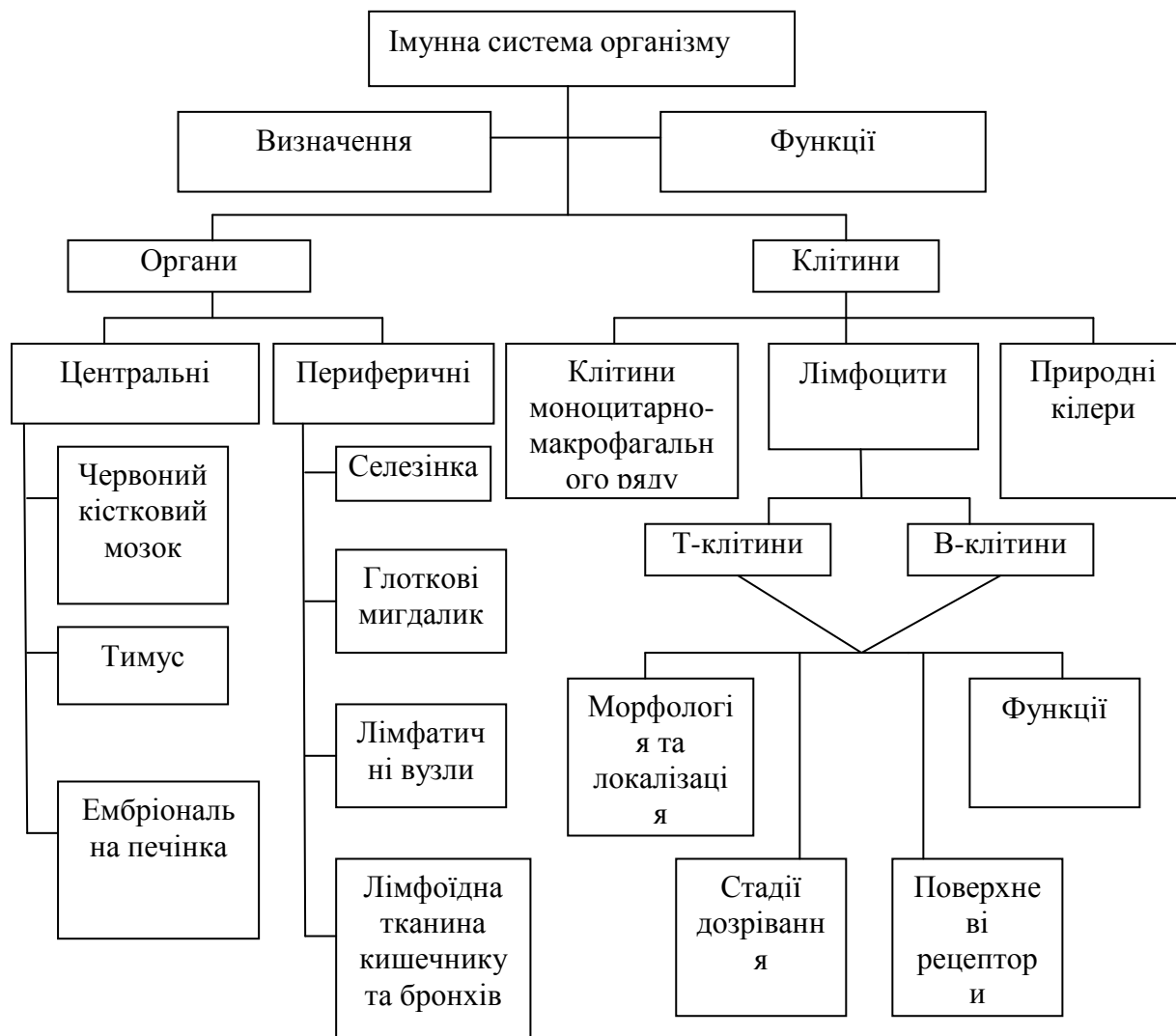


Рис.1.

Графологічна структура теми: “Антигени”

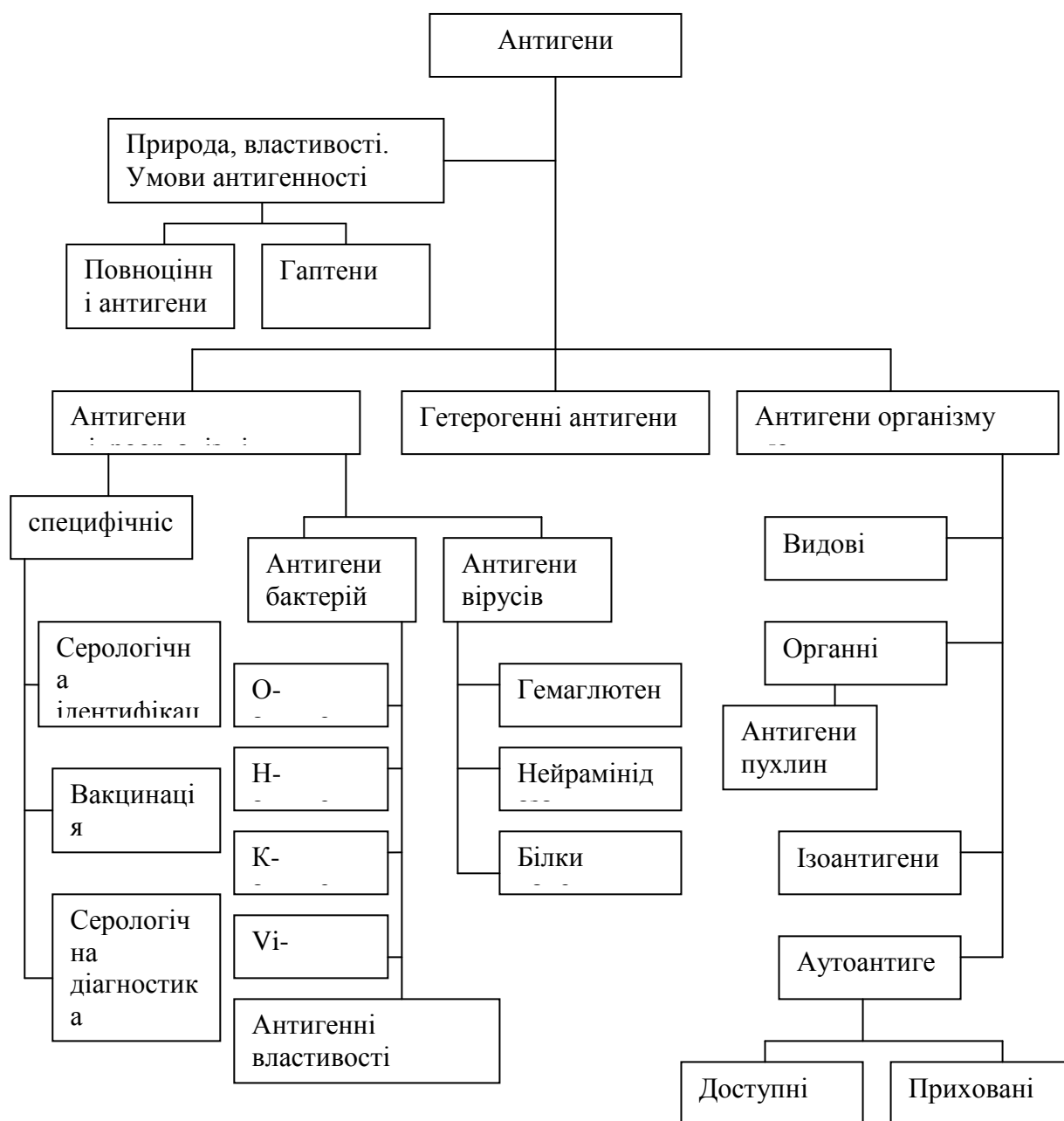
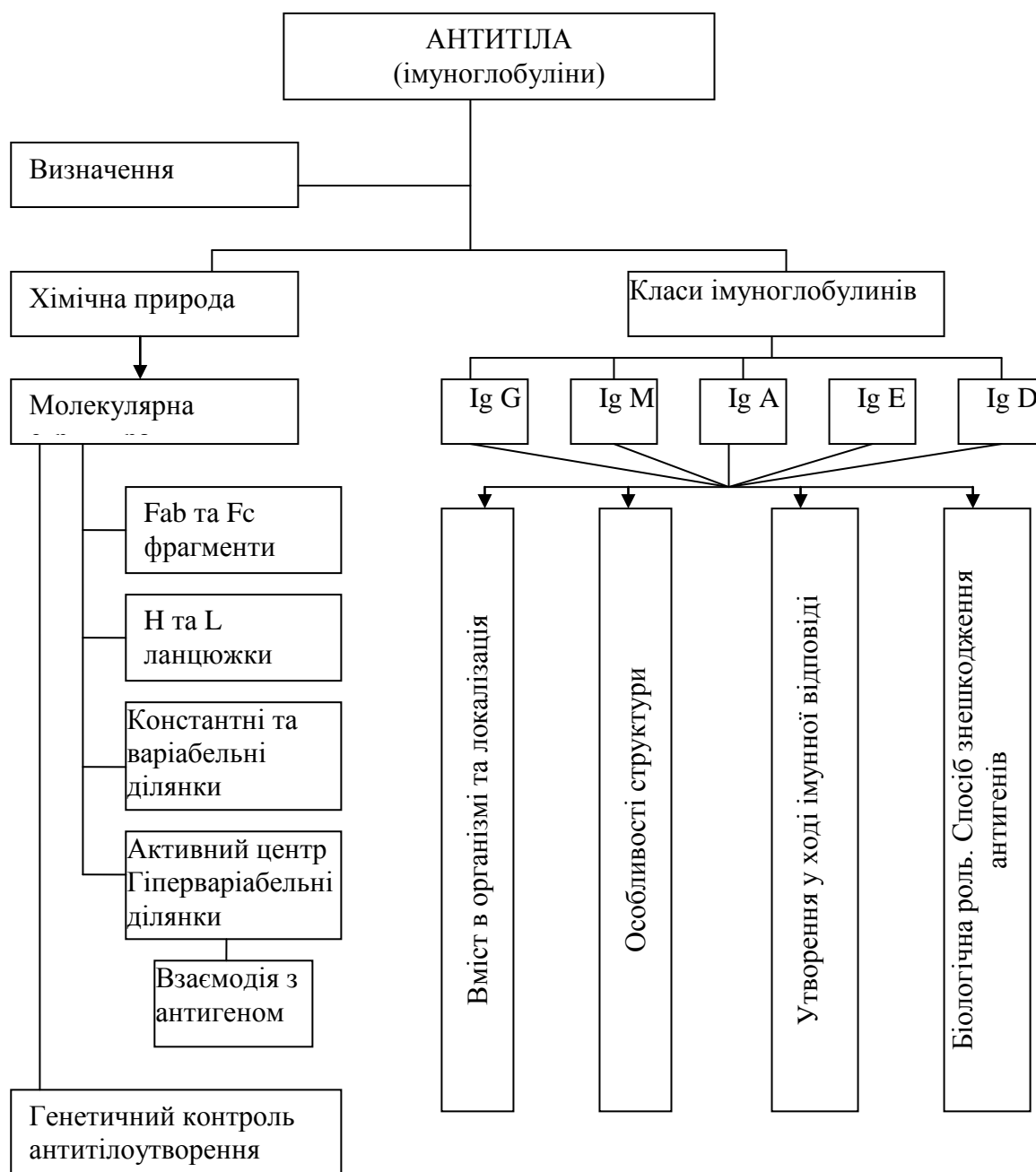


Рис.2.

Графологічна структура теми: “Антитіла”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.11

Імунна система організму

Завдання 1. Серологічна діагностика інфекційного захворювання.

| діагностикуми | Розведення сироватки хворого | | | | | контроль | |
|---------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|----------|----|
| | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | АТ | АГ |
| Коклюшний | | | | | | | |
| Паракоклюшний | | | | | | | |

Висновок: у сироватці хворого виявлено антитіла до збудника _____, титр антитіл _____.

Завдання 2. Серологічна ідентифікація збудника інфекційного захворювання.



Рис.1 Реакція аглютинації на склі

Умовні позначення:

сироватка до *S.flexneri*

сироватка до *S.sonnei*

контроль

позитивна реакція

негативна реакція

Висновок: реакція аглютинації позитивна із сироваткою _____, тобто від хворого виділено _____.

Завдання 3. Серологічна діагностика інфекційного захворювання у РПГА

- а) механізм РПГА: 1- еритроцити, 2- мікробні атигени, 3-антитіла сироватки хворого
б) позитивна реакція
в) негативна реакція

Рис.2

Завдання 4. Схема реакції Кумбса.

Умовні позначення:

1- неповні антитіла

2- еритроцити

3- антиглобулінові антитіла

Рис.3 Виявлення неповних антитіл.

Завдання 5. Реакція імунофлуоресценції

Умовні позначення:

1- мікробний антиген

2- антитіла до мікробного антигену

3- антиглобулінові антитіла

4- флюорохром

Рис.4а. Пряма РІФ

Рис.4б. Непряма РІФ

Реактиви для постановки РІФ _____

Обладнання для урахування результатів _____

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.12

ТЕМА: СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ (II ЗАНЯТТЯ)

Актуальність теми. Постановка основної серологічної реакції (РА), що вивчалася на минулому занятті, можлива тільки з корпускулярним антигеном, яким виступає ціла мікробна клітина. Однак антигенні властивості можуть мати окремі компоненти мікробної клітини, що вивільняються при її лізисі, синтезовані бактеріями токсини, протеїни вірусної частки та тваринних тканин. Ці розчинні антигени (і антитіла до них) можуть бути виявлені в реакціях преципітації (РП) або зв'язування комплементу (РЗК); виявлення мікробних токсинів можливе також у реакції нейтралізації (РН). За сучасними оцінками ВООЗ реакція зв'язування комплементу залишається у числі достовірних та чутливих методів визначення як антигенів, так і антитіл. Існує багато модифікацій РЗК: у гелі, у мікрооб'ємі, на холоді, з використанням різних еритроцитів. РП застосовується не тільки для діагностики інфекційних хвороб, а й з метою встановлення видової приналежності тваринних білків - для визначення доброякісності харчових продуктів і у судовій медицині. Реакція іммобілізації застосовується не так часто, але вона є чутливим і надійним методом у діагностиці хвороб, викликаних рухливими мікроорганізмами (холера, спірохетози).

Вивчення форм імунної відповіді та її механізмів необхідно для розуміння нормальних та патологічних реакцій організму людини на речовини, які несуть ознаки генетичної чужерідності, що відбувається при інфекційних, алергічних та онкологічних захворюваннях, при трансплантації та вакцинації.

Мета (загальна): уміти трактувати основні механізми формування імунної відповіді організму людини; ставити реакції преципітації та зв'язування комплементу для діагностики інфекційних захворювань для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Трактувати механізми первинної та вторинної імунної відповіді.
2. Пояснювати природу імунологічної толерантності.
3. Пояснювати засоби кооперації імунокомпетентних клітин та регуляції імунної відповіді.
4. Ставити реакцію кільцепреципітації для виявлення мікробних антигенів.
5. Інтерпретувати результати реакцій подвійної імунної дифузії, нейтралізації токсинів, іммобілізації мікроорганізмів.
6. Ставити реакцію зв'язування комплементу з метою серодіагностики інфекційного захворювання.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати властивості справжніх та колоїдних розчинів (кафедра хімії).
2. Трактувати структуру складних білків (кафедра біохімії).
3. Готувати серійні розведення розчинів (кафедра біохімії).
4. Пояснювати сутність гуморальної регуляції фізіологічних процесів (кафедра фізіології).
5. Пояснювати морфологічні особливості та функції макрофагів і лімфоцитів (кафедра гістології).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Серологічні реакції, як правило, йдуть у присутності електролітів. Що буде відбуватися з колоїдною системою, якщо повністю вилучити з неї всі присутні там електроліти?

Завдання 2. За хімічною природою антитіла є складними білками. Вкажіть найсуттєвішу структурну особливість складних білків: а) мають велику молекулярну масу; б) мають розгалужену структуру молекули; в) складаються з кількох поліпептидних ланцюжків; г) містять простетичну групу небілкової природи; д) мають у своєму складі L та D форми амінокислот.

Завдання 3. Для проведення серологічної реакції було приготовано серійні розведення сироватки хворого від 1:100 до 1:800. Скільки нативної сироватки міститься у розведенні 1:200, якщо загальний об'єм рідини у пробірці становить 1 мл?

Завдання 4. Що виступає носієм інформації при гуморальній регуляції фізіологічних процесів: а) біологічно-активна речовина; б) поверхневі рецептори клітин; в) нервовий імпульс; д) розчин електроліту?

Завдання 5. Які клітини забезпечують захист організму від інфекцій, але не здатні до фагоцитозу? а) нейтрофіли; б) лімфоцити; в) ретикулоцити лімфовузлів; г) клітини нейроглії; д) ендотеліальні клітини судин; е) Купферівські клітини печінки. Які з вказаних клітин взагалі не пов'язані з імунологічною реактивністю?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Равич-Щербо М.И., Новиков В.В. Физическая и коллоидная химия. М.: Высшая школа.- 1975.
2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
3. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.- 2002.-725 с.
4. Філімонов В.І. Нормальна фізіологія.- Київ: Здоров'я.- 1994.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Взаємодія трьох видів імунокомпетентних клітин при первинній імунній відповіді.
2. Механізм вторинної імунної відповіді. Клітини імунологічної пам'яті.
3. Якісні і кількісні відмінності первинної і вторинної імунних відповідей.
4. Поняття про імунологічну толерантність. Уроджена і набута толерантність.
5. Регуляція імунної відповіді. Поняття про медіатори імунної системи.
6. Механізм та сфера використання реакції преципітації.
7. Механізм РЗК.
8. Сутність та особливості постановки реакцій іммобілізації мікроорганізмів та нейтралізації токсинів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 2005. С. 262-288, 322-347.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С.57-59.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 112-122.
4. Ройт А. Основы иммунологии.- М.: Мир, 1991.
5. Вейсман И.Л. и др. Введение в иммунологию.- М.: Высшая школа, 1983. - 160с.
6. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред.М.О.Биргера.- М.: Медицина, 1982.- С.141-153.
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 228-231, 245-257, 286-289.
8. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С.238-249, 309-323, 481-494.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: „Форми імунної відповіді. Реакції преципітації та зв'язування комплементу” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: таблиці: „Методи мікробіологічної діагностики”, „Реакція преципітації”, „Реакція зв'язування комплементу”, „Реакція іммобілізації”, сироватка менінгококова преципітуюча, сироватка дифтерійна антитоксична, розчин комплементу, гемолітична система, досліджувані сироватки і штами мікроорганізмів, пробірки, піпетки, фізіологічний розчин.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Виявити збудника менінгіту в лікворі за допомогою реакції кільцепреципітації.

1) У вузькі пробірки внести по 0,2- 0,3 мл преципітуючої менінгококової сироватки.

2) По стінці нашарувати 0,1-0,2 мл розчину антигену - досліджуваного ліквору, у якому менінгококи легко піддаються аутолізу, розпадаючись на окремі антигени. Звернути увагу на те, щоб сироватка та розчин антигену не змішувалися.

3) Реакцію враховують через 1-3 хв. по появі преципітату у вигляді білого кільця. Результат занести до протоколу, звернути увагу на використанні контролі.

2. Визначити токсигенність виділеного штаму збудника дифтерії. (Визначення токсигенності проводиться за демонстраційними зразками. При роботі із патогенними культурами слід чітко дотримуватись правил безпеки).

1) На шар агару в чашці Петрі помістити смужку фільтрувального папера, змочену антитоксичною сироваткою, антитіла якої дифундують у гель.

2) На деякій відстані від смужки папера підсіяти досліджувані штами *C.diphtheriae* та контрольні штами, які виділяють у середовище екзотоксин.

3) Результат враховують через кілька діб за появою дуг преципітату в місці зустрічі токсину (антиген) з антитоксином (антитіла).

4) Схематично відобразити у протоколі результат досліду, зробити висновок про токсигенність виділених штамів.

3. Поставити РЗК із метою серологічної діагностики.

1) Визначити титр і робочу дозу комплементу: приготувати розведення свіжої сироватки морської свинки від 1:10 до 1:40. До 0,2 мл кожного розведення комплементу додати по 0,4 мл гемолітичної системи. Інкубувати при 37° С. Через 30 хв. визначити титр комплементу - найбільше його розведення, що викликає повний лізис еритроцитів у присутності гемолітичної сироватки. Робочу дозу комплементу визначають на 25% більше за титр.

2) Основний дослід проводять за схемою:

| реактиви | основний дослід | контроль антигену | контроль сироватки |
|-------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| перша фаза | | | |
| сироватка хворого | 0,25мл | - | 0,25мл |
| антиген | 0,25мл | 0,25мл | - |
| комплемент | 0,25мл | 0,25мл | 0,25мл |
| фізіологічний розчин | - | 0,25мл | 0,25мл |
| термостат, 37°С, 30 хв. | | | |
| друга фаза | | | |
| гемолітична система | 0,5мл | 0,5мл | 0,5мл |
| термостат, 37°С, 45 хв. | | | |

Для постановки основного дослідів сироватки хворих та контрольну сироватку інактивують нагріванням протягом 30 хв. при 56°С.

3) У дослідній пробірці змішують по 0,25 мл сироватки хворого, розчину антигену та комплементу у робочій дозі; ставлять також контроль сироватки (замість антигену - 0,25 мл фіз.р-ну) та контроль антигену (замість сироватки - 0,25 мл фіз.р-ну). Пробірки витримують у термостаті 30 хв.

4) У кожен пробірник додати по 0,5 мл гемолітичної системи та витримати у термостаті 45 хв. Врахування результатів: +++++ - відсутність гемолізу, +++ - гемоліз 25%, ++ - 50%, + - 75%, повний гемоліз еритроцитів - негативна реакція (-).

4. Ознайомитися за таблицями з методикою постановки та врахування реакції нейтралізації мікробних токсинів; вибрати з запропонованого набору біопрепаратів ті, що можуть бути використані у цій реакції. У протоколі відмітити, який патологічний матеріал досліджують у РН, які біологічні об'єкти при цьому використовуються, які зміни у них відбуваються.

5. Ознайомитися за таблицями з методикою постановки реакції іммобілізації мікроорганізмів. У протоколі відмітити, які діагностичні біопрепарати необхідні для виявлення бактерій та для виявлення антитіл у цій реакції, яке обладнання використовується для її врахування, що уявляє собою позитивний та негативний результат.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

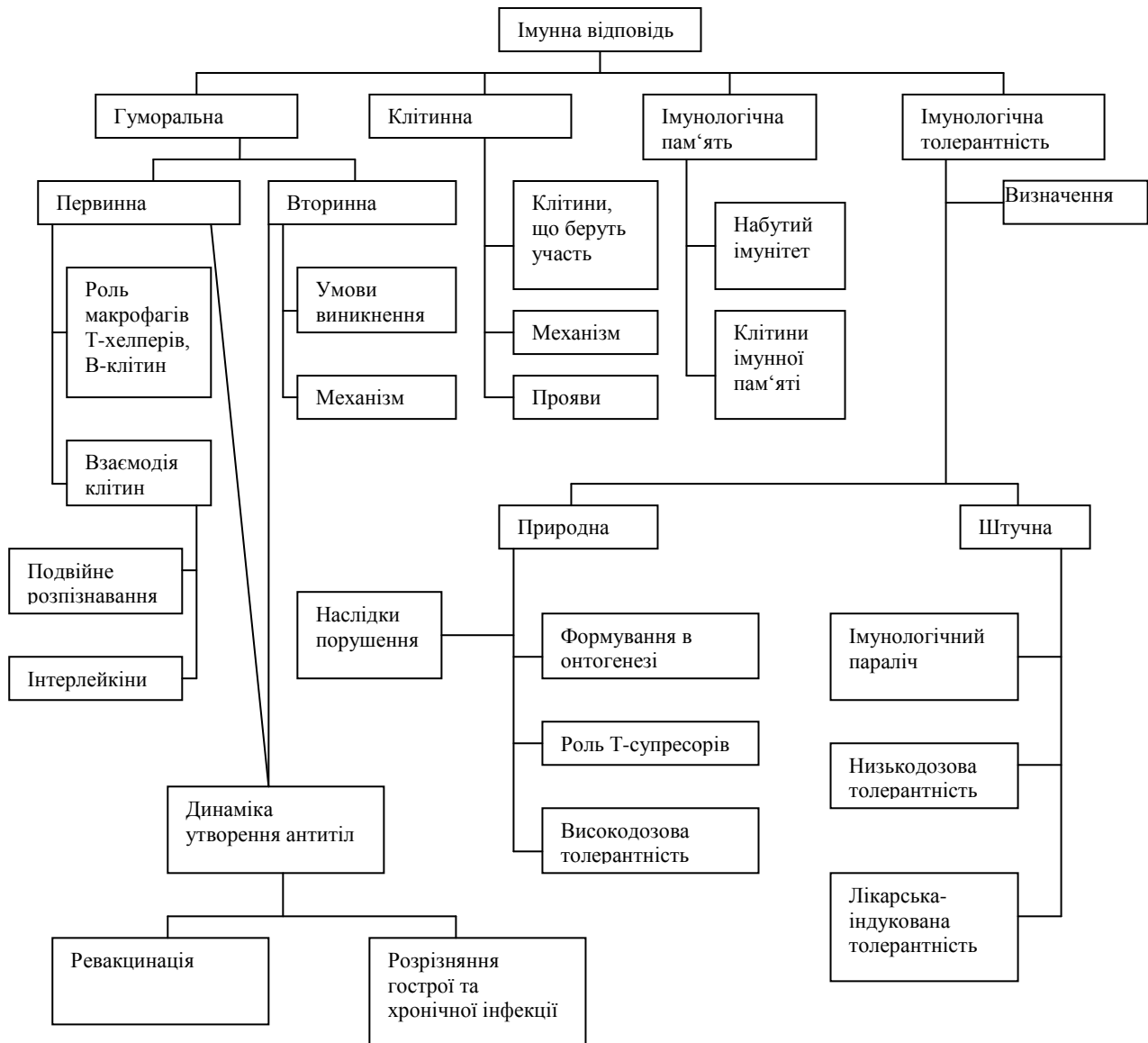
1. У лабораторію судово-медичної експертизи доставлений одяг громадянина Н., що пропав без звістки. На одязі помітні бурі плями, що нагадують сліди

крові. Яку реакцію можна використати для підтвердження цього припущення? Який результат буде спостерігатися, якщо припущення підтвердиться?

2. При додаванні гемолітичної (індикаторної) системи до пробірок, де міститься суміш сироватки хворого з бактеріальним діагностиком (основна система), у них відбувся гемоліз. Про яку реакцію мова йде в даному випадку?
3. При постановці РЗК у пробірці з досліджуваною сироваткою хворого в системі утворився комплекс "антиген + антитіло + комплемент", але зовнішній вигляд розчину не змінився. Яким чином можна виявити цей комплекс?
4. При постановці РЗК із сироваткою хворого з підозрою на токсоплазмоз, вона виявилася негативною у всіх розведеннях. Як ви візуально визначите негативну РЗК? Про що вона свідчить? Які реактиви було використано для постановки цієї реакції?
5. Є підозра, що у партії м'ясних консервів міститься ботулінічний токсин. За допомогою яких серологічних реакцій його можна виявити? Які реактиви та обладнання необхідні? Який результат буде спостерігатися, якщо підозра підтвердиться?
6. У бактеріологічній лабораторії досліджується сироватка громадянина Н. з підозрою на сифіліс. У якості діагностикому були використані живі трепонеми, а результат фіксувався за допомогою темнопольного мікроскопу. Яку серологічну реакцію було поставлено? Що покаже мікроскопія у разі негативної реакції?

Графологічна структура теми

“Імуні відповіді. Серологічні реакції”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.12

Серологічні реакції

Завдання 1. Виявлення менінгококових антигенів у спинномозковій рідині хворого.

| № | склад реагентів | рез-тат |
|---|--|---------|
| 1 | преципітуюча менінгококова сироватка + спинномозкова рідина хворого №1 | |
| 2 | преципітуюча менінгококова сироватка + спинномозкова рідина хворого №2 | |
| 3 | преципітуюча менінгококова сироватка + гомологічний преципітиноген | |
| 4 | преципітуюча менінгококова сироватка + контрольний екстракт без антигену | |
| 5 | преципітуюча менінгококова сироватка + фізіологічний розчин | |
| 6 | нормальна сироватка + спинномозкова рідина хворого №1 | |
| 7 | нормальна сироватка + спинномозкова рідина хворого №2 | |
| 8 | нормальна сироватка + контрольний екстракт без антигену | |

Висновок: реакція позитивна у хворого № ____, це означає _____.

Завдання 2. Визначення токсигенності штамів дифтерійної палички методом подвійної імунної дифузії у гелі.

Умовні позначення:

Рис.1

Висновок: токсигенними є штами №№ _____.

Завдання 3. Серологічна діагностика у РЗК.

а) визначення титру та робочої дози комплементу.

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| вміст комплементу (мл) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 | 0,5 |
| результат ("+" це гемоліз) | | | | | | | | | | |

Титр комплементу _____, робоча доза (на 25% вища за титр) _____.

б) дослідження сироваток хворих

| дослід | | контроль | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| сироватка №1 | сироватка №2 | сироватка №1 | сироватка №2 | антиген |
| | | | | |

Висновок: РЗК позитивна у хворого № ____.

Завдання 4. Застосування РН для виявлення мікробних токсинів.

Досліджуваний матеріал _____

Використовувані біологічні об'єкти _____

Позитивний результат _____

Діагностичні біопрепарати для РН _____

Завдання 5. Застосування реакції іммобілізації мікроорганізмів.

Біопрепарати, що застосовуються для виявлення:

а) мікроорганізмів _____

б) антитіл у сироватці хворого _____

Обладнання, необхідне для врахування результату _____

Позитивний результат _____

Негативний результат _____

Дата _____ Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.13

ТЕМА: ВАКЦИНИ ТА СИРОВАТКИ.

Актуальність теми. Сучасний рівень розвитку імунології характеризується розробкою і широким використанням лікувально-профілактичних імуномодуляторів - тобто препаратів, що змінюють властивості імунітету. Ці препарати можуть містити антигени, антитіла, імунокомпетентні клітини, гормони й інші медіатори системи імунологічного нагляду. Використовуючи імуномодулятори лікар одержує реальну можливість коректувати систему імунітету хворого. Серед цих препаратів провідна роль належить вакцинам та сироваткам, які дозволяють створювати штучний імунітет до інфекційних захворювань. Саме завдяки вакцинації вдалося повністю подолати натуральну віспу, значно зменшити захворюваність на поліомієліт, кір, дифтерію та ін. Після відкриття антибіотиків сфера використання імунних сироваток скоротилася, але вони залишаються важливими засобами специфічної профілактики та терапії при захворюваннях, обумовлених мікробними токсинами (правець, ботулізм, дифтерія, газова гангрена). Призначаючи вакцини або сироватки, лікар повинен знати про можливі ускладнення та побічні дії, які виникають через втручання у роботу імунної системи людини.

Не менш важливі діагностичні імунопрепарати, які також містять відомі антитіла (сироватки) або антигени (діагностикуми) і дозволяють з великою точністю проводити серологічну ідентифікацію патогенних мікроорганізмів і серологічну діагностику інфекційних, алергічних та інших захворювань.

Мета (загальна): уміти вибирати імунопрепарати для мікробіологічної діагностики, специфічної терапії та профілактики інфекційних хвороб; трактувати основні механізми формування імунної відповіді організму людини при введенні вакцин та сироваток, а також визначати основні типи патологічних реакції імунної системи, які можуть виникати при цьому, для використання цих знань-умінь у комплексі протиепідемічних, лікувально-профілактичних та діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Трактувати основні принципи специфічної профілактики та лікування інфекційних захворювань.
2. Пояснювати класифікацію вакцин та імунних сироваток за різними параметрами.
3. Пояснювати спосіб та сферу застосовування основних груп імунобіологічних препаратів.
4. Готувати вбіту вакцину.
5. Визначати активність антитоксичної сироватки.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Трактувати поняття гомеостазу, рівні дії гомеостатичних механізмів (кафедра нормальної фізіології).
2. Описувати сучасні методи впливу на мінливість (кафедра медичної біології).
3. Пояснювати хімічний склад плазми та сироватки крові (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Вкажіть, на яких рівнях відбувається регуляторна взаємодія, спрямована на підтримку гомеостазу? 1) атомарний, 2) молекулярний, 3) клітинний, 4) тканинний, 5)органний, 6) організменний, 7) популяційний, 8) соціальний.

Завдання 2. Для виготовлення живих вакцин використовують бактерії-мутанти. За допомогою яких чинників вони можуть бути отримані?

Завдання 3. З природної популяції патогенних бактерій виділено штам, який відрізняється дуже низькою вірулентністю і міг би використовуватися у якості вакцинного штаму. Але для цього треба з'ясувати, чи є зниження вірулентності проявом фенотипової або генотипової мінливості. Як це можна перевірити?

Завдання 4. Які компоненти є у плазмі крові, але відсутні у сироватці : а) лейкоцити; б) еритроцити; в) комплемент; г) фібриноген; д) альбуміни; е) імуноглобуліни?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Філімонов В.І. Нормальна фізіологія. - Київ: Здоров'я. – 1994.

2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.

3. Биология / Под ред.В.Н. Яригина. М. Высшая школа. - 2004.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Історія створення перших вакцин, походження терміна.

2. Класифікація вакцин за різними параметрами.

3. Живі вакцини: принципи створення, ефективність, приклади.

4. Убиті вакцини та анатоксини, методи одержання та сфера застосування, приклади.

5. Хімічні, синтетичні та генно-інженерні вакцини.

6. Яким основним вимогам повинні відповідати вакцини незалежно від їхнього походження? Які ускладнення можуть виникнути при вакцинації?

7. Лікувально-профілактичні гетерогенні сироватки: методи одержання, титрування, використання. Привести приклади.

8. Донорські гамма-глобуліни і плазми: одержання, використання, приклади.

9. Як оцінити ефективність вакцин і сироваток?

10.Діагностичні сироватки: методи одержання та сфера використання.

Полівалентні та монорецепторні сироватки, реакція Кастеллані. Діагностичні сироватки для РІА, ІФА, РІФ.

11.Поняття про діагностикуми.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С. 339-351.

2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.181-189, 191-193.

3. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.- С. 107-128.

4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 123-124.
5. Ройт А. Основы иммунологии.- М.: Мир, 1991.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С.294-302, 304-309.
7. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С. 445-478.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Вакцини та сироватки” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: культура *S.aureus*, посіяна на агарі, фізіологічний розчин, стандарт мутності на 10 одиниць, стерильні пробірки зі скошеним агаром, піпетки, пробірки, кінська нерозведена сироватка, токсин, набір біопрепаратів за темою (вакцини різних типів, діагностикуми, діагностичні та лікувальні сироватки).

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Приготування стафілокової аутовакцини.

- 1) Виділити від хворого і накопичити чисту культуру *S.aureus*.
- 2) Приготувати маточну суспензію і стандартизувати її за оптичним стандартом мутності до 2 млрд./мл. Для цього 5 мл фізіологічного розчину змити з агару мікроорганізми. Перелити в стерильну пробірку маткову суспензію і визначити її мутність: 1 мл цієї суспензії відлити в порожню пробірку і мірно розводити фізіологічним розчином до мутності по стандарті 1 млрд. /мл мікробних тіл. Мутність маточної суспензії визначають за кількістю доданого фізіологічного розчину.
- 3) Знаючи мутність маточної суспензії, приготувати з неї суспензію, яка містить 2 млрд. мікробних клітин на 1мл, для вакцини. Вихідна густина маточної суспензії визначається за формулою: $x = a + 1$ (млрд.кл./мл), де *a* - об'єм доданого фізіологічного розчину.

Для приготування вакцини, яка містить 2 млрд. /мл, треба до 1 мл маточної суспензії додати $x/2 - 1$ мл фізіологічного розчину.

- 4) Прогріти приготовлену суспензію стафілококів на водяній бані при 80⁰С протягом 1 години, для того щоб убити мікроби.
- 5) Перевірити на стерильність прогріту культуру (вакцину) шляхом посіву на скошений агар. Врахувати результати. Зробити висновок про придатність отриманого препарату до використання.

2. Визначення лікувальної сили антитоксичної сироватки.

- 1) У ряд з 7 пробірок внести досліджувану сироватку у об'ємі від 0,1мл у першій пробірці до 0,7 мл у останній.
- 2) У кожную пробірку додати по 2 мл токсину. Використовується токсин, що містить 20Lf(Limis floeculatiensis) у 1мл. Lf токсину - це його кількість, що дає ініціальну флокуляцію з 1 МО стандартної сироватки.
- 3) Пробірки тримати у термостаті при 45⁰С протягом 30 хв.
- 4) Відмітити, у якій пробірці раніше з'явиться флокулят та розрахувати кількість МО/мл сироватки. При титруванні сироватки ініціальна флокуляція

з'являється в тій пробірці, де кількість Lf токсину дорівнює кількості МО сироватки.

5) Пояснити сутність реакції схематичними малюнками.

3. Визначення типу лікувально-профілактичних та діагностичних препаратів:

1) Розглянути запропоновані біопрепарати, розподілити їх на такі, що містять антитіла та антигени.

2) Для вакцин визначити їх тип (живі, вбиті тощо) та призначення (лікувальні або профілактичні). Для діагностичних сироваток та діагностиків вказати, у яких реакціях вони використовуються. Порівняти походження лікувальних та діагностичних сироваток.

3) Розділити препарати на лікувальні, профілактичні та діагностичні, записати по кілька прикладів кожної групи препаратів до протоколу.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У дитячому саду планується вакцинація проти дифтерії і правця. Який препарат необхідний для цих цілей? Які імунологічні реакції використовують для виміру їхньої специфічної активності?

2. У лабораторію інституту вакцин і сироваток надійшла протидифтерійна сироватка для визначення її специфічної активності. Яка реакція буде використана, які інгредієнти необхідні для її постановки?

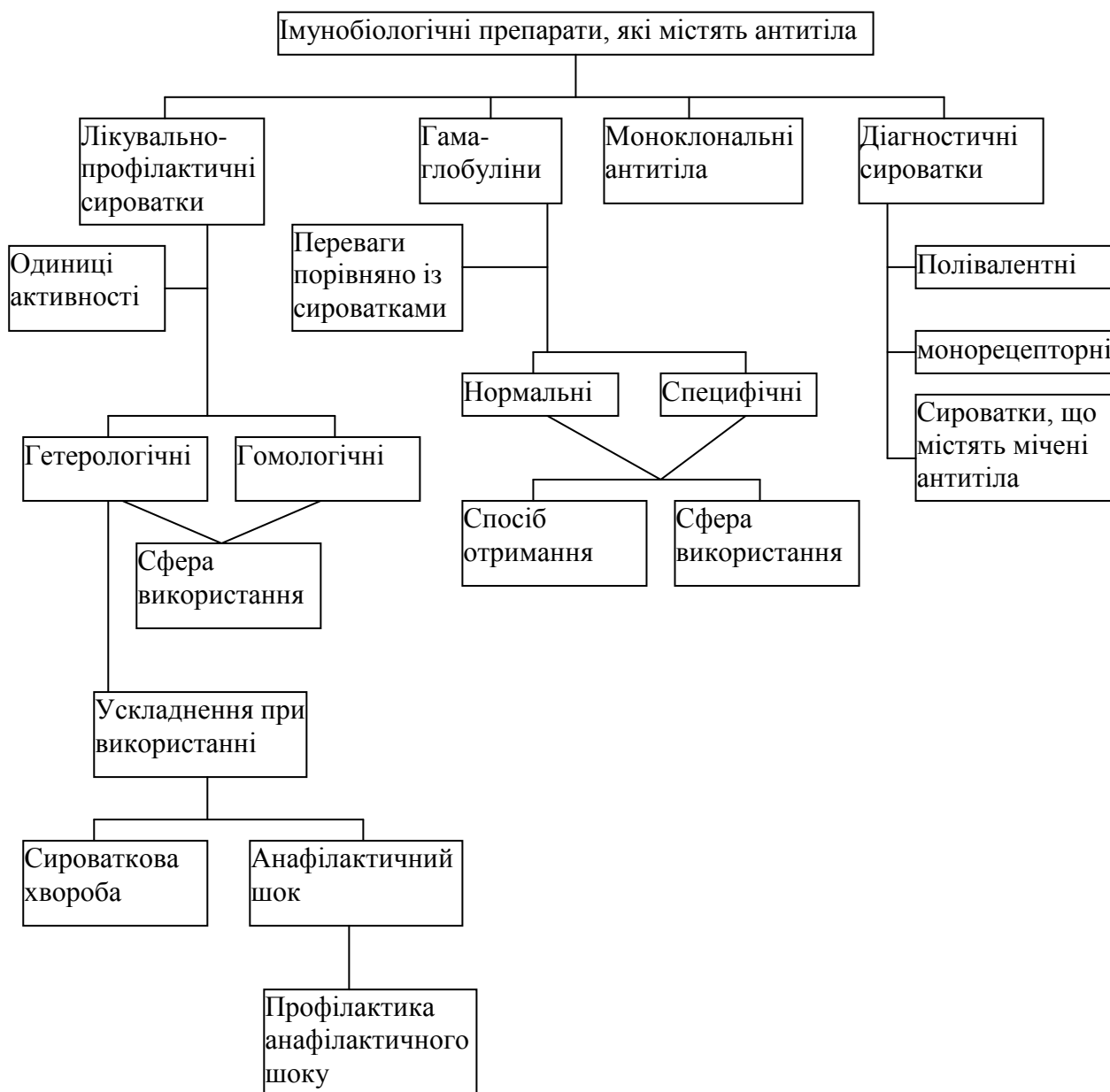
3. Людині, яка постраждала у дорожно-транспортній пригоді необхідно провести екстренну профілактику правця – ввести протиправцеву сироватку. Однак виявилось, що лікувальної антитоксичної протиправцевої сироватки у лікаря немає. Чи можна замість неї ввести такий самий об'єм діагностичної сироватки до правцевого анатоксину?

Графологічна структура теми:

“Вакцини та сироватки”



Графологічна структура теми: “Вакцини та сироватки”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.13

Вакцини та сироватки

Завдання 1. Приготування стафілококової аутовакцини.

Щоб довести маточну суспензію до густини 1 млрд. мікробних клітин/мл, до 1 мл суспензії було додано _____ мл фізіологічного розчину (*a*).

Отже вихідна густина маточної суспензії становить: $a + 1 =$ _____ млрд. /мл (*x*).

Для приготування вакцини, яка містить 2 млрд. /мл, треба до 1 мл маточної суспензії додати : $x/2 - 1 =$ _____ мл фізіологічного розчину.

Перевірка вакцини на стерильність : _____ .

Завдання 2. Визначення сили антитоксичної сироватки.

| №№ пробірок | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| досліджувана сироватка (мл) | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 |
| токсин, який містить 20Lf/мл (мл) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| результат | | | | | | | |

Висновок: ініціальна флокуляція спостерігається у пробірці № _____,

у якій міститься _____ Lf токсину (*x*),

тобто у _____ мл сироватки (*v*) також міститься *x* МО.

Це означає, що 1 мл сироватки містить: $x:v =$ _____ МО.

**Умовні
позначки:**

-АТ

-АГ

а) б) в)

Рис.1. Механізм реакції флокуляції:

а) $АТ < АГ$ - №№ пробірок _____, реакція йде повільно, або не відбувається;

б) $АТ = АГ$, - № пробірки _____, ініціальна флокуляція;

в) $АТ > АГ$ - №№ пробірок _____, реакція йде повільно, або не відбувається.

Завдання 3. Визначення типу лікувально-профілактичних та діагностичних біопрепаратів.

| Препарати, що містять антигени | Препарати, що містять антитіла |
|--------------------------------|--------------------------------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Позначення: лікувальні – *л*, профілактичні – *п*, діагностичні – *д*.

Дата _____ Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.14

ТЕМА: ІМУННИЙ СТАТУТ ОРГАНІЗМУ. ІМУНОПАТОЛОГІЯ.

Актуальність теми. Функціонування імунної системи, як і будь якої іншої, може порушуватися. В узагальненому вигляді ці порушення можна розділити на три типи: 1) дефектність тієї чи іншої ланки імунної системи; 2) ауто-агресія проти нормальних компонентів тіла та надмірне накопичення імунних комплексів; 3) гіпертрофія окремих ланок імунної системи, що порушує функціонування інших ланок. Порушення функціонування імунної системи здатні викликати широке коло захворювань – інфекційні процеси, аутоімунні розлади, пухлини, алергії та ін. Для оцінки стану імунної системи і діагностики порушень її роботи проводяться спеціальні лабораторні дослідження. Вони мають вирішальне діагностичне значення при первинних та вторинних імунодефіцитах, дисгаміаглобулінемії, ангіоневротичному набряку, хронічному грануломатозі у дітей, системному червоному вовчаку та інших аутоімунних захворюваннях, переливанні крові, підборі донорів при пересадках, резус-несумісності матері та плоду, лейкозах, лімфомах, трофобластомі, первинному раку печінки. Допоміжну роль дослідження імунного статусу виконують також при шкірних, ендокринних, неврологічних і навіть психічних захворюваннях.

Мета (загальна): уміти пояснювати склад та особливості функціонування основних ланок імунної системи організму людини, вибирати методи дослідження їхнього стану та оцінювати результати цих досліджень.

Конкретні цілі – уміти:

1. Проводити кількісну оцінку вмісту Т-лімфоцитів у периферичній крові методом Е-РОК.
2. Визначати функціональну активність Т-лімфоцитів у реакції бластної трансформації.
3. Проводити кількісну оцінку вмісту В-лімфоцитів у периферичній крові методом ЕАС-РОК.
4. Визначати функціональну активність В-лімфоцитів за допомогою реакції Манчіні.
5. Пояснювати сутність та сферу використання інших імунологічних тестів, розрізняти орієнтовні та аналітичні тести.
6. Інтерпретувати карту імунологічного обстеження хворого, робити загальний висновок про його імунний статус.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Визначати формулу крові (кафедра гістології).
2. Розрізняти фази мітозу (кафедра медичної біології).
3. Пояснювати хімічний склад сироватки крові (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Оцінка імунного статусу людини включає, поряд зі спеціальними тестами, визначення формули крові. Яким чином вона визначається?

Завдання 2. Важливий показник активності лімфоцитів – це їхня здатність до проліферації. За якою ознакою можна відрізнити клітину, що готується до міто-

зу, від інтерфазної клітини? а) збільшення розмірів клітини; б) утворення внутрішньоядерних включень; в) скупчення мітохондрій на протилежних полюсах; г) суперспіралізація хромосом; д) руйнування комплексу Гольджі.

Завдання 3. У імунологічній лабораторії проводиться дослідження сироватки крові. Які речовини, що з ними пов'язаний специфічний та неспецифічний захист організму, можуть бути виявлені при цьому? а) комплемент; б) протромбін; в) фібриноген; г) гамаглобулін; д) гістамін.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.- 2002.-725 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
3. Биология / Под ред.В.Н.Яригина. М.: Высшая школа. - 2004.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Поняття про імунний статут організму. Основні показники стану імунної системи.
2. Показання до імунологічного обстеження.
3. Первинні імунодефіцити, їх механізми.
4. Вторинні імунодефіцити. Можливі причини вторинних імунодефіцитів.
5. Поняття про алергію. Основні типи алергічних реакцій.
6. Аутоімунні захворювання, їх причини, класифікація.
7. Визначення стану Т-системи імунітету.
8. Визначення стану В-системи імунітету.
9. Імунологічні тести I та II рівня, їх призначення.
10. Принципи імунокорекції.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология.- М.: Медицина, 2005. С.311-322.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С. 159-165.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.С.105-106.
4. Петров Р.В. Иммунология.- М.: Медицина, 1987.- С. 73-87, 298- 333, 360-376.
5. Творко М.С. Імунологія.- Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.- С.69-107.
6. Матеріал лекції "Імунопатологія. Оцінка імунного статусу організму".
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 265-282.
8. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С. 301-444.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Імунний статут організму. Імунопатологія” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: мікропрепарати для визначення формули крові, врахування Е-РОК та ЕАС-РОК, реакції бластної трансформації, макропрепарати із демонстрацією РП у гелі (реакція Манчіні) для побудови каліброваної кривої та визначення вмісту імуноглобулінів різних класів у сироватці, ФГА, антиглобулінові сироватки.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Оцінка Т-системи імунітету.

а) Врахувати результат досліду з кількісної оцінки вмісту в крові Т-лімфоцитів за методом розеткоутворення лімфоцитів з еритроцитами барана .

Оскільки усі Т-лімфоцити мають рецептори до еритроцитів барана, їхню кількість визначають за здатністю приєднувати до себе кілька (не менш 3) еритроцитів барана, утворювати "розетки". (Реакція виявлення клітин, які утворюють розетки з еритроцитами називається Е-РОК).

Для постановки реакції беруть 3-6 мл гепаринізованої крові хворого і центрифугують з реагентами, які дозволяють розділити лімфоцити й інші клітинні елементи крові (еритроцити, гранулоцити). З одержаних лімфоцитів готують суспензію на середовищі N199, вона повинна містити до 2 млн. лімфоцитів на 1 мл. Далі у пробірку відбирають у рівних кількостях (0,1-0,2 мл) суспензії лімфоцитів і 0,5% суспензії еритроцитів барана. Реакція проходить при інкубації в термостаті при 37°C протягом 30 хв. і в холодильнику до 1 години. Підрахунок клітин проводять у камері Горяєва: підраховують 200 лімфоцитів і визначають відсоток кліток, що зв'язують 3 і більш еритроцитів. Потім підраховують абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові (за даними загального аналізу крові). У здорових людей у крові міститься 55-76% Т клітин від загальної кількості лімфоцитів, що становить 600-2500 клітин на мкл. Зменшення кількості Т-лімфоцитів - показник пригнічення клітинного імунітету.

б) Зробити облік результатів РБТЛ(реакції бластної трансформації лімфоцитів) для оцінки функціональної активності Т-лімфоцитів.

Неспецифічна реакція бластної трансформації лімфоцитів РБТЛ проводиться з ФГА (фітогемаглютинін). Це речовина рослинного походження, яка здатна неспецифічно стимулювати Т-лімфоцити.

0,1-0,2 мл крові хворого протягом 3-х діб культивуються при $T=37^{\circ}\text{C}$ з ФГА на середовищі для культивування клітин (середовище N199, бичача сироватка, антибіотики). Після культивування з цих клітин готуються мазки і фарбуються за Романовським-Гімзою. Підраховують 200 клітин і визначають серед них відсоток бластів. У здорових людей РБТЛ дорівнює 70-85%. Пригнічення активності клітинного імунітету супроводжується зниженням РБТЛ.

Роздивитися Е-РОК та РБТЛ під мікроскопом та врахувати результати. У протокол занести відповідні малюнки, зробити висновки щодо стану Т-системи імунітету обстежуваної людини.

2. Оцінка В-системи імунітету.

а) Зробити облік результатів досліду з кількісної оцінки вмісту В-лімфоцитів у крові за методом ЕАС-РОК.

Усі В-лімфоцити мають рецептор до третього компонента комплементу (C_3 -компонент), тому їх виявляють у реакції розеткоутворення з еритроцитами, навантаженими антитілами до еритроцитів і комплементом. Лімфоцити одержують як і для реакції Е-РОК. Окремо готують 5% суспензія еритроцитів барана, які навантажують антитілами, для цього використовується гемолітична сироватка в субгемолітичній дозі. Суміші лімфоцитів і навантажених еритроцитів інкубують протягом 30 хв. при $T=37^{\circ}\text{C}$. У здорової людини кількість В-лімфоцитів у периферичній крові становить 20-25% від загальної кількості лімфоцитів. Облік ЕАС-РОК здійснюють аналогічно Е-РОК. У протоколі схематично відобразити механізм ЕАС-РОК, зробити кількісну оцінку стану В-системи імунітету хворого.

б) Визначити загальну кількість імуноглобулінів основних класів методом радіальної імунодифузії в гелі (реакція Манчіні).

Метод заснований на взаємодії антигену з антитілом у реакції преципітації в гелі. Імуноглобуліни в сироватці хворого виступають як антиген, а антитіла до них – у сироватці кролика, імунізованого імуноглобуліном людини якогось одного класу G, M чи A (антиглобулінова сироватка). Вміст імуноглобулінів у сироватці хворого визначається відносно стандартної сироватки крові донора з відомою кількістю імуноглобулінів кожного класу. Тому у кожній упаковці моноспецифічної кролячої антисироватки міститься також "Стандартна сироватка крові людини" із зазначеним вмістом імуноглобулінів кожного класу в мг/мл.

З промитого сухого агар-агару готується гель, який ще теплим змішують з однією з моноспецифічних сироваток і заливають на скло. Голи гель застигне, у ньому пробійником роблять 2 ряди лунок. У перший ряд лунок наливають мікрошприцем стандартну сироватку в розведенні 0, 1:2, 1:4, 1:8 (для каліброваної кривої). У лунки другого ряду наливають цільні сироватки хворих. Тому що визначають 3 класи імуноглобулінів, таких стекол роблять 3 - для кожного класу свій гель з антисироваткою і свій ряд стандартної сироватки для побудови своєї каліброваної кривої. Пластини інкубують у вологій камері 24 години для Ig G і Ig A, і 48 годин для Ig M ($T=4^{\circ}\text{C}$). Після цього заміряють діаметр кілець преципітації стандартної сироватки і сироваток хворих. За діаметрами стандартної сироватки креслять калібровану криву для кожного класу імуноглобулінів окремо, відкладаючи на осі абсцис (X) діаметри кілець преципітації в мм, і на осі ординат (Y) - кількість імуноглобулінів у мг/мл того чи іншого класу в розведеннях. Рівні кожного класу імуноглобулінів у сироватці хворого визначають по відповідній кривій. Середні концентрації імуноглобулінів основних класів:

Ig G - 6-16 мг/мл;

Ig A - 0,5-1,8 мг/мл;

Ig M - 1-5 мг/мл.

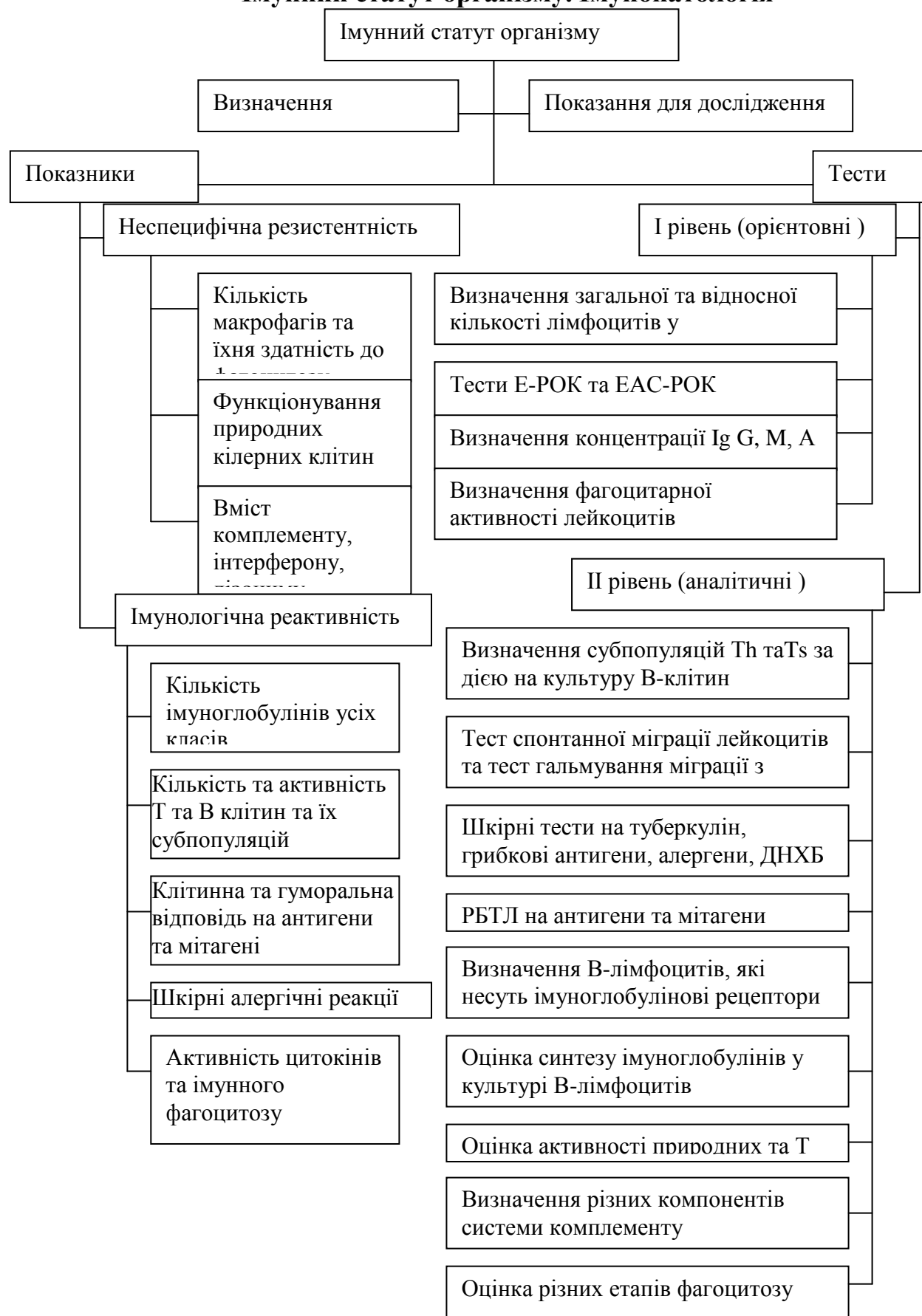
За рішенням ВООЗ орієнтованим рівнем у діагностиці імуноглобулінової недостатності (первинні і вторинні імунодефіцити) прийняті концентрації - 2 мг/мл при поєднанні із відповідною клінічною симптоматикою. У протоколі схематично замалювати постановку досліду, накреслити калібровані криві та

визначити за ними вміст імуноглобулінів різних класів у сироватці хворого. Зробити висновок про функціональний стан В-системи імунітету.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У лабораторії було приготовлено агаровий гель, до якого додали кролячу антиглобулінову сироватку до людського імуноглобуліну класу М. Як і для чого буде використано цей реактив?
2. У імунологічній лабораторії приготовлено реактив, який уявляє собою еритроцити барана, оброблені гемолітичною сироваткою та навантажені комплементом. Для виявлення яких клітин імунною системи його буде використано? На якій особливості цих клітин базується методика їх визначення?
3. У жінки 37 лет протягом року періодично виникали бактеріальні інфекції, їх перебіг був тривалим, а ремісії короткочасними. При обстеженні виявлено гіпогамаглобулінемію. Порушення функції яких клітин може бути її причиною? Які дослідження дозволять визначити кількісний вміст цих клітин та їх функціональну активність?
4. Дитина одного року часто хворіє на вірусні та бактеріальні інфекції, які погано піддаються терапії. При проведенні імунологічного обстеження, виявлено відсутність у крові лімфоцитів, що забезпечують клітинний імунітет. Який метод дослідження дозволив поставити діагноз? До якого типу імунодефіцитів відноситься захворювання, виявлене у дитини? Які причини захворювання та можливості його лікування?
5. У хворого з клінічними ознаками імунодефіциту проведені імунологічні дослідження. Виявлено значине зниження кількості клітин, які утворюють розетки с еритроцитами барана. Як називається використаний метод діагностики? Який висновок слід зробити на основі даних аналізу?
6. У хворой з клінічними ознаками імунодефіциту та незміненою кількістю та функціональною активністю Т- і В-лімфоцитів при обстеженні виявлено дефект на молекулярному рівні, при якому порушена функція антигенпрезентації імунокомпетентними клітинами. Дефект структур яких клітин є можливим?
7. У хворого діагностовано набутий дефект імунної системи - порушення активації системи комплементу за класичним шляхом на фоні достатньої кількості всіх компонентів системи. Передбачається дефект антитілоутворення. Зменшення вмісту яких антитіл найбільш імовірно? Яким чином можна встановити реальний вміст цих імуноглобулінів у сироватці хворого?

Графологічна структура теми: “Імунний статус організму. Імунопатологія”



Графологічна структура теми: “Імунний статус організму”



Зразок протоколу до практичного заняття №1.14

Імунний статут організму. Імунопатологія.

Завдання 1. Оцінка Т-системи імунітету.

а) визначення кількості Т-лімфоцитів методом розеткоутворення:

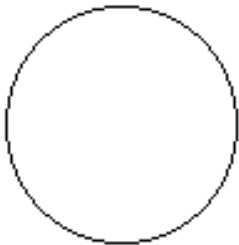
Умовні позначення:

- 1.
- 2.
- 3.

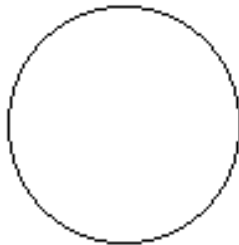
Рис.1 Е-РОК

Висновок: у досліджуваній крові міститься _____ % Т-лімфоцитів, що свідчить про _____.

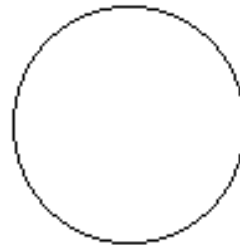
б) визначення функціональної активності Т-клітин у РБТЛ:



а)



б)



в)

Рис 2. РБТЛ. (а-в - поступові етапи перетворення Т-лімфоцитів на бласти)

Висновок: РБТЛ становить _____ %, тобто активність Т-клітин _____.

Завдання 2. Оцінка В-системи імунітету.

а) визначення кількості В-лімфоцитів методом ЕАС-розеткоутворення

Умовні позначення:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Рис.3 ЕАС-РОК

Висновок: у досліджуваній крові міститься _____ % В-лімфоцитів, що _____ нормі.

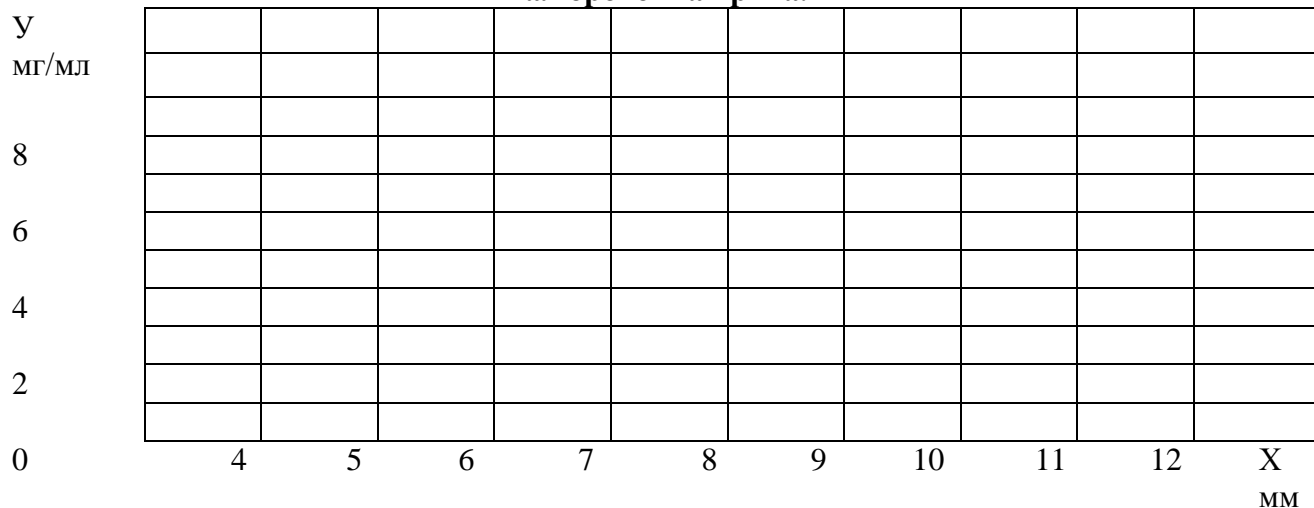
б) визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці методом радіальної імунної дифузії

Умовні позначення:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Рис.4 Реакція Манчіні

Калібровочна крива.



_____ Ig G
 - - - - - Ig A
 Ig M

Діаметри зон преципітації, утворені сироваткою хворого:
 для Ig G _____ мм, для Ig A _____ мм, для Ig M _____ мм.

Висновок: Концентрація імуноглобулінів у досліджуваній сироватці становить:

Ig G _____ мг/мл,

Ig A _____ мг/мл,

Ig M _____ мг/мл.

Діагноз імуноглобулінової недостатності _____.

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.15
ТЕМА: ХІМІЧНИЙ СКЛАД, МОРФОЛОГІЯ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРА
ВІРУСІВ. РЕПРОДУКЦІЯ ВІРУСІВ. БАКТЕРІОФАГИ.

Актуальність теми. Серед інфекційної патології 90% припадає на вірусні інфекції. У зв'язку з цим перед медичною вірусологією встають важливі завдання по кваліфікованій діагностиці, лікуванню вірусних інфекційних захворювань, удосконаленню організації та діяльності вірусологічних лабораторій, розробці профілактичних засобів. Вивчення типів взаємодії вірусів з клітинами макроорганізму дозволяє зрозуміти механізми розвитку не тільки інфекційних, а й онкологічних захворювань.

Особливий інтерес представляють бактеріофаги. З наростаючою стійкістю мікроорганізмів до багатьох антибіотиків і сульфаніламідів збільшується роль бактеріофагів у профілактиці і лікуванні бактеріальних інфекцій. Важливість вивчення бактеріофагів, їхньої взаємодії з мікробною клітиною визначається роллю цих вірусів в епідеміологічних дослідженнях (фаготипування) в експрес-методах виявлення патогенних бактерій у досліджуваному матеріалі (РНТФ). Крім того, бактеріофаги широко використовуються у генній інженерії та у дослідженнях з генетики мікроорганізмів.

Мета (загальна): **уміти:** на основі знань біологічних властивостей вірусів, як особливої неклітинної форми життя, аналізувати роль вірусів як етіологічного фактора інфекційних хвороб; використовувати методи фагодіагностики, фагопрофілактики та фаготерапії.

Конкретні цілі – уміти:

1. Тракувати біологічні властивості вірусів, як особливої, неклітинної форми життя.
2. Аналізувати особливості взаємодії вірусів з живими системами.
3. Пояснювати особливості імунної відповіді при вірусних інфекціях.
4. Розрізняти властивості вірулентних та помірних бактеріофагів.
5. Визначати титр бактеріофагу.
6. Проводити індикацію бактерій за допомогою фагів.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Знати основи принципів систематики організмів (кафедра біології).
2. Знати ієрархію біомолекулярної організації клітин живих організмів (кафедра біохімії).
3. Знати механізм біосинтезу РНК та ДНК (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

1. У класифікації вірусів використовуються такі таксони: порядок, родина, підродина, рід, вид. Таксони більш високого рівня для вірусів не визначені. Які це таксони?
2. Які функції виконують різні типи нуклеїнових кислот у клітині?

3. Складні віруси мають зовнішню оболонку, яка утворюється з клітинної мембрани. Які речовини входять до її складу?
4. Проникнення вірусів у клітину відбувається за рахунок рецепторного ендоситозу. Що це означає?
5. Бактеріофаги репродукуються у клітинах бактерій, в наслідок чого бактерії гинуть. Як називається такий тип взаємодії організмів?
6. Інтеграція геному помірної бактеріофагу у бактеріальну хромосому відбувається за допомогою ферментів рестриктази та лігази. Які реакції каталізують ці ферменти?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Біологія / Под ред. В.Н. Яригіна. М. Высшая школа. – 2006., 431с.
2. Біохімія / Под ред. акад. А.Баєва М: Изд.Мир, 1976. С.21-43.
3. Біохімія/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. С.118-138.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Визначення вірусів, як особливих форм організації живого.
2. Хімічний склад віріонів. Відмінність структурної організації і хімічного складу віріонів від бактерій.
3. Репродукція вірусів. Основні типи взаємодії вірусу з клітиною хазяїна.
4. Основні типи взаємодії вірусу з клітиною хазяїна.
5. Бактеріофаги – віруси бактерій. Анатомічна будівля Т-парного фага. Практичне застосування фага. Фагодіагностика (РНТФ, фаготипування), фагопрофілактика і терапія.
6. Помірні фаги, особливості їхньої взаємодії з бактеріальною клітиною. Профаг. Явище лізогенії. Фагова конверсія.
7. Практичне застосування фага. Фагодіагностика (РНТФ, фаготипування), фагопрофілактика і терапія.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Мікробіологія. М.: Медицина, 2005. С. 68-82.
2. Вороб'єв А.А. и др. Мікробіологія. М.: Медицина, 1998. С. 37-41, 51-62, 190-191.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000., С. 239-260.
4. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична вірусологія.- Луганськ, 2002.- С. 31-59, 127-136.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984., С.96-104.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Вороб'єва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - с. 69-75, 79-82, 302.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – с. 426-428.

Матеріали та обладнання: таблиці: "Морфологія вірусних часток", "Схема побудови Т-парного бактеріофага", "Взаємодія вірусу з клітиною", чашки для

дослідження по якісному визначенню фагів, суточна бульйонна культура E.coli, готові чашки, які засіяні культурою бактерій для титрування по Грація, культури стафілококів, типові стафілококові бактеріофаги.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити морфологію й ультраструктуру віріонів за таблицями, як приклад занести до протоколу схему побудови Т-парного бактеріофага та вірусу грипу. Порівняти їхню структуру.
2. Визначити титр бактеріофага за методом Грація шляхом підрахунку негативних колоній на готових чашках, засіяних 0,5мл культури бактерій та тієї ж кількості розведеннь бактеріофага (до 10^{-7}). Після виявлення та підрахунку кількості негативних колоній визначити кількість фагових часток у 1 мл досліджуваного матеріалу з урахуванням розведення.
3. Провести дослідження з якісного визначення фагів, для чого на чашку, яка була засіяна добовою бульйонною культурою E.coli, нанести каплю фага. Чашку нахилити для стікання рідини до протилежного боку. Після інкубації врахувати результати (по наявності зон лізису бактеріальної культури). Схематичний малюнок занести до протоколу, зробити висновок про здатність виділеного фага розмножуватися у клітинах тест-культури.
4. Визначити фаготип культури стафілококів, виділених від хворого з гнійними після-операційними ранами і з носоглотки медсестри перев'язної для встановлення джерела інфікування.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. З випорожнень хворого виділена дизентерійна паличка. З метою підтвердження приналежності культури до шигел необхідно визначити здатність культури лізуватися полівалентним дизентерійної фагом. Як це перевірити?
2. У лабораторію надійшла вода з ріки Дніпро для визначення можливої присутності у воді фекальних кишкових паличок. Необхідно визначити наявність фагів бактерій групи кишкових паличок. Який метод дослідження варто застосувати з цією метою? Які інгредієнти необхідно підготувати для цього?

Зразок протоколу до практичного заняття № 1.15

Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів.

Завдання 1. Морфологія та ультраструктура вірусів.

Рис.1.Схема побудови вірусу людини
(вірус грипу)

Рис.2. Схема побудови вірусу бактерій
(фаг Т-4)

Умовні позначення:

Завдання 2. Титрування бактеріофага методом агарових шарів (за Грація)

Досліджуваний матеріал _____

| Врахування результатів | Розведення досліджуваного матеріалу | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1:10 | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | 1:10 ⁶ | 1:10 ⁷ |
| Кількість негативних колоній | | | | | | | |

Висновок : титр бактеріофага _____ .

а) вид збоку

Умовні позначення:

б) вид зверху

Рис.3. Негативні колонії на чашці Петрі, отримані за методом агарових шарів.

Завдання 3. Індикація бактеріофагу якісним методом

Висновок: на чашці, з культурою E.coli, спостерігається _____, що свідчить _____.

Завдання 4. Визначення джерела стафілококової інфекції методом фаготипування.

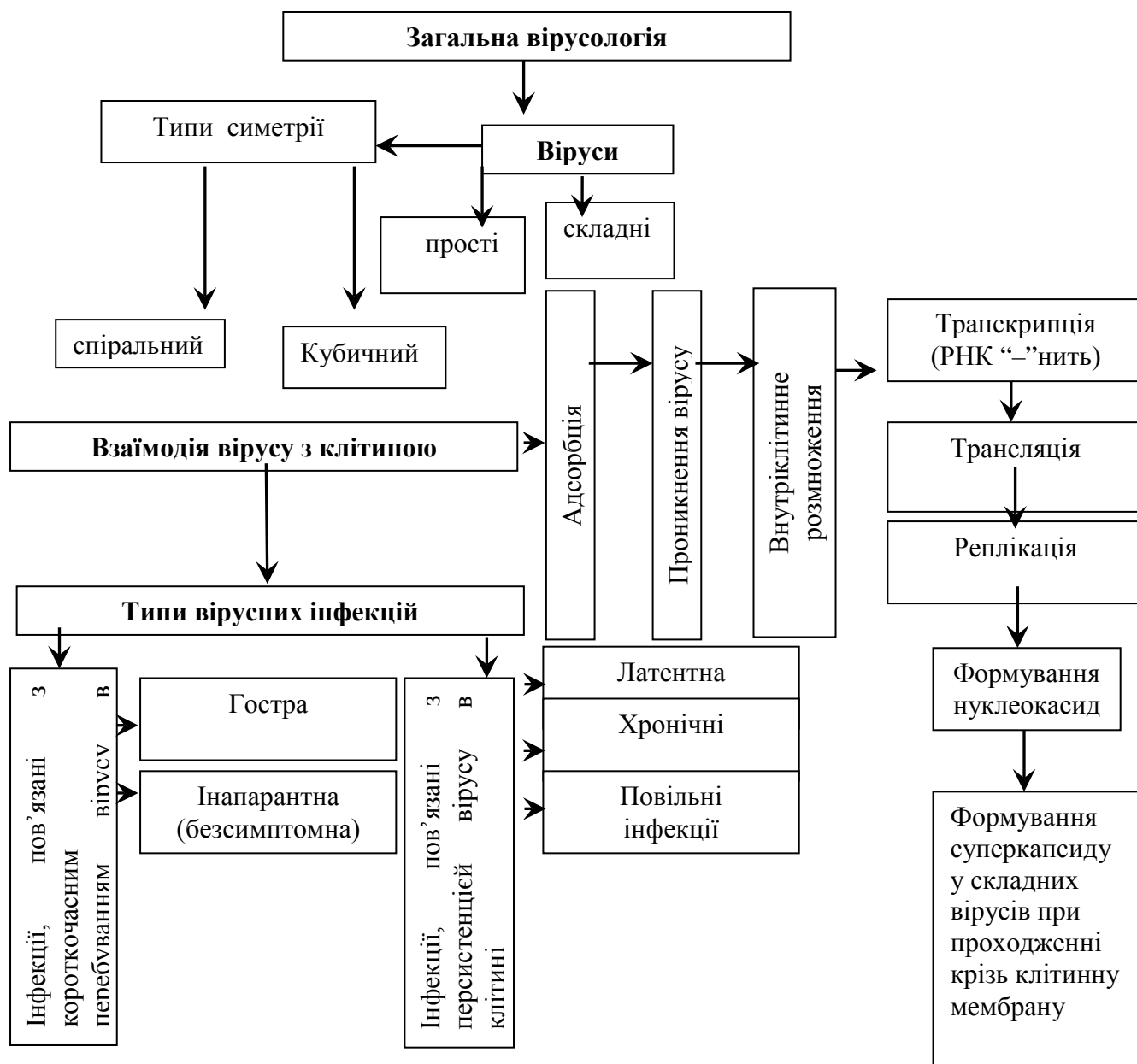
Висновок: культури стафілококів, виділені від хворих мають фаготип _____, культура стафілококів, виділена від медсестри має фаготип _____. Це означає, що _____.

Дата _____

Підпис викладача _____

Графологічна структура теми:

“Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів”



ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.16

ТЕМА: МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ІНДИКАЦІЇ ВІРУСІВ

Актуальність теми. Для багатьох вірусних інфекцій найбільш надійним методом діагностики є вірусологічний, який передбачає виділення вірусу з патологічного матеріалу, його індикацію, а потім ідентифікацію. Оскільки віруси це облигатні внутрішньоклітинні паразити, їхнє культивування на поживних середовищах неможливе. Для виділення вірусів використовуються живі об'єкти: курячі ембріони, культури клітин, лабораторні тварини. Кваліфікований лікар повинен мати уяву про методики культивування вірусів на цих об'єктах та індикації вірусів, дотримуватися правил безпеки при роботі з вірусмістним матеріалом.

Мета (загальна): характеризувати методи культивування та індикації вірусів в лабораторних умовах для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Проводити зараження курячих ембріонів вірусмістним матеріалом.
2. Визначати титр вірусу в хоріоналантаїсній рідині зараженого курячого ембріона за допомогою реакції гемаглютинації.
3. Виявляти ЦПД у клітинній культурі, зараженій вірусом.
4. Характеризувати інші методи індикації вірусів: за геадсорбцією, кольоровою пробою, бляшкоутворенням.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Знати ієрархію біомолекулярної організації клітин живих організмів (кафедра біохімії).
2. Знати принципи структурної організації вірусів.(кафедра мікробіології).
3. Відмінність структурної організації і хімічного складу віріонів від бактерій (кафедра мікробіології).
4. Структурна та функціональна характеристика живої клітини (кафедра біології).
5. Основні типи взаємодії вірусу з клітиною хазяїна (кафедра мікробіології).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

1. Дати визначення поняття паразитизм.
2. Основні відмінності живих від неживих об'єктів.
3. Поясніть відмінність мутантних (фіброласти, міобласти) клітин від ракових клітин.
4. Перелічить та дайте функціональну характеристику незародкових органів.
5. Назвіть головну умову при використанні клітинних культур.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Біологія / Под ред.В.Н.Яригина. М. Высшая школа. – 2006., 431с.
2. Биохимия /Под ред. акад. А.Баева М: Изд.Мир, 1976. С.21-43.
3. Биохимия/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. С.118-138.

4. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 1994. С. 68-70, 201-205.
5. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.-2002.-725с.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Методи культивування вірусів у клітинних культурах, у курячому ембріоні та в організмі тварин.
2. Методи виявлення (індикації) вірусів за цитопатичною дією (ЦПД).
3. Типи цитопатичної дії.
4. Реакції гемаглютинації і гемадсорбції, бляшкоутворенню, внутрішньоклітинним включенням.
5. Методи ідентифікації вірусів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина, 2005.-С. 82-92.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С. 55-59.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.С. 239-260.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 96-104.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 -С. 76-79.

Матеріали та обладнання: таблиці: "Морфологія вірусних часток", "Культивування вірусів у курячому ембріоні", культури тканин, пробірки або пластикові планшети, ХАР, еритроцити, мікропрепарати з ЦПД.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити метод культивування вірусів на курячому ембріоні, способи зараження курячих ембріонів. Схематичні малюнки занести до протоколу. Провести зараження курячого ембріону в хоріонантоїсну порожнину шляхом введення шприцем вірусутримуючого матеріалу у об'ємі 0,1-0,2 мл на глибину 2-3 мм нижче границі повітряної камери. Отвір, який було зроблено ножицями (після обеззаражування шкарлупи), з метою внесення матеріалу, по закінченню експерименту заливають парафіном. Інкують 48-72 г, після чого шкарлупу обеззаражують, вскривають, знімають хоріонантоїсну оболонку та вивчають наявність пошкоджень – геморагій, білих очагів (бляшок). Хоріонантоїсну рідину відсмоктують пипеткою для подальших досліджень.
2. Визначити титр вірусу в хоріонантоїсній рідині зараженого курячого ембріона за допомогою реакції гемаглютинації. Для чого зробити кратні розведення ХАР, розлити по 0,5мл у лунки плексигласових пластин, додавши по 0,2мл 1% суміші курячих еритроцитів. Врахувати готову реакцію (парасолька - гудзик), результати занести до протоколу.

3. Розібрати на демонстраційному матеріалі етапи приготування культури клітин. Розглянути мікропрепарати первинні та перещеплюваної культури клітин, порівняти їх морфологію. Малюнки занести до протоколу.

4. Розглянути мікропрепарати з різними видами цитопатичного ефекту, порівняти із незараженою культурою клітин. Занести до протоколу малюнки клітинних культур з ЦПД, вказати вид ЦПД (руйнування клітинного моношару, утворення симпластів, осередкова проліферація, внутрішньоклітинні включення тощо).

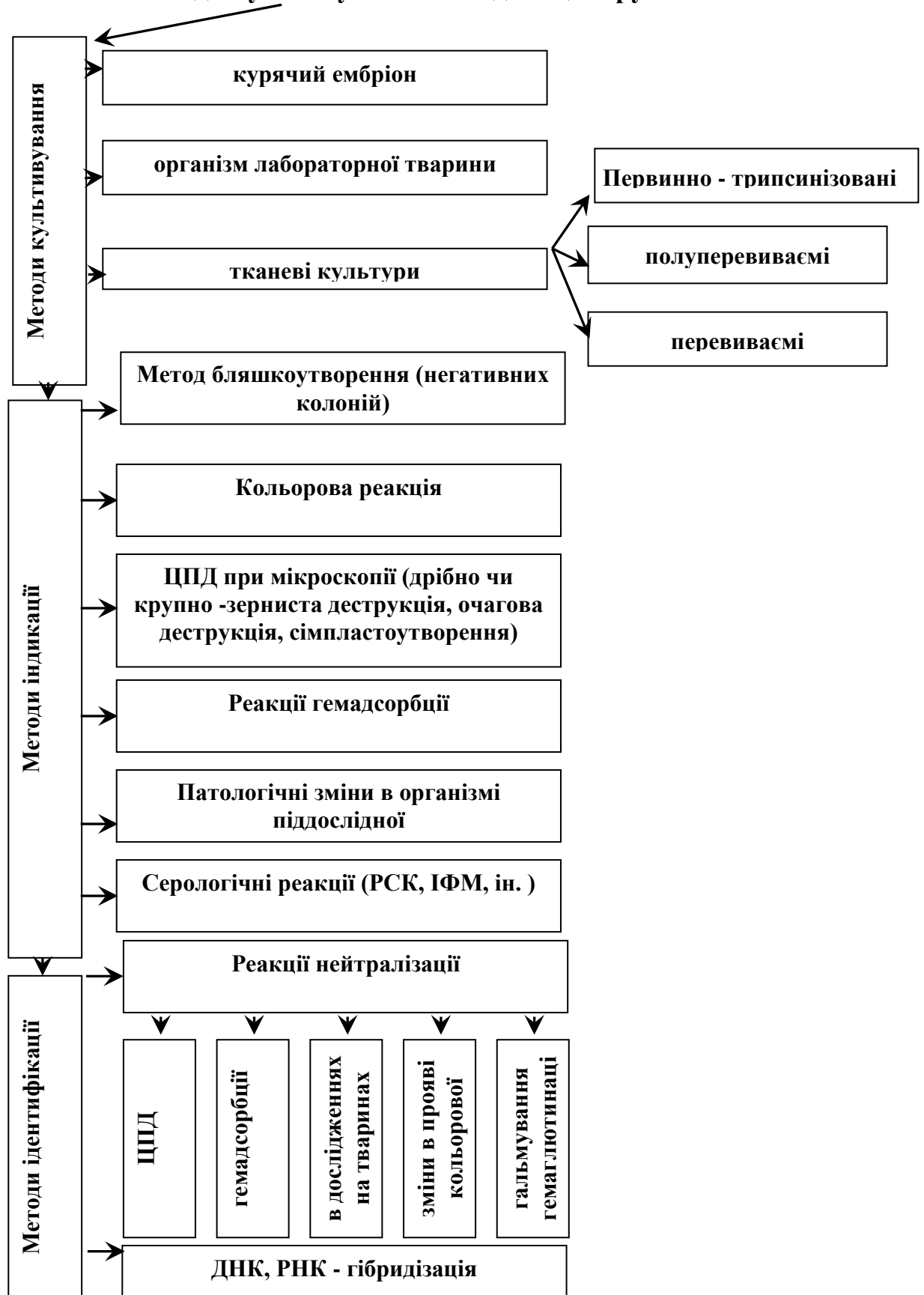
5. За таблицями та демонстраційними зразками вивчити інші методи індикації вірусів при зараженні клітинних культур. В протоколі записати їх назви та вказати, яким чином визначається наявність вірусу у кожному випадку.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. Для проведення вірусологічних досліджень в обласному центрі організована вірусологічна лабораторія. Які культури клітин слід підготувати для виділення вірусів?
2. До лабораторії надійшов матеріал (змив з носоглотки) від хворого з підозрою на грип. Який біологічний об'єкт варто використовувати для виділення вірусу? Яке матеріальне оснащення необхідно забезпечити для проведення дослідження?

Графологічна структура теми:

“Методи культивування та індикації вірусів”



Зразок протоколу до практичного заняття № 1.16

Методи культивування та індикації вірусів

Завдання 1. Культивування вірусів у курячому ембріоні.

Рис.1. Схема зараження курячого
ембріона

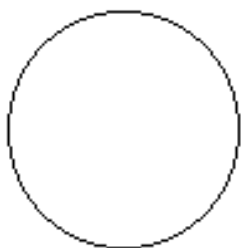
Умовні позначення:

Завдання 2. Індикація вірусу у хоріоналноїсній рідині курячого ембріону за допомогою реакції гемаглютинації

| Досліджуваний матеріал | розведення | | | | | | контроль |
|---------------------------|------------|------|------|------|-------|-------|----------|
| | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | |
| ХАР | | | | | | | |

Висновок: у хоріоналноїсній рідині виявлено _____, титр вірусу _____.

Завдання 3. Клітинні культури для культивування вірусів



**РИС.2. ПЕРВИННА
КУЛЬТУРА**

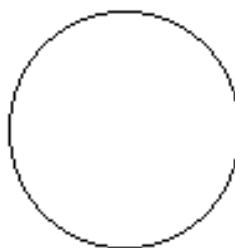


Рис.3. Перещеплювана культура

Завдання 4. Індикація вірусів за ЦПД

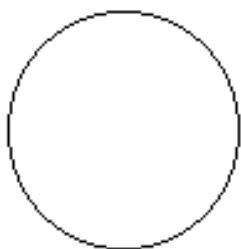


РИС.4.

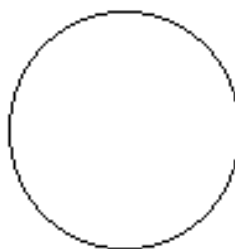


Рис.5.

Завдання 5. Інші методи індикації вірусів на клітинних культурах:

| Назва методу | Ознаки розмноження вірусу |
|--------------|---------------------------|
| | |
| | |
| | |

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.17

ТЕМА: СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ В ВІРУСОЛОГІЇ

Актуальність теми: Задля лабораторної діагностики вірусних інфекцій використовують вірусологічні, серологічні та біологічні методи дослідження. Зараження клітинних культур та лабораторних тварин є дуже трудомістким процесом. Ідентифікацію виділених вірусів проводять за допомогою серологічних реакцій: РПГА, РГГА, РГПГА, гальмування реакції нейтралізації. Вибір тієї чи іншої реакції пов'язаний з особливостями антигенної структури досліджуваного вірусу. Виділення вірусу та його ідентифікація вимагають багато часу: від 7 до 30 днів і більше. Тому велике значення має імуно-флюоресцентний метод (РІФ, РНІФ), що дозволяє знайти та ідентифікувати вірус у патологічному матеріалі за 30-60 хвилин. Імуно-ферментний аналіз (ІФА), твердофазний ІФА, радіо-імунологічний аналіз РІА, імуно-блотінг – всі ці методи володіють високою чутливістю і швидкістю реакції. Тому зараз в вірусологічній практиці їм надається перевага. Особливе значення серологічних досліджень мають у проведенні аналізу спалахів вірусних хвороб, для встановлення джерел інфекцій і напрямків циркуляції вірусу серед людей і тварин як в епідемічному, так і в межепідемічному періоді.

Мета (загальна): уміти проводити ідентифікацію вірусів в РГГА, гальмування РН, РГГА, реакції зв'язування комплементу, РІФ, реакції з поміченими антитілами і антигенами для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах..

Конкретні цілі – уміти:

1. Трактувати механізм серологічних реакцій в вірусології.
2. Характеризувати принципи використання серологічних реакцій.
3. Порівнювати діагностичну цінність серологічних реакцій.
4. Ставити реакцію нейтралізації на культурі клітин для ідентифікації ентеровірусів.
5. Ставити РГГА для ідентифікації вірусу грипу.
6. Ставити РНГА для сіродіагностики кору.
7. Пояснювати механізм та спосіб врахування прямої та непрямой РІФ.
8. Оцінювати реакцію зв'язування компліменту та трактувати особливості постановки РЗК при вірусних інфекціях.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Антитіла, їх будова і функції. Методи їх виявлення.
2. Антигени мікроорганізмів.
3. Реакції між антигенами та антитілами.
4. Використання серологічних реакцій в бактеріології.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Яка причина утворення ЦПД на культурі клітин? У чому воно проявляється?

Завдання 2. Які імуноглобуліни вказують на розвиток хронічного процесу?

Завдання 3. Назвіть відомі вам індикаторні системи в серологічних реакціях.

Завдання 4. Назвіть вміст та призначення діагностиків.

Завдання 5. Що необхідно для постановки реакції нейтралізації з метою виявлення мікробних токсинів?

Завдання 6. З якою метою ставиться РГА з ХАР курячих ембріонів, заражених вірусвмістним матеріалом?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиологія. М.: Медицина, 2005. С.209-288.
2. Вороб'єв А.А.и др.Микробиологія.- М.: Медицина,1998. С. 144-148, 149-153.
3. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиологія.- К.: Вища школа, 1992.- С. 173-176, 176-181.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова. – М.: Медицина, 1984.-С.107 - 122.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Антигенні властивості вірусів.
2. Серологічні реакції, які використовують у вірусології. Реакція віруснейтралізації: механізм, принципи використання, діагностична цінність.
3. Реакція гальмування гемаглютинації, її механізм, умови постановки, принципи використання, діагностична цінність.
4. Реакція зв'язування комплементу, її суть, оцінка, особливості постановки.
5. Реакції з міченими антитілами.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина,2005. –С. С.307, 325-327.
2. Микробиологія, под ред А.А. Вороб'єва и др. –М. Медицина, 1994.-С.175-181.
3. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиологія.- К.: Вища школа, 1992.- С.173-176, 192-204.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.-С.107-122, 235.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Вороб'єва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – с. 289-293.
6. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – с. 496-499.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Серологічні реакції у вірусології” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: планшет з РТГА, нормальна культура клітин і з ЦПД, планшет з РПГА з парними сироватками, препарати, які використовуються для діагностики вірусних інфекцій методом РіФ, ІФА.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Провести ідентифікацію вірусу грипу у ХАР (хоріоналантоїсна рідина) за допомогою реакції гальмування гемаглютинації (РГГА). Діагностичні сироватки

ватки тип А і В взяти в розведеннях от 1:10 до розведення, яке відповідає титру вірусу (наприклад 1:160). До них додається невідомий вірус, що міститься в ХАР (0,2 мл). Після інкубації на протязі 60 хвилин у термостаті при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в усі лунки додається суспензія еритроцитів 0(1) групи – 0,4 мл. Інкубація 30-60 хвилин. Результати реакції враховують по відсутності гемаглютинації до титру вірусу. Дані занести до протоколу, зробити висновок про тип вірусу.

2. Провести ідентифікацію вірусу в реакції нейтралізації (РН) на культурі клітин (демонстрація). Випорожнення хворого обробляють антибіотиками по 1000 ОД в 1 мл в розчині Хенкса при 4°C на протязі доби, після чого проводять контрольний висів на стерильність. При відсутності бактерій суспензією випорожнень заражають по 2 пробирки з первинною культурою клітин та перещеплюваною культурою клітин. На другий - третій день після інкубації заражених клітинних культур при 35°C спостерігається повна або часткова дегенерація клітин. При відсутності ЦПД дослідження припиняють, при наявності – проводять ідентифікацію вірусу. Досліджуваний вірус титрують в тій клітинній культурі, на якій він був виділений. Вірусмісна рідина змішується з полівалентними діагностичними сироватками і засівається на культуру клітин. Облік через 2 дні інкубації в термостаті за ЦПД. Дані занести до протоколу. Якщо нейтралізація досліджуемого вірусу пройшла, то застосовують реакцію нейтралізації з моновалентними сироватками до кожного серотипу даного вірусу.

3. Провести серологічну діагностику вірусної інфекції в реакції непрямой гемаглютинації (демонстрація). РНГА наступає, коли до еритроцитів, сенсibilізованих антигеном, тобто таких, що несуть на собі адсорбований антиген, додають імунну сироватку, відповідну антигену. РНГА з еритроцитами проводять з відомим антигеном для виявлення антитіл або з відомими антителами для виявлення антигену. РНГА ставиться з парними сироватками, отриманими на початку і наприкінці захворювання. До 0,5 мл сироватки, розведеної від 1:10 до 1:1280 в лунку планшета додають 0,25 мл еритроцитарного діагностикуму. На 2 години ставлять в термостат при 37°C . У якості позитивного контролю використовують нормальний імуноглобулін людини (НІЛ). У якості негативного контролю використовують діагностикум без сироватки. Титром гемаглютинації є розведення сироватки, яке визиває склеювання еритроцитів при повнім просвітлюванні надосадної рідини. Результати досліджень занести до протоколу. Наявність агглютинації еритроцитів "++". Відсутність агглютинації ознака – мінус. Титром вірусу є найбільше розведення сироватки, де спостерігається аглютинація еритроцитів.

4. Розглянути принцип сучасних методів діагностики вірусних і бактеріальних інфекцій в реакціях з використанням мічених Apt і Ang - РІФ, РІА, ІФА, імуно-блотінг (демонстрація).

Реакція імунофлюорисценції— РІФ (метод Кунса) — заснована на тому, що Ang, оброблений імунними сироватками з антитілами, міченими флюорохромами, здатний світитися в ультрафіолетових променях люмінесцентного мікро-

скопу (прямий метод). Реакція Кунса може бути використана як для виявлення антигенів, так і для визначення антитіл. Різновид — непрямий метод Кунса (РНІФ). Застосовується одна універсальна флюоресцируюча сироватка - антиглобулінова. На утвореному комплексі (специфічні антитіла –досліджуваній антиген) фіксуються флюоресцируючі антиглобулінові антитіла, які визивають світіння при люмінісцентній мікроскопії. **Імуноферментний аналіз (ІФА)** — виявлення антигену за допомогою відповідних йому антитіл, кон'югованих з ферментом — міткою (пероксидазою хрину, в-галактозидазою, чи лужною фосфатазою). Після з'єднання антигену з міченою ферментом імунною сироваткою у суміш додають субстрат і хромоген. Субстрат розщеплюється ферментом, і його продукти деградації викликають хімічну модифікацію хромогену. При цьому хромоген змінює колір — інтенсивність фарбування прямо пропорційна кількості молекул антигену та антитіла, що зв'язалися.

Найбільш розповсюджений твердофазний ІФА — варіант імунологічного тесту, коли один з компонентів імунної реакції (антиген чи антитіло) сорбований на твердому носії, наприклад у лунках мікропанелей з полістерола. При визначенні антитіл в лунки із сорбованим антигеном послідовно додають сироватку крові хворого, антиглобулінову сироватку, мічену ферментом і суміш розчинів субстрату для ферменту і хромогену. Щораз після додавання чергового компоненту з лунок видаляють реагенти, що не зв'язалися, шляхом ретельного промивання. При позитивному результаті змінюється колір розчину хромогену. Твердофазний носій можна сенсibilізувати як антигенами, так і антитілами. Тоді в лунку з сорбованими антитілами вносять шуканий антиген, додають імунну сироватку проти антигену, мічену ферментом, а потім суміш розчинів субстрату для ферменту та хромогену. ІФА застосовують для діагностики вірусних, бактеріальних і паразитарних хвороб, зокрема для діагностики ВІЛ-інфекцій, гепатиту В та ін, а також визначення гормонів, ферментів, лікарських препаратів, інших біологічно активних речовин, що містяться в досліджуваному матеріалі в мінорних концентраціях 10^{-10} — 10^{-12} г/л.

Радіоімунологічний аналіз (РІА) — високочутливий метод, заснований на реакції $Ang + Ant$ з застосуванням антигенів чи антитіл, мічених радіонуклідом (^{125}I , ^{14}C , 3H , ^{51}Cr та ін). Після їх взаємодії відокремлюють радіоактивний імунний комплекс, що утворився, і визначають його радіоактивність у відповідному лічильнику (β чи γ -випромінювання): інтенсивність випромінювання прямопропорційна кількості молекул антитіл чи антигенів, що зв'язалися. Показання до застосування ті ж, що і в ІФА. Метод представляє певну екологічну небезпеку.

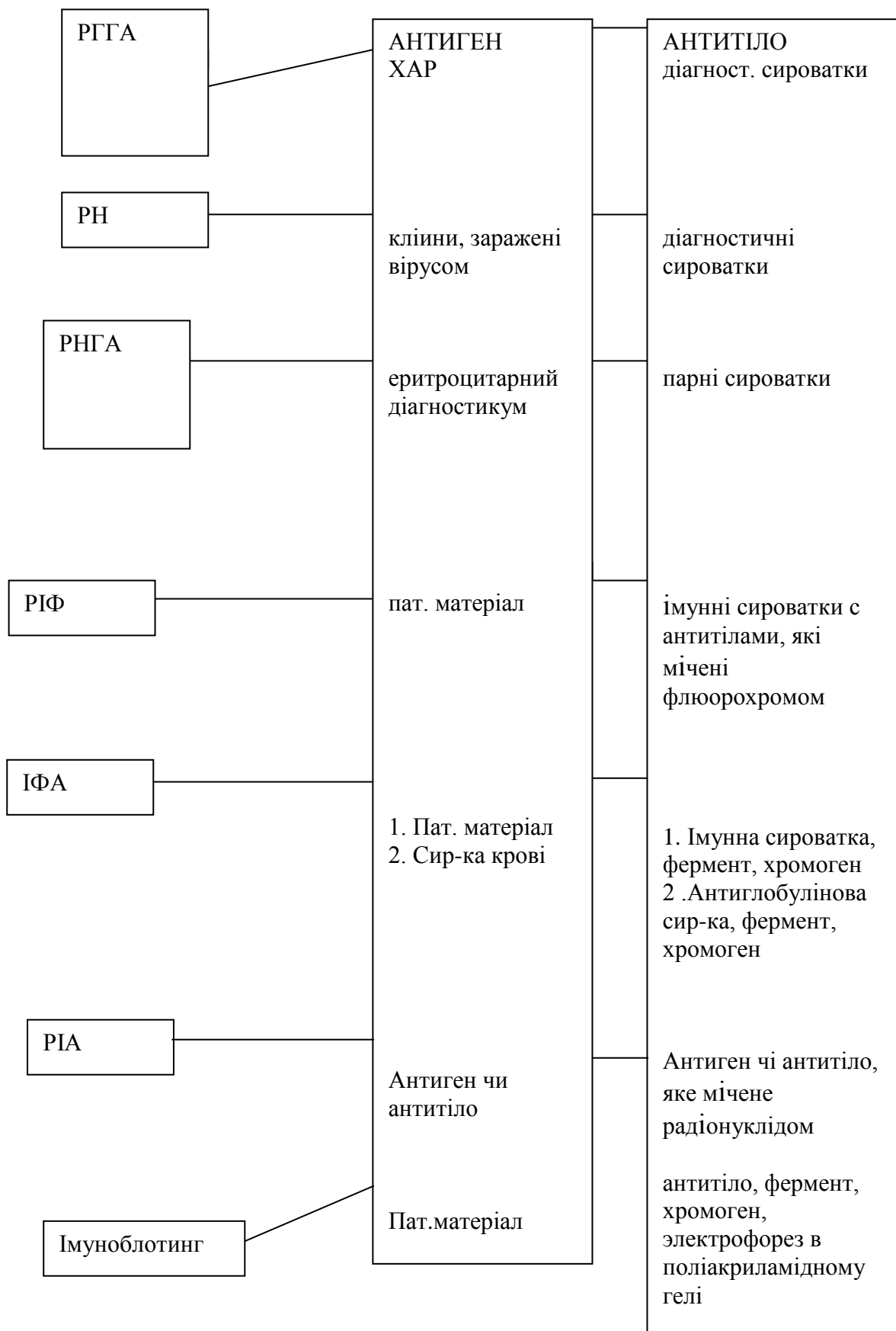
Імуноблотінг — високочутливий метод, заснований на сполученні електрофорезу і ІФА чи РІА. Антиген виділяють за допомогою електрофорезу в поліакріламідному гелі, потім переносять його з гелю (блот — пляма) на активований папір чи нітроцелюлозну мембрану і виявляють за допомогою ІФА. Імуноблотінг використовують як діагностичний метод при ВІЛ-інфекціях та ін.

У протоколі схематично зобразити механізм РІА та ІФА, підписати назви реагентів, вказати тип патологічного матеріалу.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. За допомогою яких імунних реакцій проводять серодіагностику вірусних інфекцій?
2. В якому випадку в поліакріламідному гелі при електрофорезі може виникнути блот?
3. Який патологічний матеріал можна використовувати для РІФ ?
4. У хворого на гостру вірусну повітряно-крапельну інфекцію взяли змив з носоглотки. Які методи можна застосувати для виявлення вірусу? Який патологічний матеріал використовують для виявлення серотипу вірусу?

Графологічна структура теми:
“Серологічні реакції в вірусології”



Зразок протоколу до практичного заняття № 17

Серологічні реакції в вірусології

Завдання 1 : Ідентифікація вірусу грипу в РГГА (демонстрація)

| Діагностичні сироватки | Розведення сироваток | | | | | |
|------------------------|----------------------|------|------|-------|-------|----------|
| | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | Контроль |
| Сироватки типу А | | | | | | |
| Сироватки типу В | | | | | | |

Висновок: Виділений вірус відноситься до типу _____, тому що РГГА відбулася із сироваткою типу _____

Завдання 2. Ідентифікація ентеровірусу в реакції нейтралізації на культурі клітин (демонстрація).

| Стандартні діагностичні сироватки | Група поліомієліта | Група Коксаки | Група ЕСНО | Контроль |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|------------|----------|
| Облік реакції | | | | |

(+) - ЦПД

(-) - відсутність ЦПД

Висновок: реакція нейтралізації вірусу відбулася із сироваткою групи _____ отже _____

Завдання 3. Серодіагностика кору в РНГА.

| Сироватки | Розведення | | | | | | | Контроль антигена |
|------------|------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------------------|
| | 1: 10 | 1: 20 | 1: 40 | 1: 80 | 1 :160 | 1: 320 | 1: 640 | |
| НИЧ | | | | | | | | |
| Спочатку | | | | | | | | |
| Наприкінці | | | | | | | | |

++++ - повна гемаглютинація ("парасолька")

+++ - чітка гемаглютинація

++ - часткова гемаглютинація

+ - слабовиражена гемаглютинація

(-) - відсутність гемаглютинації ("гудзечок")

Висновок: _____

Завдання 4. Принципи сучасних методів діагностики вірусних інфекцій (РІФ, РІА, ІФА).

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.18

ТЕМА: ОРТОМІКСОВІРУСИ. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГРИПУ. ПАРАМІКСОВІРУСИ. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КОРУ.

Актуальність теми. Захворювання, які спричиняються вірусами, складають більш ніж 80% усіх інфекційних захворювань людини.

До вірусів, що містять РНК, відноситься більшість патогенних для людини вірусів. На теперішній час відомо 13 патогенних для людини сімейства РНК-геномних вірусів, зокрема , сюди входять сімейства Paramyxoviridae и Orthomyxoviridae.

Найбільше значення в патології людини мають віруси грипу (сімейство Orthomyxoviridae), які спроможні в короткий проміжок часу заражати мільйони людей та швидко розповсюджуватись на великі території, такою ж спроможністю володіє вірус кору (сімейство Paramyxoviridae, род Morbillivirus), котрий спричинює гостре інфекційне захворювання, частіше у дітей. При цьому сприйнятливість до вірусу кору складає 95-96 %.

Тому своєчасне виявлення збудника та виявлення специфічних змін у сироватці крові хворого сприяє швидшому одужанню хворого та профілактиці розповсюдження інфекції.

Мета (загальна): уміти виявити збудників грипу та кору в патологічному матеріалі та виявити специфічні зміни в сироватці крові хворого.

Конкретні цілі – уміти:

1. Характеризувати біологічні та патогенні властивості орто- та параміксовірусів.
2. Пояснювати роль антигенної мінливості вірусу грипу у епідемічному процесі.
3. Визначати придатні методи діагностики грипу у різні строки захворювання.
4. Проводити серологічну діагностику кору.
5. Відбирати препарати для специфічної профілактики та для діагностики грипу та кору.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Готувати кратні розведення біологічних рідин, визначати їхню концентрацію у отриманих розведеннях (кафедра біохімії).
2. Пояснювати морфологічні та функціональні властивості лімфоїдних тканин, розпізнавати мікропрепарати (кафедра гістології).
3. Пояснювати використання парних сироваток.
4. Провести зараження курячого ембріону патологічним матеріалом.
5. Провести постановку реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) та врахування її результатів.
6. Провести постановку реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) та врахування її результатів.

Для того, щоб ви могли усвідомити чи відповідає вихідний рівень ваших знань, умінь необхідним вимогам, пропонуємо виконати ряд завдань :

Завдання № 1. Титром антитіл у сироватці називають: а) найбільше розведення сироватки, що дає позитивну реакцію; б) найменше розведення сироватки, що дає негативну реакцію; в) об'єм сироватки, що реагує з певною кількістю антигену; г) вміст Ig G у сироватці.

Завдання № 2. Підтвердження клінічного діагнозу при грипі та кору нерідко отримують через дослідження парних сироваток. Яким повинен бути проміжок часу між взяттям цих сироваток? а) 2 години; б) 2 дні; в) 10 днів; г) 30 днів; д) 2 місяці.

Завдання № 3. Які зміни можуть утворюватися у курячому ембріоні у разі його зараження вірусовмісним матеріалом? а) загибель ембріону; б) помутніння хоріон-алантоїсної рідини; в) руйнація кровоносних судин хоріон-алантоїсної оболонки; г) мацерація тканин ембріону; д) утворення симпластів.

Завдання № 4. Для виявлення яких вірусів придатна РГА: а) РНК-вмісних; б) складних; в) ДНК- вмісних; г) таких, що на поверхні містять гемаглютенин; д) таких, що на поверхні містять гемолізину.

Завдання № 5. Для серологічної діагностики кору використовується РПГА. Як виглядає позитивна реакція? а) осад еритроцитів у вигляді «гудзичка»; б) осад еритроцитів у вигляді «парасольки»; в) гемоліз еритроцитів; г) затримка гемолізу.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

- 1.Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 2005. - С.30-45, 328-337.
- 3.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с. 239-260.
- 4.Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.- 2002.- С.42-75.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності.

1. Загальна характеристика ортоміксовірусів і параміксовірусів. Відмінності морфології і культивування.
2. Сімейство ортоміксовірусів. Загальні властивості, класифікація за антигенними властивостями. Сучасні позначення штамів вірусу грипу. Відмінності А, В, С типів збудника грипу.
3. Вірус грипу А. Побудова вірусної частки. Причина пандемій грипу.
4. Патогенез захворювання. Специфічна профілактика і лікування грипу.
5. Лабораторна діагностика грипу.
6. Профілактика грипу.
7. Кір. Властивості вірусу кору.
8. Етіологія, епідеміологія, патогенез захворювання на кір.

9. Лабораторна діагностика, профілактика кору.
10. Інші параміксовіруси (парагрипу, паротиту, RSV).

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б, Смирнова А.М. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология». М.: «Медицина», 2001. - С. 534-542.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии под редакцией Л.Б. Борисова. - М.: Медицина, 1984. – С. 231-239.
3. «Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии» под редакцией академика РАМН О.В. Бухарина.- М.: «Медицина», 2002. – С. 263-275.
4. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология» под редакцией А.А. Воробьёва. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – С. 560-569.
5. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. «Мікробіологія, вірусологія, імунологія». Тернопіль, «Укрмедкнига», 1998. С. 354-358.
6. Люта В.А., Кононов О.В. «Мікробіологія». К.: «Медицина», 2008. С. 359-374.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: «Ортоміксовіруси та параміксовіруси. Лабораторна діагностика грипу та кору» (додаток 1, 2).

Матеріали та обладнання: ХАР, суміш еритроцитів людини, діагностичні грипозні сироватки, коровий еритроцитарний діагностикум, планшети з лунками або пробірки, шприці, піпетки, нормальний імуноглобулін людини, культура клітин. Таблиці: „Мікробіологічна діагностика ГРЗ”, „Мікробіологічна діагностика грипу” «Реакція гемаглютинації», «Реакція гальмування гемаглютинації», «Реакція пасивної гемаглютинації», «Реакція зв'язування комплементу», «Схема зараження курячого ембріону»;

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи

1. Вірусологічна діагностика грипу:

а) В стерильних умовах зробити розтин курячого ембріону, який був заздалегідь інфікований патологічним матеріалом, взятим від хворого на грип.

Відбирають хоріоналантоїсну рідину (ХАР) спеціальною піпеткою або шприцем, готують десятикратне розведення ХАР, змішуючи 0,1 мл відібраної рідини з 0,9 мл розчину антибіотику. Далі в лунках планшету готують ряд двохкратних розведень від 1: 20 до 1: 640. В кожен лунку планшету внести по 0,2 мл суміші еритроцитів. Облік реакції провести через 1 годину, результат відмітити в протоколі. Зробити висновок про наявність гемаглютинуючого вірусу в ХАР та визначити титр вірусу.

б) Провести постановку реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з діагностичними грипозними сироватками в розведеннях від 1: 10 до 1: 160. В лунки планшету внести по 0,2

мл розведеної сироватки та 0,2 мл ХАР, взятої в робочій дозі (4 АО). Через 30 хв. додати в усі лунки по 0,2 мл суміші еритроцитів. Провести облік результатів реакції через 60 хв. Визначити титр вірусу.

в) Користуючись таблицями вивчити інші методи діагностики грипу.

2. Провести серологічну діагностику кору.

Для цього необхідно поставити реакцію пасивної гемаглютинації (РПГА) з парними сироватками. Парні сироватки розводяться нормальною 1% сироваткою кролика в співвідношенні 1: 10, а потім двохкратно до 1: 640. У якості контролю використовується нормальний імуноглобулін людини (НІЛ), котрий розбавляється так само, як і досліджувана сироватка. В лунки планшету внести по 0,05 мл досліджуваної сироватки, взятої від хворого на початку захворювання (1 ряд), а також наприкінці захворювання (2 ряд), НІЛ (3 ряд). В кожен лунку додати по 0,025 мл еритроцитарного корового діагностичного. Провести облік

результатів реакції, відмітити в протоколі.

3. Вивчити імунобіологічні препарати за темою, визначити серед них лікувальні, профілактичні та діагностичні. Занести до протоколу по 2-3 назви препаратів кожної групи.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями та ходом проведення експерименту пропонується виконати наступні навчаючі завдання:

1. Курячі ембріони були інфіковані досліджуваним матеріалом в алантоїсному порожнині. Після 72 годин інкубації в термостаті ембріони були життєздатні, при розтині змін зародкових оболонок не спостерігалось. Чи можна на підставі цих даних зробити висновок про відсутність вірусу в патологічному матеріалі?

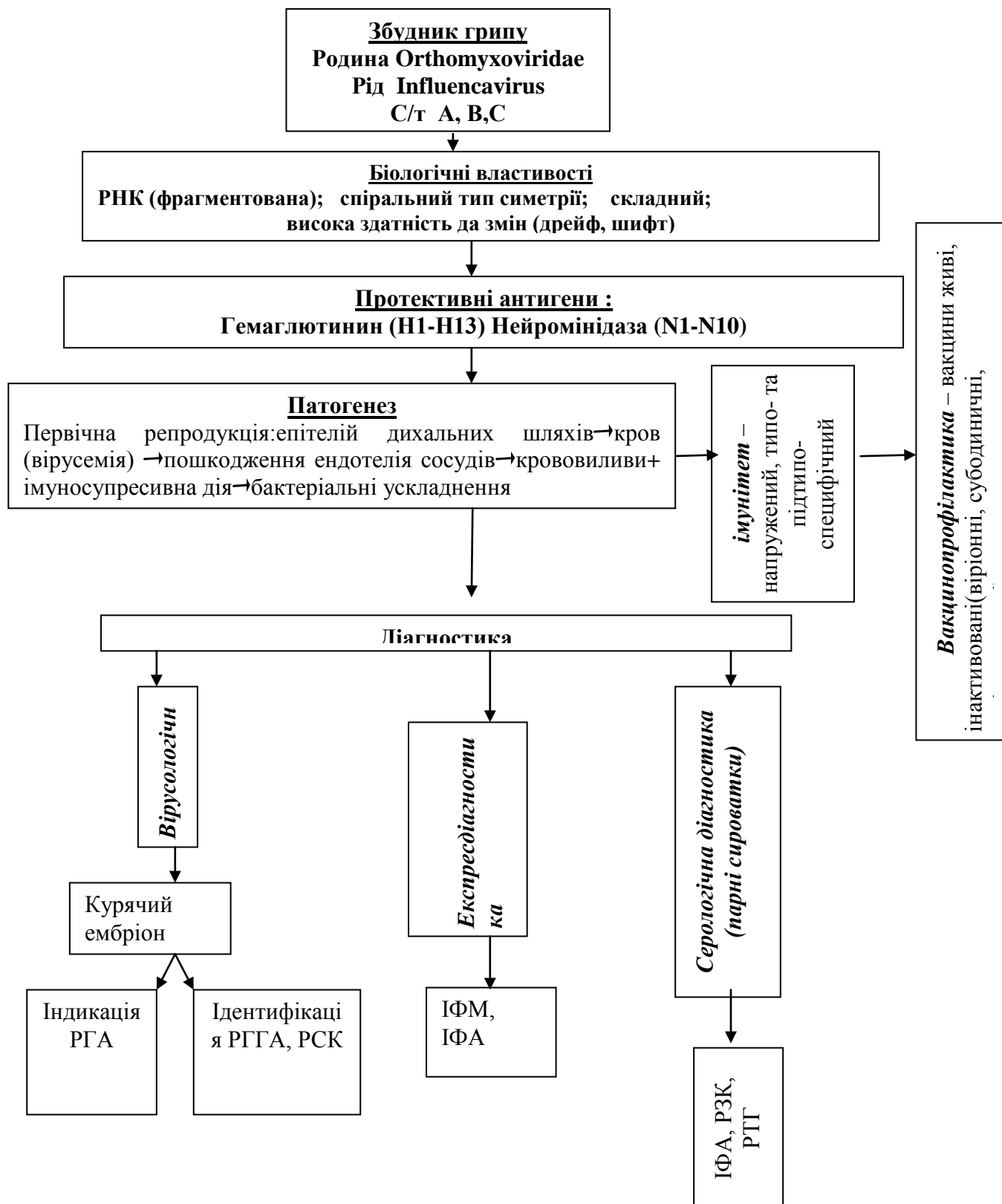
2. Титр антитіл проти вірусу кору в сироватці хворого був однаковим на початку та в кінці захворювання. Чи підтверджують ці дані серологічного дослідження клінічний діагноз «кір»?

3. В приймальне відділення клініки поступила дитина з тяжкою формою ГРЗ. Який лабораторний метод діагностики вірусних інфекцій може бути використаний для швидкого встановлення етіології захворювання?

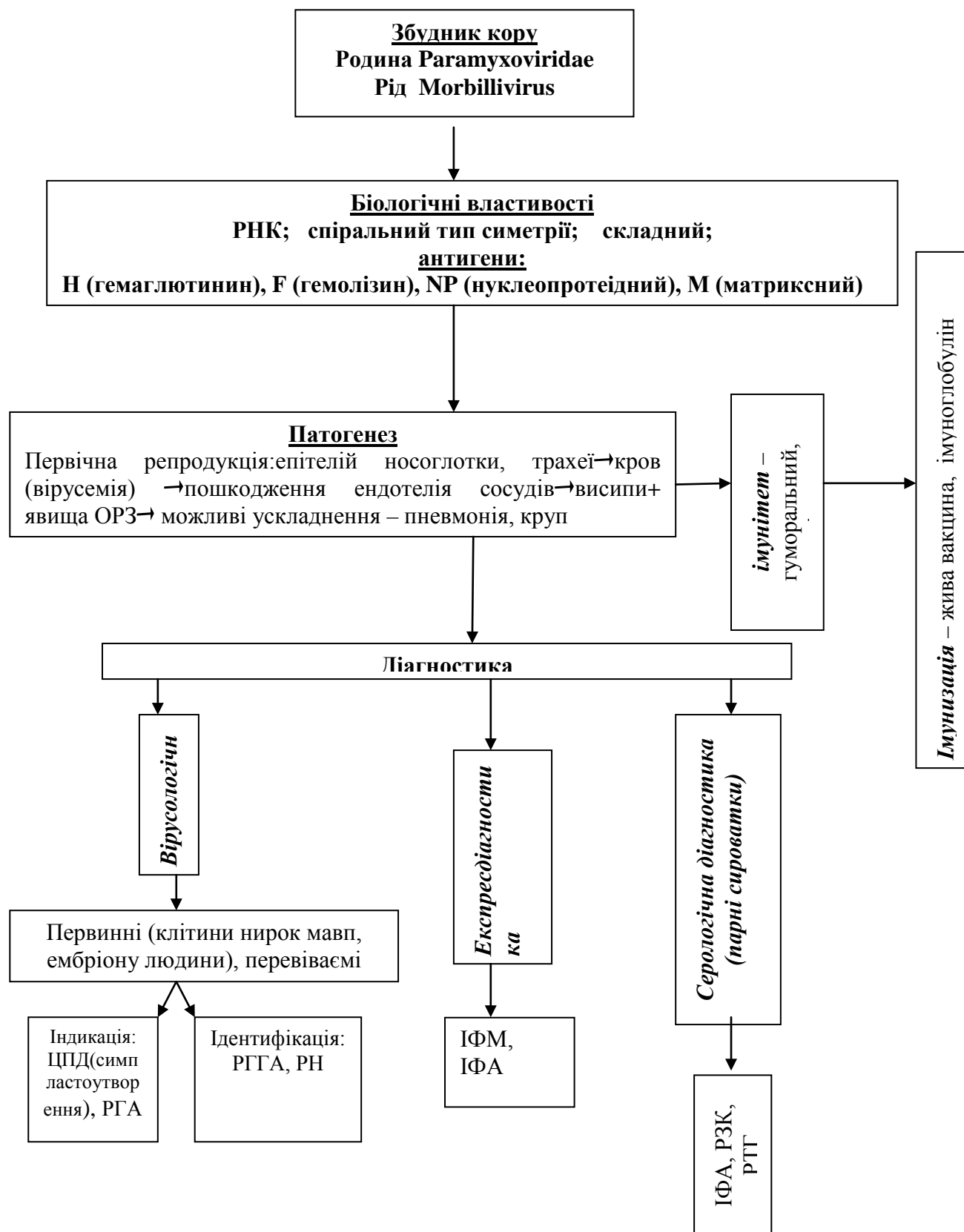
4. В області, особливо в осінній період очікується підвищення захворювання на грип.

Які препарати необхідно використовувати для проведення профілактичних заходів з метою зниження захворюваності? Яка тактика лікаря у відношенні дітей та груп населення «підвищеного ризику»?

**Графологічна структура теми :
„Ортоміксовіруси. Мікробіологічна діагностика грипу”**



Графологічна структура теми : „Параміксовіруси. Мікробіологічна діагностика кору”



Зразок протоколу до практичного заняття №1.18

1. Вірусологічна діагностика грипу:

а) виділення вірусу
патологічний матеріал _____
біологічний об'єкт _____
спосіб зараження _____
зміни, що спостерігаються _____

Індикація вірусу в РГА

| | | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Разведення ХАР | 1: 20 | 1: 40 | 1: 80 | 1: 160 | 1: 320 | 1: 640 |
| Облік РГА | | | | | | |

«+» – осад еритроцитів у вигляді «парасольки», «-» – у вигляді «гудзика»

Висновок: виявлено гемаглютинуючий вірус у титрі _____
Робоча доза _____

б) ідентифікація вірусу грипу в РГГА

| Діагностичні сироватки | Разведення сироваток | | | | | Контроль | |
|---|----------------------|-------|-------|-------|--------|-----------|--------|
| | 1: 10 | 1: 20 | 1: 40 | 1: 80 | 1: 160 | сироватки | вірусу |
| H ₀ N ₁ (A ₁) | | | | | | | |
| H ₁ N ₁ (A ₁) | | | | | | | |
| H ₂ N ₂ (A ₂) | | | | | | | |

Висновок: виділений вірус є вірусом грипу типу _____
бо РГГА позитивна з сироваткою типу _____

в) Інші методи діагностики грипу:

Експрес-метод:

терміни використання _____
патологічний матеріал _____
необхідні реактиви та обладнання _____

Серологічна діагностика грипу:

терміни використання _____
патологічний матеріал _____
необхідні реактиви _____

2. Серологічна діагностика кору в РНГА

| Сироватки | Разведення | | | | | | | Контроль антигену |
|-------------------------|------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------------------|
| | 1: 10 | 1: 20 | 1: 40 | 1: 80 | 1: 160 | 1: 320 | 1: 640 | |
| НІЛ | | | | | | | | |
| на початку захворювання | | | | | | | | |
| наприкінці захворювання | | | | | | | | |

«+» – осад еритроцитів у вигляді «парасольки», «-» – у вигляді «гудзика»

Висновок: _____

3. Імунобіологічні препарати за темою:

лікувальні _____
профілактичні _____
діагностичні _____

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.19
ТЕМА: АДЕНОВІРУСНА І ГЕРПЕСВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ.
МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА АДЕНО-
І ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ.

Актуальність теми: *Герпесвіруси* є структурно-однорідною групою порівняно великих вірусів, патогенних для людини і тварин; патогенні для людини представники сімейства *Herpesviridae* входять до складу підродин *Alphaherpesviruses* (ВПГ 1 і 2, вірус *varicella-zoster*), *Betaherpes* (ЦМВ) і *Gammaherpesviruses* (вірус Епштейна-Барр). До складу сімейства також включений некласифікований вірус герпесу 6. Серед них найбільш відомий ВПГ, що викликає ураження практично у кожної людини. Значна частина герпесвірусів здатна викликати гострі і латентні інфекції, а також володіє певним онкогенним потенціалом і викликає розвиток хвороб злоякісного зростання у тварин (наприклад, хвороба Марека у курчат), а також епідеміологічно пов'язана з утворенням деяких пухлин в людини.

Аденовіруси- основна група вірусів, які можна виділити з тканин лімфоглоточного кільця Пірогова-Вольдейера і випорожнень практично здорової людини. Сімейство *Adenoviridae* включає 2 роди – *Mastadenovirus* (віруси ссавців) і *Aviadenovirus* (віруси птахів); до складу першого входить близько 80 видів (сероварів), другого-14. Аденовірусні інфекції людини досить поширені і складають 5-10% всіх вірусних патологій, велика частина доводиться на дитячий вік.

Дані інфекції, поки що не контролюються специфічними засобами (вакцинами), тому лабораторна діагностика необхідна для своєчасного, правильного лікування і запобігання ускладненням.

Мета: уміти проводити вірусологічну і серологічну діагностику адено- і герпесвірусних інфекцій. Вибирати препарати для специфічної профілактики.

Конкретні цілі - уміти:

- 1) Пояснювати систематичне положення герпес і аденовірусів.
- 2) Характеризувати особливості клініки і патогенезу інфекцій, що викликаються герпес і аденовірусами.
- 3) Вибирати найбільш оптимальні методи діагностики інфекцій, що викликаються герпес і аденовірусами.
- 4) Тракувати принципи найбільш вживаних методів діагностики вірусних інфекцій (вірусологічний, серологічний, ПЛР).

Базовий рівень знань-умінь

- 1) Тракувати будову і основні властивості вірусів і їх молекулярно-генетичну організацію.
- 2) Пояснювати методи культивування і ідентифікації вірусів.
- 3) Пояснювати різні типи взаємодії вірусу з кліткою.
- 4) Враховувати і інтерпретувати результати РПГА, РЗК.

Для того, щоб Ви могли з'ясувати, чи відповідає базовий рівень Ваших знань необхідному, пропонується виконати ряд завдань:

- 1) Назвіть основні властивості вірусів, за якими вони відрізняються від всіх інших живих істот.
- 2) Назвіть типів симетрії вірусів.
- 3) Які субстрати використовуються для культивування вірусів.
- 4) Етапи взаємодії вірусу з кліткою.
- 5) Як виглядає позитивна і негативна РЗК, РПГА.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

- 1) Мед. Микробиология, иммунология и вирусология / под ред. А.И.Коротяева: С-П. Спец. Лит-ра 1998, с. 239-263.
- 2) Мед. Микробиология/ под ред. В.И.Покровского: Москва, ГЭОТАР медицина 1998, с.659-765.
- 3) Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. - Г.: Медицина, 1994. - С. 364-371.
- 4) Лекція «Загальна вірусологія».

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

- 1) Загальна характеристика вірусів простого герпесу, вітряної віспи, ЦМВ, вірусу Епштейна-Барр.
- 2) Патогенез і клініка захворювань, що викликаються вірусами простого герпесу, вітряної віспи, ЦМВ, вірусом Епштейна-Барр.
- 3) Лабораторна діагностика захворювань, викликаних вірусами простого герпесу, вітряної віспи, ЦМВ, вірусом Епштейна-Барр.
- 4) Лікування і специфічна профілактика захворювань, що викликаються вірусами простого герпесу, вітряної віспи, ЦМВ, вірусом Епштейна-Барр.
- 5) Загальна характеристика аденовірусів.
- 6) Патогенез і клініка захворювань, що викликаються аденовірусами.
- 7) Лабораторна діагностика захворювань, що викликаються аденовірусами.
- 8) Лікування і специфічна профілактика захворювань, що викликаються аденовірусами.

Література, для засвоєння знань-умінь:

- 1) Мед. Микробиология, иммунология и вирусология / под ред. А.И.Коротяева: С-П. Спец. Лит-ра 1998, с. 239-263.
- 2) Мед. Микробиология/ под ред. В.И.Покровского: Москва, ГЭОТАР медицина 1998, с.659-765.

- 3) Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. - Г.: Медицина, 1994. - С. 364-371
- 4) Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Под ред. Л. Б. Борисова. Г.: Медицина, 1984. - С. 217, 224-229.
- 5) Лекція за темою «ДНК-геномні віруси».

Орієнтовна основа дій при виконанні практичних завдань:

1) **Експрес-діагностика аденовірусної інфекції:** Експрес діагностика аденовірусної інфекції методом імунофлюоресценції (ІФ). Принцип методу полягає у взаємодії антигена і антитіла, що міститься флюорохромом. Матеріалом для дослідження служать мазки із слизової оболонки. Сухий препарат флуоресціюючого імуноглобуліну розводять в 1 мл дистильованої води, потім готують робоче розведення в 0,15 м розчині натрію хлориду. Краплю робочого флуоресціюючого розчину імуноглобуліну наносять на зафіксований матеріал і інкубують у вологій камері 30 мин. Забарвлений препарат ополіскують дистильованою водою, 2 рази промивають у фосфатно-сольовому буфері рН 7,2-7,5. Після висушування препарат покривають покривним склом і наносять не флуоресціююче імерсійне масло. На підставі побаченого в мікроскоп зробити висновок про виявлення антигенів аденовірусу.

2) **Серологічна діагностика аденовірусної інфекції в РЗК:** Провести серологічну діагностику аденовірусної інфекції, врахувати результати РЗК. Для дослідження беруть розведення парних сироваток від 1:8 до 1:128, які в об'ємі 0,1 мл вносять до лунок планшета і додають до них по 0,1 мл антигену і комплементу. Ставлять також контролю досліджуваних сироваток, антигену, нормальної кролячої сироватки, антигену з імунною сироваткою для перевірки специфічності реакції. Планшети збовтують і залишають на 18 ч. при 40С, потім витримують при 18-20°С впродовж 30 мин. і після додавання гемолітичної системи ставлять в термостат на 15-30 мин. При порівнянні показників вмісту антитіл в сироватці на початку і в кінці захворювання діагностично значущим вважається не менше ніж чотирикратне збільшення титру антитіл. Відзначити титр сироватки на початку і в кінці захворювання, зробити висновок про підтвердження або спростування попереднього клінічного діагнозу.

3) **Лабораторна діагностика вірусу простого герпесу**

а) Мікроскопічний метод. Відзначити в протоколі який матеріал використовується для виділення вірусу простого герпесу. Мікроскопія мазків, забарвлених по Романовському-Гимзе з метою виявити наявність гігантських багатоядерних клітин (проба Цанка). Відзначити результат в протоколі.

б) Вірусологічна діагностика простого герпесу. Ознайомитися з принципом вірусологічного методу діагностики на прикладі методу бляшок (негативних колоній). Метод дозволяє отримувати кількісне визначення вірусів. Моношар клітин заражають матеріалом, що містить вірус і покривають шаром агару, що

містить індикатор нейтральний червоний. Флакони інкубують при $t = 37$. Через 48-96 годин виявляються плями-бляшки, вони мають діаметр 1-3 мм і виглядають незабарвленими на рожевому фоні. Плями виникають за рахунок цитопатичної дії. Відзначити результати в протокол.

в) Серологічна діагностика простого герпесу. Поставити і врахувати реакцію гемаглютінації з матеріалом від хворого для індикації вірусів герпесу. РПГА ставлять в спеціальних пластинках з ямочками. При використанні її для серодіагностики в цих ямочках готують двократні розведення у фізіологічному розчині досліджуваної сироватки, і потім додають до неї в якості діагностичного суспензію сенсibiliзованих еритроцитів. Облік результатів проводять через 2 години за чотирьох хресній системі. При позитивній реакції еритроцити, що аглютинують, осідають на дно ямочки і рівномірно покривають його у вигляді перевернутої парасольки. При негативній реакції еритроцити не осідають, рідина стає прозорою, осад виглядає у вигляді маленького диска в центрі ямочки. Титром сироватки вважається останнє її розведення, яке дає ще яскраво виражену гемаглютінацію без значних ознак наявності диска. Результати занести до протоколу.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту Вам пропонується виконати наступні завдання:

- 1) На прийом до лікаря прийшов чоловік 23 р. із скаргами на бульбашкові висипання на шкірі статевих органів, що переходять в ерозії, що гояться без рубців. Висипання супроводжується свербінням. Яке захворювання передбачив лікар і які методи лабораторної діагностики він використає для підтвердження діагнозу?
- 2) У жіночу консультацію звернулася жінка 24 р. на 10 тижні вагітності, скарг не пред'являє. При обстеженні на ЦМВ був отриманий позитивний результат методом ПЛР. Який метод лабораторної діагностики порекомендує лікар для встановлення «давності» інфікування?
- 3) Хворий М. 18 років скаржиться на закладеність носа, біль в горлі, очах, слезотечу, слабкість, $t = 38,5^{\circ}$, збільшення шийних, привушних, підщелепних лімфовузлів. Лікар передбачив аденовірусну інфекцію. З якими захворюваннями лікар повинен провести диференціальну діагностику і які методи дослідження будуть використані для підтвердження діагнозу?

Зразок протоколу до практичного заняття № 19:

1) **Експрес діагностика аденовірусної інфекції методом імунофлюоресценції (ІФ).** Принцип методу полягає у взаємодії антигена і антитіла, що міститься флюорохромом. Матеріалом для дослідження служать мазки із слизової оболонки. При дослідженні в люмінесцентному мікроскопі виявлені в ядрі глибки смарагдово-зеленого кольору і дифузне свічення цитоплазми.

Ваш висновок: антигени аденовірусів в клінічному матеріалі _____

2) **Серологічна діагностика аденовірусної інфекції в РЗК**

| Сироватки | Розведення | | | | | Контроль | | | |
|-------------------------|------------|-------|-------|-------|--------|-----------|----|--------------------|---------------------|
| | 1: 8 | 1: 16 | 1: 32 | 1: 64 | 1: 128 | сироватки | АГ | АГ+норм. сироватка | АГ+іmunна сироватка |
| На початку захворювання | | | | | | | | | |
| В кінці захворювання | | | | | | | | | |

«+» - відсутність гемолізу, «-» - гемоліз

Висновок: _____

3) Діагностика простого герпесу:

Матеріал: _____

а) Мазки по Романовському-Гимзе (на наявність багатоядерних гігантських клітин) _____

б) ЦПД на культурі клітин _____

в) РПГА досліджуваний матеріал _____ Реа
ктиви, що використовуються _____ Об
лік реакції _____

Висновок: _____

Підпис викладача _____

Таблиця № 1

Діагностика ЦМВ інфекції

| Мета досліджування | Метод досліджування | Матеріали для досліджування |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|
| Визначення антитіл класів Ig G, Ig M | ІФА | Сироватка крові |
| Визначення антитіл класів Ig G, Ig M | РІФ | Сироватка крові |
| Визначення антигенів та вірусів | Морфологія, РІФ, культура клітин | Лейкоцити крові, ликвор, слюна, мокрота, сльози, сеча |
| Визначення ДНК ЦМВ | ПЛР | Лейкоцити крові |

Таблиця № 2

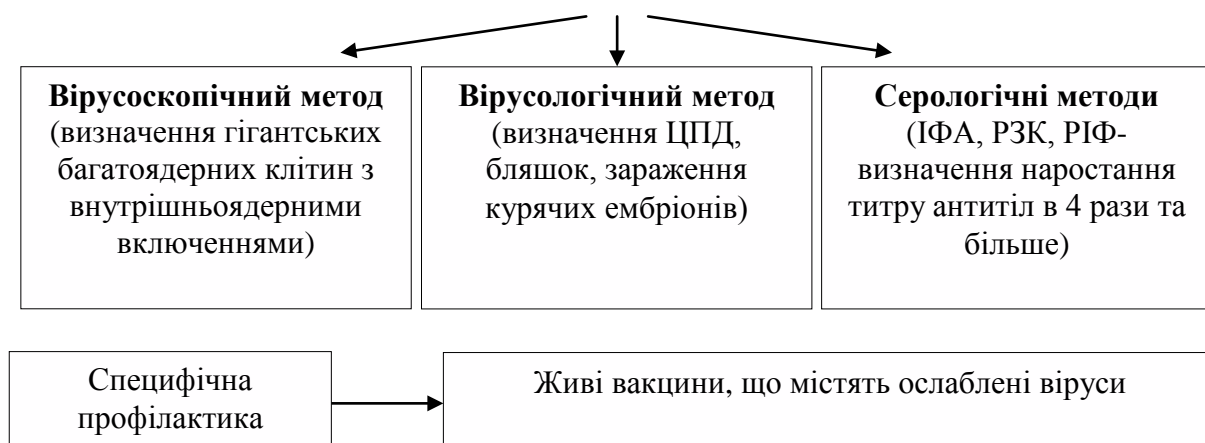
Патогенні для людини герпесвіруси і захворювання, що ними викликаються.

| Тип вірусу | Скорочена назва | Захворювання та клінічні прояви |
|--------------------------------|-----------------|---|
| ВПГ- 1 | HSV-1 | Герпес шкіри, слизових оболонок, офтальмогерпес, пневмонії, гепатит, енцефаліт |
| ВПГ-2 | HSV-2 | Генітальний герпес, енцефаліти у дітей, менінгіти у дорослих, полірадикулонеуропатії, рак шийки матки |
| Вірус герпесу людини 6-(ВГЛ 6) | HHV-6 | Раптова екзантема у новонароджених, енцефаліт, синдром імунної депресії, злоякісні лімфоми |
| ВГЛ-7 | HHV-7 | Екзантема новонароджених, синдром імунної депресії, лімфома мозоку |
| ВГЛ-8 | HHV-8 | Саркома Капоши, лімфоми при ВІЛ-інфекції |

Діагностика та специфічна профілактика аденовірусної інфекції



Діагностика та специфічна профілактика герметичної інфекції



ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.20
ТЕМА: ПІКОРНАВІРУСИ. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА
ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ. РАБДОВІРУСИ.
ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ.

Актуальність теми. Віруси поліомієліту, Коксаки, ЕСНО, ентеровіруси 68-72 типів поширюються по типу кишкових інфекцій і відіграють важливу роль у патології людини, викликаючи ураження центральної нервової системи, опорно-рухового апарату, печінки. Внаслідок масової вакцинації раніше широко розповсюджений вірус поліомієліту, нині перестав бути епідемічним захворюванням. Однак збудник продовжує циркулювати поряд з вакцинним штамом, що може призводити до загострення епідемічної небезпеки. Сказ з давнини викликав у людей страх і закінчувався смертю. Незважаючи на існуючі заходи по профілактиці цього небезпечного захворювання, він залишається актуальним у зв'язку з поширенням безхатніх тварин на вулицях міст. Сучасному лікарю потрібно не тільки вміти відрізнити вірусні захворювання від захворювань, викликаних мікробними збудниками, але правильно призначити лікування та вміти провести профілактику вірусних захворювань.

Мета (загальна) уміти: Вміти проводити вірусологічну діагностику захворювань на поліомієліт, Коксаки, ЕСНО та сказ, а також використовувати необхідні препарати для специфічної профілактики відповідних інфекцій.

Конкретні цілі –уміти:

1. Проводити індикацію ентеровірусів за ЦПД на культурі клітин Hela.
2. Ідентифікувати виявлений ентеровірус в реакції нейтралізації.
3. Аналізувати особливості біологічного методу діагностики при різноманітних ентеровірусних інфекціях.
4. Виявляти вірус сказу за внутрішньоклітинними включеннями.

Вихідний рівень знань - умінь:

1. Аналізувати особливості взаємодії вірусів з живими системами.
2. Пояснювати особливості імунної відповіді при вірусних інфекціях.
3. Трактувати біологічні властивості вірусів як особливої неклітинної форми життя.
4. Описувати відмінності структур вірусної клітини від мікробної.

Для того, щоб Ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань.

Завдання 1. Чим відрізняються прості та складні віруси?

Завдання 2. Які наслідки для клітини має продуктивна вірусна інфекція?

Завдання 3. Як можна виявити ЦПД у культурі заражених клітин?

Завдання 4. Які компоненти необхідні для реакції вірусної нейтралізації?

Завдання 5. Сказ належить до зоонозних інфекцій. Що це означає?

Завдання 6. Ентеровіруси та рабдовіруси є РНК-геномними. Проте, віріон рабдовірусу містить фермент РНК-залежну РНК-полімеразу, а віріон ентеровірусу – ні. Як це можна пояснити?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология под ред.Л.Б.Борисова.-Медицинское информационное агенство.-Москва.-2002.-С.68-90.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред.Л.Б.Борисова, М.: Медицина,1984. С.240-246.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

- 1.Збудники вірусних гастроентеритів.Загальні властивості груп, роль у патології людини.
- 2.Риновіруси – основні збудники вірусних гастроентеритів. Методи вірусологічної діагностики.
- 3.Сімейство пікорнавірусів. Загальні властивості, склад сімейства.
- 4.Рід ентеровірусів. Загальні властивості роду. Види, їхня класифікація, розповсюдження, роль в патології.
- 5.Збудник поліомієліту. Біологічні властивості, серотипи. Епідеміологія та специфічна профілактика.
- 6.Віруси Коксаки та Есно – представники ентеровірусів, їх класифікація, розповсюдження, роль в патології.
7. Клінічні форми захворювань, що викликаються вірусами Коксаки А та В, вірусами ЕСНО, серотипами 70 і 71. Вірусологічна діагностика.
8. Рід афтовірусів. Віруси ящура. Біологічні властивості. Класифікація, патогенез інфекції у людини, специфічна профілактика.
9. Рід кардіовірусів. Загальна характеристика. Роль в патології людини.
10. Рабдовіруси, Загальна характеристика та класифікація.

Література :

1. Медицинская микробиология , вирусология и иммунология Под ред.Л.Б.Борисова, М.:Медицина,2002.с.484-490, 555-558.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред.Л.Б.Борисова, М.: Медицина,1984. С.240-246.

Матеріали та обладнання: Вірусологічні матраси з демонстрацією ЦПД, реакція нейтралізації, таблиці та біопрепарати за темою, мікропрепарати мозку, ураженого вірусом сказу.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Провести індикацію ентеровірусів за ЦПД на культурі клітин HeLa. Розглянути та порівняти мікропрепарати незараженої культури та зараженої патологічним матеріалом від хворих № 1 та №2. Звернути увагу на зміну морфології клітин під дією вірусу. Малюнки занести у протокол, зробити висновок про етіологію захворювання.

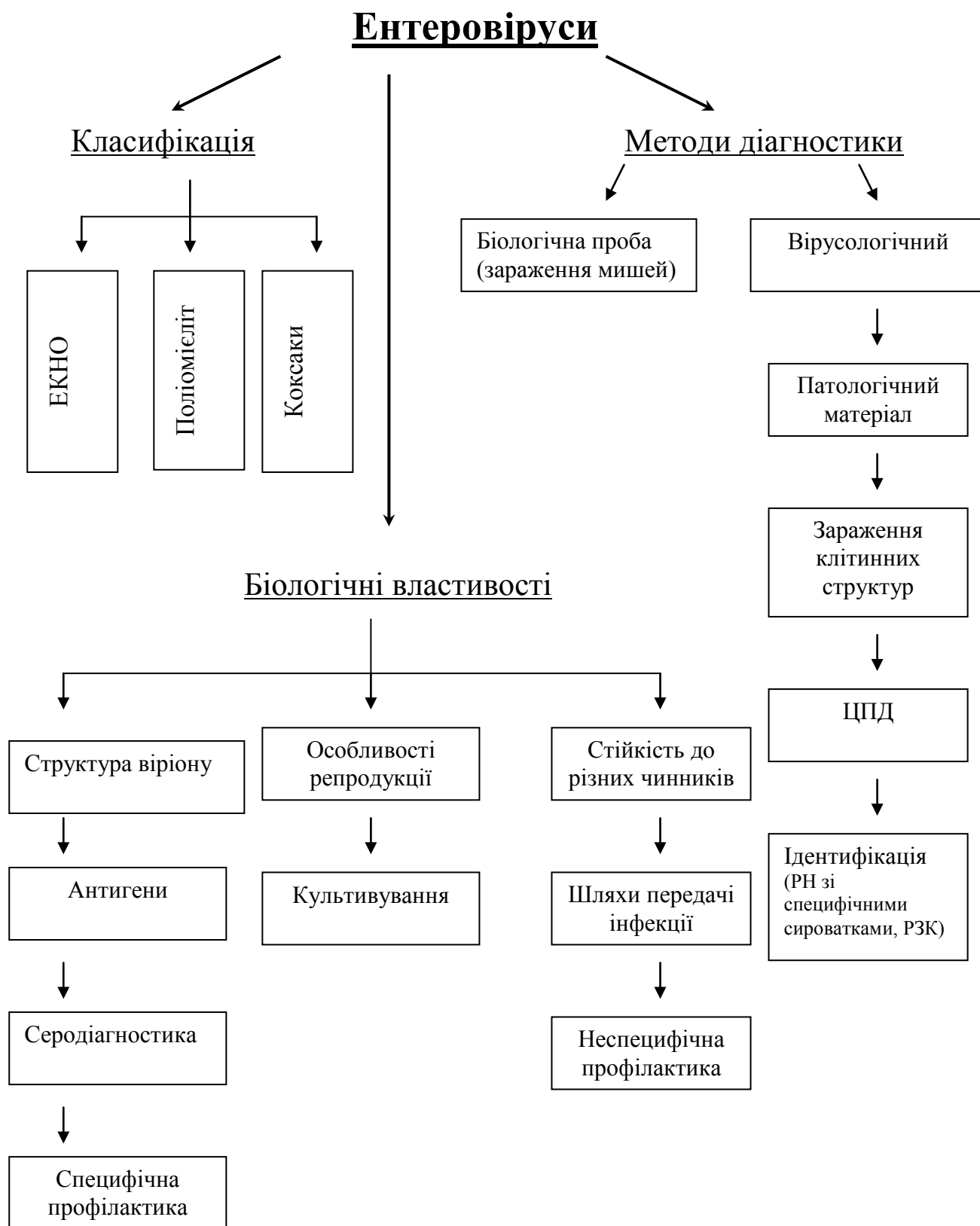
2. Провести індикацію виявленого ентеровірусу у реакції нейтралізації. Для цього у пробірки з культурою клітин ФБЛ (фібробласти людського ембріону) внести матеріал, що містить вірус, змішавши його зі стандартною полівалентною сироваткою проти вірусів групи поліомієліту, Коксаки або ЕСНО. У випадку збігу типу вірусу і сироватки відбувається нейтралізація вірусу і він не викликає ЦПД в культурі клітин. Результати відмітити в протоколі, зробити висновок про видову належність виявленого вірусу.

3. Порівняти особливості біологічного методу діагностики при різноманітних ентеровірусних інфекціях. Результати оформити у вигляді таблиці, внести її в протокол.

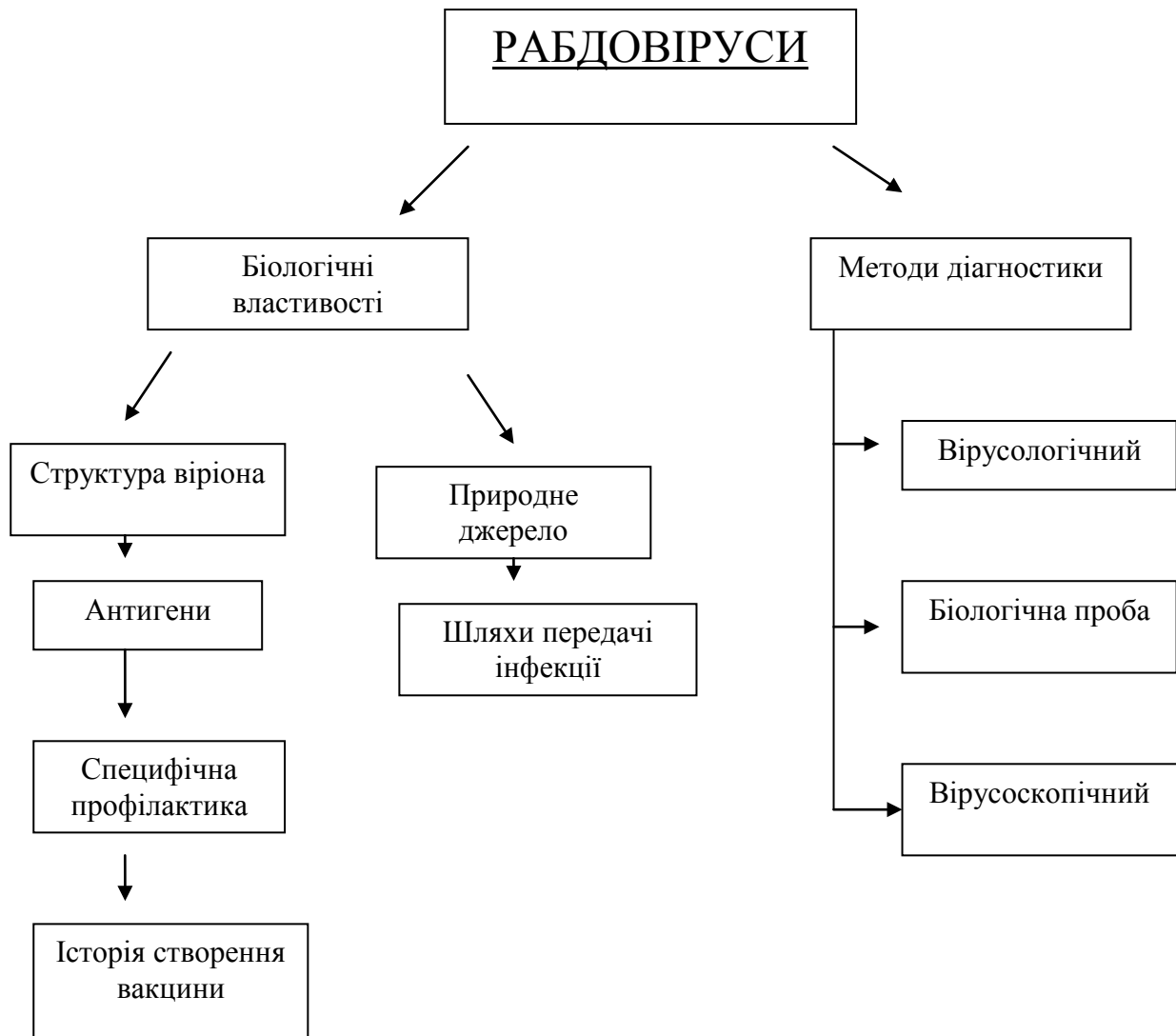
4. З набору бактеріальних препаратів вибрати ті, які використовуються для профілактики ентеровірусних захворювань.

5. Вибирати специфічні препарати для профілактики сказу та за допомогою мікропрепарату та таблиці замальовати внутрішньоклітинні включення (тільця Бабеша-Негрі).

**Графологічна структура теми «Пікорнавіруси.
Лабораторна діагностика ентеровірусних інфекцій. Рабдовіруси.
Лабораторна діагностика сказу». Ч.1.**



Графологічна структура теми «Пікорнавіруси. Лабораторна діагностика ентеровірусних інфекцій. Рабдовіруси. Лабораторна діагностика сказу. Ч.2.



**Зразок протоколу
до практичного заняття №1.20**

Завдання 1. Індикація ентеровірусу за ЦПД.

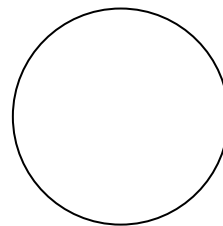
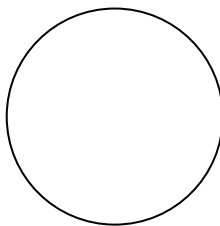
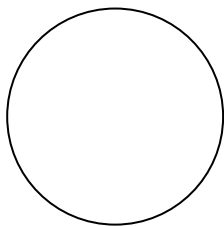


Рис.1. Незаражена
культура
клітин(контроль)

Рис.2. Культура клітин, заражена
пат. матеріалом від хворого №1

Рис.3. Культура клітин, заражена
пат. матеріалом від хворого №2

Висновок: _____

Завдання 2. Ідентифікація ентеровірусу в реакції нейтралізації (РН).

| Стандартні полівалентні сироватки | Група поліомієліту | Група Коксаки | Група ЕЧНО | Контроль |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|------------|----------|
| Врахування реакції | | | | |

„+” – ЦПД, „-” - відсутність ЦПД

Висновок: _____

Завдання 3. Біологічний метод діагностики ентеровірусних інфекцій.

| Віруси | поліомієліт | Коксаки | ЕЧНО |
|---------------------|-------------|---------|------|
| Пат. матеріал | | | |
| Лабораторні тварини | | | |
| Метод зараження | | | |
| Результати | | | |

Завдання 4. Препарати для специфічної профілактики ентеровірусних інфекцій.

Завдання 5. Мікроскопічна діагностика сказу.

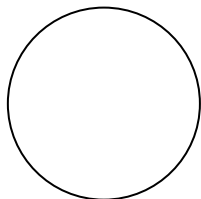


Рис. 4 Внутрішньоклітинні включення (тільця Бабеша - Негрі)

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.21
ТЕМА: ВІРУСИ ГЕПАТИТІВ. МІКРОБІОЛОГІЧНА
ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ГЕПАТИТІВ

Актуальність теми. Вірусні гепатити представляють собою групу, яка включає кілька самостійних нозологічних форм. Кожна з них обумовлена вірусом, притаманним тільки їй. Добре вивчені два віруси, відмінні за біологічними властивостями, які є етіологічними чинниками двох форм вірусних гепатитів – А та В, які характеризуються суттєвими клініко-епідеміологічними особливостями. Гепатит А розповсюджується як кишкова інфекція і може викликати епідемії. Вірус гепатиту В, що призводить в багатьох випадках до злоякісного переродження печінки, передається парентеральним шляхом. Враховуючи високу стійкість вірусу, слід дотримуватися необхідних мір асептики і антисептики при хірургічних втручаннях, переливанні крові та інших медичних маніпуляціях.

Виділено також групу вірусних гепатитів, що за клінічною картиною подібні до гепатитів А та В, але викликаються іншими вірусами: HCV та HGV передаються як HBV, часто переходять у хронічну форму, викликають карциному печінки; HEV передається фекально-оральним шляхом, викликає тяжкі форми гепатиту у вагітних.

У самостійну нозологічну форму виділено гепатит, пов'язаний з вірусом Дельта. Цей дефектний вірус здатен ускладнювати перебіг гепатиту В і викликати цироз печінки.

Мета (загальна): уміти розрізняти гепатити, викликані різними вірусами, вибирати методи лабораторної діагностики вірусних гепатитів, характеризувати препарати для їх специфічної профілактики.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати систематичне положення вірусів, що є збудниками гепатиту у людини.
2. Обґрунтовувати методи неспецифічної профілактики вірусних гепатитів у зв'язку з біологічними властивостями збудників.
3. Обґрунтовувати вибір методів лабораторної діагностики гепатиту А у різні періоди захворювання у зв'язку з патогенезом.
4. Визначати HBs- антиген у реакції подвійної імунної дифузії. Пояснювати строки та методи виявлення інших серологічних маркерів.
5. Вибирати придатні методи мікробіологічної діагностики для гепатитів С, D, E та G.
6. Характеризувати склад, спосіб отримання та механізм дії імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики вірусних гепатитів.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Описувати різні типи взаємодії вірусу та клітини.

2. Характеризувати потивірусні фактори неспецифічного захисту організму.
3. Пояснювати відмінності утворення антитіл при первинній та вторинній імунній відповіді.
4. Пояснювати сутність РПД, ІФА, РІА, ІЕМ, спосіб врахування результатів.
5. Трактувати механізм ПЛР.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання№ 1. Вірус гепатиту В здатен інтегруватися до геному інфікованої клітини. Виділення вірусів у навколишнє середовище тоді відбувається періодично, при їх активації, що відповідає клінічним проявам захворювання. Нерідко це приводить до пухлинної трансформації клітин. Як називається такий тип взаємодії вірусу з клітиною?

Завдання№ 2. Які антитіла першими утворюються при контакті організму зі збудником і можуть бути показником свіжого зараження та гострого перебігу хвороби? а) IgA, б) IgM, в) IgG, г) IgD, д) IgE.

Завдання№ 3. Що спільного у імунобіологічних препаратів, які використовуються у РІА, ІФА, ІЕМ для виявлення вірусних антигенів.

Завдання№ 4. У серонегативний період для діагностики гепатиту С використовується ПЛР. Що саме виявляється у крові хворого за її допомогою? а) IgM до антигенів вірусу, б) IgG до антигенів вірусу, в) антигени вірусу, г) неструктурні білки вірусу, д) геномна РНК вірусу.

Завдання№ 5. Для профілактики вірусних гепатитів використовують інтерферон. Який механізм дії цього препарату? Чим відрізняються лейкоцитарний та рекомбінантний інтерферони?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична вірологія.- Луганськ, 2002.- С. 78, 115-118.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология.- М.: Медицина, 1998.- С. 55, 154-156, 180-181.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина, 1994. С. 233-235.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Вірус гепатиту А – систематичне положення, структура віріону, біологічні та антигенні властивості.
2. Стійкість у навколишньому середовищі, шляхи передачі. Патогенез і клініка гепатиту А.
4. Вірусологічна, імунологічна і біохімічна діагностика гепатиту А в різні періоди захворювання.

5. Сімейство гепаднавірусів. Загальні властивості. Особливості побудови віріону збудника гепатиту В. Можливості культивування, варіанти взаємодії вірусу з клітиною.
6. Епідеміологія, патогенез і клініка гепатиту В.
7. Серологічні маркери вірусу гепатиту В, їхнє виявлення в різні періоди після зараження.
8. Вірус дельта, його властивості, особливості репродукції. Патогенез і клініка гепатиту D, методи діагностики.
9. Збудники гепатитів С, Е та G. Шляхи зараження, ймовірність ускладнень, методи діагностики.
10. Специфічна та неспецифічна профілактика вірусних гепатитів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. 1.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология/ Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. - М.: Медицина, 2005. - С. 555-564.
2. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична вірологія.- Луганськ, 2002.- С. 188-194, 296-298, 327- 329, 341- 344.
3. П'яткін К. Д., Кривошеїн Ю. С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992. - С. 363-369.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А.Воробьева.- М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008.- С. 525-527, 610-611.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии/ Под ред. О.В.Бухарина.- М.: Медицина, 2002.- С. 303-314.
6. Люта В.А., Кононов О.В. Мікробіологія.- К.: Медицина, 2008.- С. 367-370, 383-389.
6. Фролов А.В., Шевченко Л.Ф., Ширококов В.П. Практическая вирусология.- К.: Здоров'я, 1989.- С. 212-225.
7. 6.Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии/ Под ред. Л. Б. Борисова. - М.: Медицина, 1984. - С. 246-248.
8. Лекція з теми „Віруси гепатитів”.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Віруси гепатитів. Діагностика вірусних гепатитів” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: Демонстрація реакції подвійної імунодифузії, тест-система імуноферментна для діагностики гепатиту В, генно-інженерна вакцина проти гепатиту В, мікрофотографії з результатами ІЕМ. Таблиці: „Діагностика гепатиту А”, „Діагностика гепатиту В”, „Морфологія та структура вірусів”, „Серологічні реакції”, „Типи взаємодії вірусу з клітиною”.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити за таблицею методи діагностики гепатиту А у різні періоди захворювання. Занести до протоколу назви методів і терміни їхнього використання, вказати використовувані реактиви та устаткування.
2. Провести діагностику гепатиту В шляхом виявлення HBs- антигену (австралійський антиген) в сироватці хворого за допомогою реакції подвійної імунної дифузії (РПД). Для постановки реакції готують шар агарового гелю на склі, спеціальним пробійником вирізають в агарі 7 лунок (1 у центрі та 6 по колу) на рівній відстані одна від одної. В центральну лунку внести стандартну сироватку, що містить антитіла до австралійського антигену. В дві діаметрально розташовані лунки внести австралійський антиген для постановки позитивного контролю. Сироватку, також як і антиген, одержують від донора. В інші лунки вносять досліджувані сироватки. Пластинку з агаровим гелем поміщають в вологу камеру і інкубують приблизно дві доби, після цього фарбують гель метиленовим синім. Розглянути готові пластини із демонстрацією РПД, відзначити наявність ліній преципітації там, де відбулося з'єднання HBs- антигену з антитілами до нього. Занести до протоколу схематичний малюнок постановки РПД із пояснювальними позначками. Зробити висновок про наявність антитіл до HBs- антигену у досліджуваних сироватках.
- За таблицею ознайомитися з іншими методами діагностики гепатиту В. Відмітити у протоколі назви методів і терміни їхнього використання.
3. Скласти порівняльну таблицю властивостей вірусів, що викликають гепатит у людини.

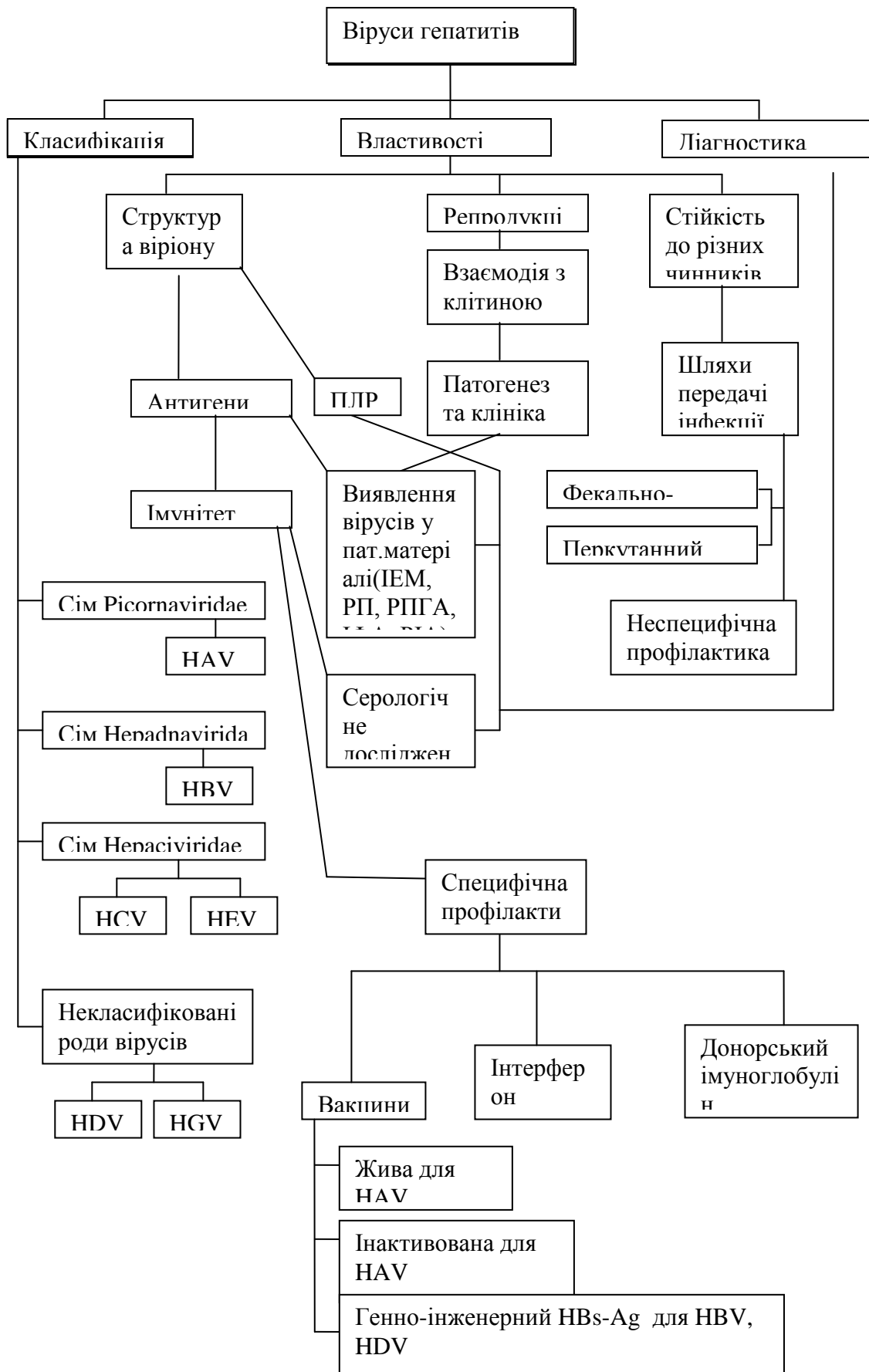
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. Серед учнів середньої школи з'явилися випадки захворювання, що протікає як вірусний гепатит: гострий початок захворювання, короткий переджовтяничний період, поява жовтяничності склер і шкіряних покривів, з початком жовтяничного періоду самопочуття покращувалося. Встановлено, що за 15-45 днів до появи ознак хвороби всі діти, які занедужали, пили з джерела, вода в якому не обеззаражувалася. Медичні маніпуляції, пов'язані з пошкодженням шкіряних покривів в останні місяці перед захворюванням, не проводилися. Яка форма вірусного гепатиту спостерігається у дітей? Яку специфічну профілактику необхідно провести всім, хто контактував із хворими? Які дослідження дозволять уточнити діагноз?

2. Діагностика гепатиту В часто оснований на виявленні HBs- антигену у сироватці хворих. За допомогою якої серологічної реакції це може бути зроблено. Як отримують необхідні реактиви?

3. Після внутрішньовенних ін'єкцій у вагітної жінки розвинувся гепатит, який характеризувався тяжким перебігом і супроводжувався внутрішніми кровотечами. Який саме вірусний гепатит можна запідозрити у хворої. Які методи лабораторної діагностики можна використати для підтвердження діагнозу?

Графологічна структура теми „Віруси гепатитів”



**Зразок протоколу
до практичного заняття №1.21:**

Завдання 1. Методи діагностики гепатиту А.

| Метод | Термін використання |
|-----------------------|---------------------|
| Дослідження фекалій | |
| Дослідження ферментів | |
| Дослідження IgM | |
| Дослідження IgG | |

Завдання 2. Діагностика гепатиту В.

а) виявлення HBs- антигену у досліджуваній сироватці

Умовні позначення:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Рис.1. Реакція подвійної імунної дифузії

Висновок: _____.

б) Використання серологічних маркерів у діагностиці гепатиту В

| Назва маркера | Термін використання |
|---------------|---------------------|
| | |
| | |
| | |

Завдання 3. Властивості збудників вірусних гепатитів

| вірус | Тип НК та наявність суперкапсиду | Антигени | Шляхи зараження | Інкубаційний період | Ускладнення | Методи діагностики |
|-------|----------------------------------|----------|-----------------|---------------------|-------------|--------------------|
| HAV | | | | | | |
| HBV | | | | | | |
| HDV | | | | | | |
| HCV | | | | | | |
| HEV | | | | | | |

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.22

ТЕМА: ЗБУДНИКИ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

Актуальність теми. За прогностичними даними число носіїв вірусу СНІДу складає більш 200 млн. Від СНІДу вже загинули десятки тисяч хворих. Основним чинником широкого розповсюдження вірусу є переливання крові і інші медичні маніпуляції, пов'язані з порушенням цілісності шкіри і слизових оболонок. Природний шлях передачі інфекції - статевий. СНІД - смертельно небезпечне захворювання. Створені міжнародні і національні програми боротьби зі СНІДом, зазнаються перші профілактичні і лікувальні препарати. Необхідна величезна робота з інформації населення стосовно СНІДу, особистої профілактики.

Мета(загальна): враховуючи особливості взаємодії ретровірусів з організмом людини, та беручи до уваги епідеміологічну та клінічну характеристики СНІДу, оволодіти засобами специфічної діагностики ВІЛ-інфекції.

Конкретні цілі – уміти:

1. Описувати біологічні та антигенні властивості ВІЛ, їх зв'язок з патогенезом захворювання.
2. Пояснювати механізми “невидимих” реакцій імунітету, які використовуються для специфічної діагностики ВІЛ – інфекції. Визначати реактиви, що входять до складу тест-системи для визначення антитіл до вірусу СНІДу.
3. Враховувати результати ІФА та імуноблотінгу.
4. Характеризувати сучасні підходи до профілактики та лікування СНІДу.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати морфологічні та функціональні властивості представників клітинної ланки імунітету (кафедра гістології).
2. Описувати механізм біосинтезу нуклеїнових кислот (РНК та ДНК) (кафедра біохімії).
3. Пояснювати стратегію вірусних геномів (наявність шляхів транскрипції, трансляції та реплікації) (кафедра мікробіології, вірусології та імунології).
4. Знати механізми генетичних взаємодій (кафедра біології).
5. Відрізняти опортуністичні інфекції від інших форм інфекційного процесу.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

1. Назвіть основний компонент білок-синтезуючої системи?
2. Дати пояснення процесу «сплайсінг». У чому полягає його біологічна цінність?
3. Перелічити типи вірусних геномів.
4. Дати характеристику популяції Т-лімфоцитів (перелічити відомі субкласи Т-лімфоцитів, назвати їх функції, поверхневі маркери та рецептори)
5. Людина, хвора на СНІД, стає жертвою опортуністичних інфекцій. Які властивості притаманні збудникам таких інфекцій?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

- 1.Привес М.Г.,Лисенко Н.И., Бушков В.И. Анатомия человека.- М.: Медицина.- 2001.
- 2.Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.
- 3.Биохимия/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. с.118-138.
- 4.Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.: Медицина.-1999.
- 5.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с. 199-260.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

- 1.Поширення ВІЛ-інфекції в світі, вікова характеристика інфікованих, шляхи передачі збудника, групи ризику.
- 2.Систематика ВІЛ, морфологія і біологічні властивості: молекулярна біологія.
- 3.Стійкість ВІЛ в зовнішньому середовищі, мінливість ВІЛ.
- 4.Гіпотези про походження вірусу СНІДу.
- 5.Взаємодія ВІЛ з клітинами людського організму.
- 6.Імунопатологічні зміни при ВІЛ-інфекції.
- 7.Антитілоутворення при ВІЛ-інфекції і тест-системи для визначення антитіл до ВІЛ.
8. Клініка ВІЛ-інфекції: періоди, клінічні симптоми
- 9.Діагностика ВІЛ-інфекції: в чому полягає сутність імуно-ферментного аналізу?
- 10.Які реактиви необхідні для діагностики СНІДу методом ІФА? Який патологічний матеріал досліджується і яких застережних заходів необхідно дотримуватися при його відборі?

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология/ Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. - М.: Медицина, 2005. - С. 498-513.
2. Микробиология/Под ред. А. А. Воробьева и др. - М.: Медицина, 1994. - С. 244-248.
3. Пяткін К. Д., Кривошеїн Ю. С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992. - С. 388-391.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Збудник ВІЛ– інфекції” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: Тест - система для діагностики ВІЛ-інфекції, імунограми, таблиці "ВІЛ-інфекція".

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Засвоїти принцип визначення антитіл до вірусу СНІДу імуно-ферментним методом Описати в протоколі реактиви, що входять до складу тест-системи; порядок постановки реакції ІФА; спосіб врахування результатів
2. Ознайомитися з використанням імуноблотінгу для діагностик СНІДу. Відмітити у протоколі етапи дослідження, реактиви та устаткування, використовувані на кожному етапі.

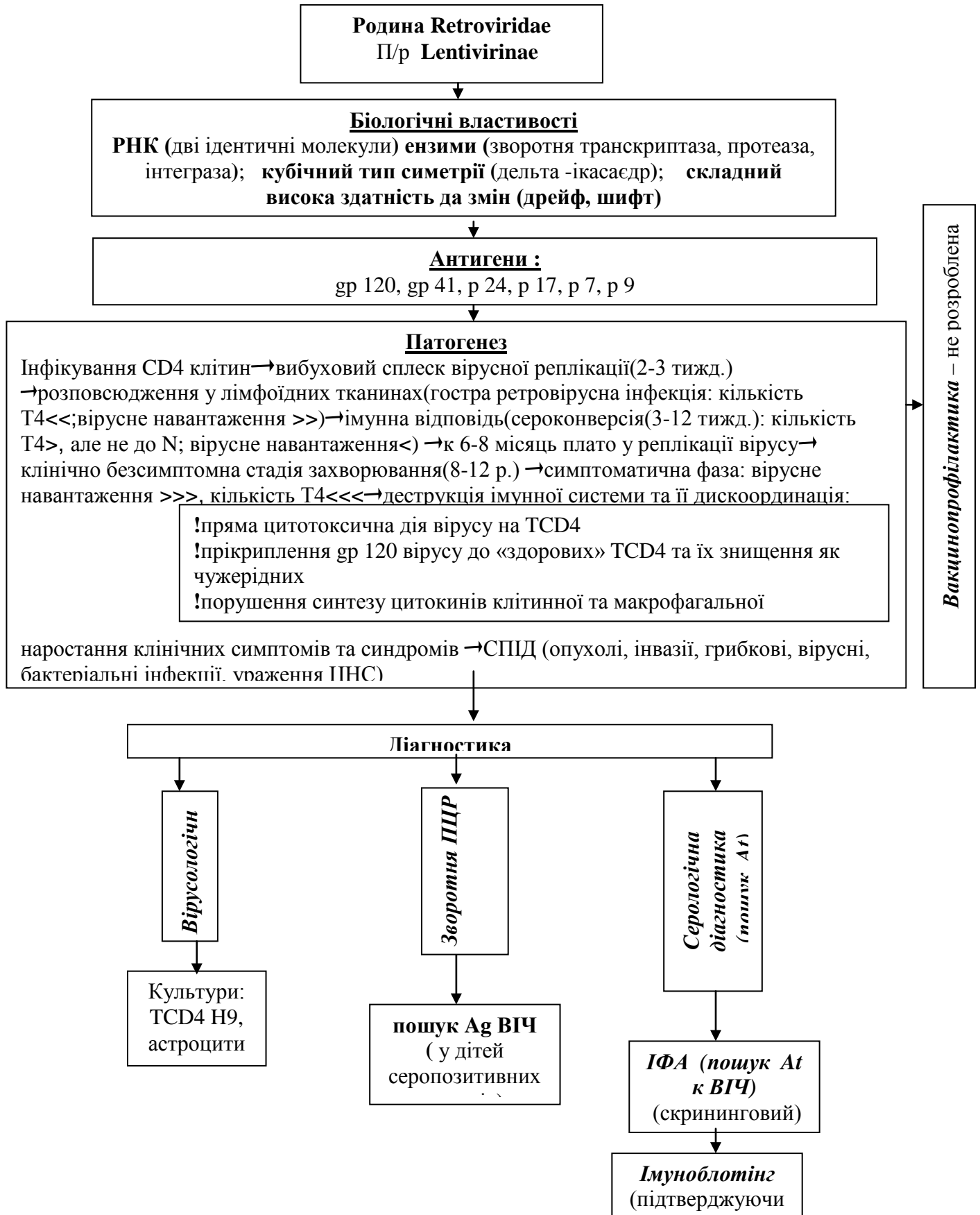
3. Порівняти імунограми здорової та хворої на СНІД людини, вказати у протоколі відмінності у стані факторів неспецифічної резистентності, Т та В систем імунітету.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

До лікаря-терапевта звернувся чоловік з скаргами на поступове підвищення температури, частий шлунковий розлад, зниження ваги. З'явилися набряки нижніх кінцівок, лімфовузли збільшені. Раніше нічим окрім ГРЗ не хворів. Декілька місяців тому хворий повернувся з відрядження до Центральної Африки. Знаходячись в відрядженні він був травмований і 8 днів знаходився в госпіталі. Оцінюючи анамнез і клінічну картину лікар запідозрив у хворого СНІД.

1. Як підтвердити або спростувати клінічний діагноз?
2. Який можливий шлях зараження?
3. Які препарати слід застосувати, якщо діагноз підтвердиться?

Граф логічна структура теми: «ЗБУДНИК ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ»



Протокол до практичного заняття № 1.22**1. Специфічна діагностика ВІЛ-інфекції в ФІА.**

Реактиви, що використовуються на першому етапі:

1. _____

2. _____

3. _____

Опис I етапу _____

Реактиви, що використовуються на другому етапі:

I 4. _____

Опис II етапу _____

Реактиви, що використовуються на третьому етапі:

5. _____

6. _____

Опис результатів _____

2. Підтвердження за допомогою імуноблотінга результатів, отриманих у ІФА

I етап _____

Матеріали, реактиви, устаткування _____

Сутність I етапу _____

II етап _____

Матеріали, реактиви, устаткування _____

Сутність II етапу _____

III етап _____

Матеріали, реактиви, устаткування _____

Сутність III етапу _____

Врахування результатів _____

3. Імунологічні зміни у хворого на СНІД

Фактори неспецифічної резистентності _____

Т -система імунітету _____

В -система імунітету _____

Дата _____

Підпис викладача: _____

Сучасні методи імунодіагностики

За останні роки в практику увійшли нові імунологічні методи діагностики - радіоімуний аналіз (РІА) і імуноферментний аналіз (ІФА), що дозволяють проводити імунодіагностику в тих випадках, коли традиційні реакції імунітету не дадуть задовільного результату.

РІА і ІФА використовуються для постановки “невидимих” реакцій імунітету, для врахування яких застосовуються метки: радіоізотопи або ферменти, здатні кон'югувати з імунореагентами, зберігаючи їх специфічність і активність.

Особливо широке розповсюдження отримав більш простий в постановці і врахуванні імуноферментний аналіз. Реакція протікає з прикріпленням одного з реагентів на поверхні пробірки або лунки. Тому такі реакції називають твердо фазними. В якості твердої фази найбільш часто використовуються пробірки або панелі з полівінілу або полістиролу, дно яких обробляється спеціальними речовинами, сприятливими адсорбції антигену або антитіла. Прикріплення до твердої фази здійснюється або при виготовленні панелі або на початку постановки дослідів. Загальна назва таких панелей - панелі імунолон.

Принцип реакції ІФА

На першому етапі на панелі імунолон (на твердій фазі) адсорбується відомий антиген - якщо необхідно визначити антитіла, або невідомий антиген - збудник захворювання, в патологічному матеріалі від хворого. Додається відповідно сироватка хворого (невідомі антитіла) або діагностична кроляча сироватка (відомі антитіла). Означимо антитіла в цій реакції АТ-1. Суміш інкубується, відмивається від компонентів, які не прореагували.

На другому етапі до системи додається антиглобулінова сироватка (АТ-2), мічена ферментом пероксидазою хрому (ПХ). Виробляється повторна інкубація для з'єднання АТ-2 з своїм антигеном АТ-1, промивання і перехід до третього етапу.

Третій етап - індикаторний. До системи додається хромогенний субстрат - ортофенілендіамін, розчинений в буфері разом із перекисом водню. При збереженні в системі ферменту (позитивна реакція) останній відновлює H_2O_2 до H_2O і окислює субстрат - донор електронів. При цьому з'являється коричнево- жовте забарвлення, що враховується на спектрофотометрі або на око.

Схематично реакцію ІФА можна зобразити:

I етап: АГ+АТ-1

II етап: АТ-1+(АТ-2+ПХ)

III етап: ПХ+субстрат з H_2O_2 ,

Змінюється забарвлення

Де: АГ - антиген,

АТ-1 - антитіла хворого або відомі кролячі антитіла,

АТ-2 - антитіла антиглобулінові,

ПХ - пероксидаза з хрому (фермент),

Субстрат з H_2O_2 - ортофенілендіамін з перекисом водню.

Тест-система ІФА для визначення антитіл до вірусу СНІДу

До системи входять:

Для першого етапу: 1. Планшети - тверда фаза з кон'югованим антигеном вірусу СНІДу.

2. Сироватка, що містить антитіла до вірусу СНІДу - позитивний контроль.

3. Сироватка, що не містить антитіла до вірусу СНІДу.

На першому етапі в одну лунку поміщають сироватку хворого, в другу і третю лунки - контрольні сироватки. Суміш інкубується і відмивається.

Для другого етапу:

4. Антиглобулінова сироватка (АТ-2), що містить антитіла проти імуноглобулінів людини і мічена пероксидазою.

Суміш інкубується і промивається.

Для третього етапу:

5. Індикатор ортофенілєндіамін з перекисом водню для виявлення ферменту при позитивній реакції.
6. Нормальна кроляча і бичача сироватки включені до складу реактивів для приготування буферних розчинів.

Імуноблотінг.

Для підтвердження результатів, отриманих методом ІФА, використовують метод імунохімічного аналізу білків, який ґрунтується на специфічній взаємодії сироваток з електрофаретично розділеними білками вірусу. Принцип метода полягає у тому, що розділені методом електрофарезу білки переносяться на нітроцелюлозні фільтри і потім методом ІФА визначається специфічна взаємодія імунних сироваток з окремими білками віріона. Його основними етапами є: 1) електрофорез вірусних білків в поліакріламідному гелі – гель заливають між скляними пластинами, вірусні білки дисоціюють у буферному розчині та наносять на гель, додавши розчин бромфенолового синього, електрофарез здійснюють в приборі моделі studier та ін. при постійній напрузі потягом 17-18 годин; 2) електроперенос з гелю на нітроцелюлозний фільтр – гель поміщають на нітроцелюлозний фільтр та покривають його з двох боків кількома шарами фільтрувального паперу, “сендвіч” поміщають між катодом та анодом та проводять електроперенос протягом 2 годин; 3) імунодетекція – визначення наявності антитіл до білків ВІЛ у досліджуваних сироватках, цей етап включає блокування вільних місць зв'язування на нітроцелюлозі, інкубацію з досліджуваною сироваткою, видалення реагентів, що не зв'язалися, додавання індикаторного комплексу, що містить кон'югований білок А золотавого стафілокока та пероксидазу хрому, повторне відмивання від зайвих реагентів, проявлення реакції у субстратному розчині з перекису водню та хромогену.

Врахування результатів проводиться візуально за появою пофарбованих смужок на нітроцелюлозі. У хворих на СНІД практично у всіх випадках визначаються антитіла до gp41, а антитіла до p24 менш часто. У безсимптомних носіїв ВІЛ антитіла до p24 виявляються частіше, ніж антитіла до gp41. При проведенні реакції необхідно використовувати позитивну та негативну сироватки для порівняння з отриманими результатами та для підтвердження правильності постановки реакції.

МОДУЛЬ 2

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.1

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА СТАФІЛОКОКОВИХ ТА СТРЕПТОКОКОВИХ ІНФЕКЦІЙ.

Актуальність теми: В останні роки відзначається тенденція до зростання стафілококових інфекцій навіть до епідемічних спалахів у акушерсько-гінекологічних, дитячих та хірургічних відділеннях. Причиною поширення стафілококових інфекцій є виникнення і природний відбір стійких до антибіотиків штамів бактерій. Стафілококи та стрептококи можуть викликати різні нозологічні форми захворювань: ангіни, сепсис, бешихове запалення, скарлатину, ревматизм, менінгіт, отит та ін. Імунопрофілактичні засоби проти збудників цих захворювань досі не дістали широкого застосування. Тому лікар будь-якого профілю зіштовхується в своїй практиці зі стафілококовими та стрептококовими інфекціями.

Мета: Провести бактеріологічне дослідження крові при підозрі на сепсис, бактеріоскопічне та біктеріологічне дослідження крові при нагноювальному процесі, біохімічну ідентифікацію виділеної культури бактерій, її фагоциткування. Освоїти серологічну діагностику ревматизму.

Конкретні цілі – уміти:

1. Тракувати біологічні та патогенні властивості стафілококів та стрептококів, їх зв'язок з патогенезом захворювань та методами лабораторної діагностики.
2. Провести бактеріологічні дослідження при підозрі на сепсис.
3. Готувати фіксовані мазки з тампону насичуваної гноєм рани.
4. Визначити культуральні властивості збудника.
5. Дослідити патогенність виділеного штамму за тестами (гемолітична активність, спроможність коагулювати плазму, продукцію лецитінази, ДНК-азну активність).
6. Визначати чутливість виділеного штаму до антибіотиків та фаготип виділеної культури.
7. Врахувати результат серологічного дослідження при підозрі на ревматизм.
8. Вибирати діагностичні, профілактичні та лікувальні препарати з теми та пояснювати принцип їх використання.

Вихідний рівень знань-умінь:

1. Розпізнавати за морфологією стафілококи та стрептококів.
2. Вибирати живильні середовища для культивування стафілококів і стрептококи.

3. Пояснювати сутність реакцій нейтралізації.
4. Пояснювати спосіб отримання та використання препаратів (аутовакцина, анатоксин, гама-глобулін).

Для того, щоб Ви могли усвідомити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідним вимогам, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання № 1: За якою морфологічною ознакою можна відрізнити стафілококів від стрептококів.

Завдання № 2: Яке живильне середовище можна використати для виявлення гемолітичної активності патогенних мікробів.

Завдання № 3: Як проводиться серологічне дослідження на ревматизм.

Завдання № 4: Поясніть термін “аутовакцина”.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой.-М.:Медицина, 1994.
2. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология – СПб: Специальная литература, 1998.
3. П'яткин К. Д, Кривошеїн Ю. С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии / Под ред. Л. Б. Борисова. – М.: Медицина, 1984.
5. Лекція з теми “Гноєтворні коки”.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Дайте загальну характеристику патогенних коків.
2. Біологічні, морфологічні, культуральні властивості стафілококів.
3. Патогенні та непатогенні стафілококи. Тести патогенності. Роль стафілококів у патології людини.
4. Особливості патогенезу та імунитету при стафілококових захворюваннях у дорослих та дітей.
5. Методи мікробіологічної діагностики стафілококових інфекцій.
6. Морфологічні та культуральні властивості стрептококів, їх патологічне значення.
7. Класифікація стрептококів, серологічні групи та типи.
8. Роль стрептококів у патології людини.
9. Методи мікробіологічної діагностики при стрептококових інфекціях.
10. Роль стрептококів у етіології ревматизму. Реакція Дика.
11. Профілактика та лікування кокових захворювань.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчанням, чому сприяє графологічна структура теми (додаток № 1, 1^а)

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи:

1.Провести бактеріологічне дослідження при підозрі на сепсис. Для цього зробити посів крові хворого на МПБ з 1%-ом глюкози. Описати у протоколі ознаки росту гемокультури. З метою перевірки чистоти культури промікроскопувати її мазок, малюнок занести до протоколу. Пересіяти гемокультуру на ЖСА і 5%-вий кров'яний агар.

2.Приготувати мазок із змиву з тампона, насиченого гноєм з рани. Мазок пофарбувати за Грамом, промікроскопувати, малюнок занести до протоколу.

3.Взятий з рани хворого гній посіяти на ЖСА та кров'яний агар. Описати у протоколі культуральні властивості збудника при зростанні на цих середовищах. Відібрати колонії із золотистим або білим пігментом, приготувати з них мазки, пофарбувати за Грамом, промікроскопувати, малюнок занести до протоколу. Якщо у мазку виявлені Гр+ коки, що утворюють гроноподібні скупчення, колонію пересіяти на скошений агар для накопичення чистої культури бактерій та їх наступної ідентифікації.

4.Дослідити патогенність виділеного штаму стафілокока за наступними тестами:

гемолітична активність – при посіві на кров'яний агар;

розщеплення маніту – при посіві у стовпчик напіврідкого МПА з манітом;

спроможність коагулювати плазму – при додаванні суспензії мікроба до кролячої плазми;

продукція лецитінази – при посіві на середовище з жовтком;

ДКН-азна активність – при посіві на середовище з ДНК.

Описати в протоколі особливості зростання мікроба на цих середовищах.

5.Визначити чутливість виділеного штаму до антибіотиків методом стандартних дисків. Визначити зони затримки росту для кожного антибіотика, дати рекомендацію з використання тих чи інших антибіотиків для лікування хворого.

6.За допомогою стандартного набору стафілококових діагностичних фагів визначати фаготип культури, що досліджується.

7.Провести серологічне дослідження при підозрі на ревматизм - врахувати результати заздалегідь поставленої реакції титрування анти-О – стрептолізіну. Ця реакція базується на імунологічній відповіді, що виникає в організмі людини при проникненні стрептококових антигенів і виражається у виробленні антитіл проти стрептолізіну О. Спроможність стрептолізіну О розчиняти еритроцити нейтралізується, якщо у крові хворого є антитіла проти стрептокока. Реакція ставиться за схемою:

| Номери пробірок | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 контроль |
|----------------------------------|-------|-------|-------|--------|---------------|
| Розведення сироватки | 1:250 | 1:500 | :1000 | 1:2000 | - |
| Об'єм сироватки (мл) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | - |
| Розчин О-стрептолізину | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Фосфатний буфер (мл) | - | - | - | - | 0,4 |
| Термостат, 37 С°, 60 хвилин | | | | | |
| 5%-ва суспензія еритроцитів (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Термостат, 37 С°, 60 хвилин | | | | | |

8. Розглянути діагностичні, профілактичні та лікувальні препарати з теми, ознайомитись з принципом їх використання.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту Вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. В мазку, приготованому з гною, виявлені Гр+ коки, розташовані серед лейкоцитів. Які ще дослідження необхідно провести для з'ясування етіології гнійно-запального процесу?
2. У дитячому садку 10 дітям, які контактували з хворим на скарлатину, ввели внутрішньошкірно токсин Діка. У двох дітей на місці введення відзначена припухлість та почервоніння. У інших дітей реакції немає. З якою метою ставили пробу? Оцінити результати реакції.
3. При постановці реакції титрування анти-О-стрептолізину з сироваткою 2 людей з підозрою на ревматизм антитіла знайдені: у першого у титрі 1:50, у другого – 1:2000. Оцінити результати.

Зразок протоколу практичної роботи № 2.1:

1. Бактеріологічне дослідження крові при підозрі на сепсис.

Об'єм та спосіб відбору пат. матеріалу _____

Поживне середовище: _____

Ознаки росту: _____

Строки появи ознак росту: _____

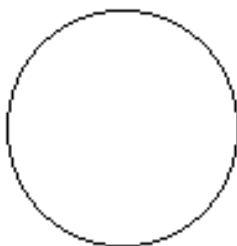


Рис. 1. Мазок гемокультури. Забарвлення за Грамом

Для остаточного визначення виду збудника необхідно: _____

2. Бактеріоскопічне дослідження гною при гнійно-запальних процесах.

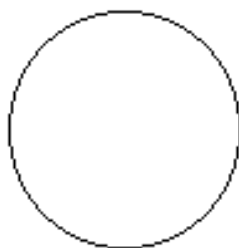


Рис. 2. Коки в гної. Забарвлення за Грамом

3. Бактеріологічне дослідження гною, виділення чистої культури.

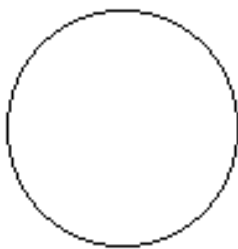


Рис. 3. Мазок типової колонії. Забарвлення за Грамом

Ріст культури на ЖСА _____

На кров'яному агарі _____

На середовищі з манітом _____

На середовищі з ДНК _____

Плазмокоагулазна активність _____

Чутливість до антибіотиків _____

Чутливість до фагів _____

4. Біологічні препарати, які використовуються при захворюваннях, викликаних патогенними стафілококами та стрептококами для:

діагностики _____

специфічної терапії _____

специфічної профілактики _____

5. Серологічне дослідження при підозрі на ревматизм.

Врахування результатів реакції титрування анти-О -стрептолізіну:

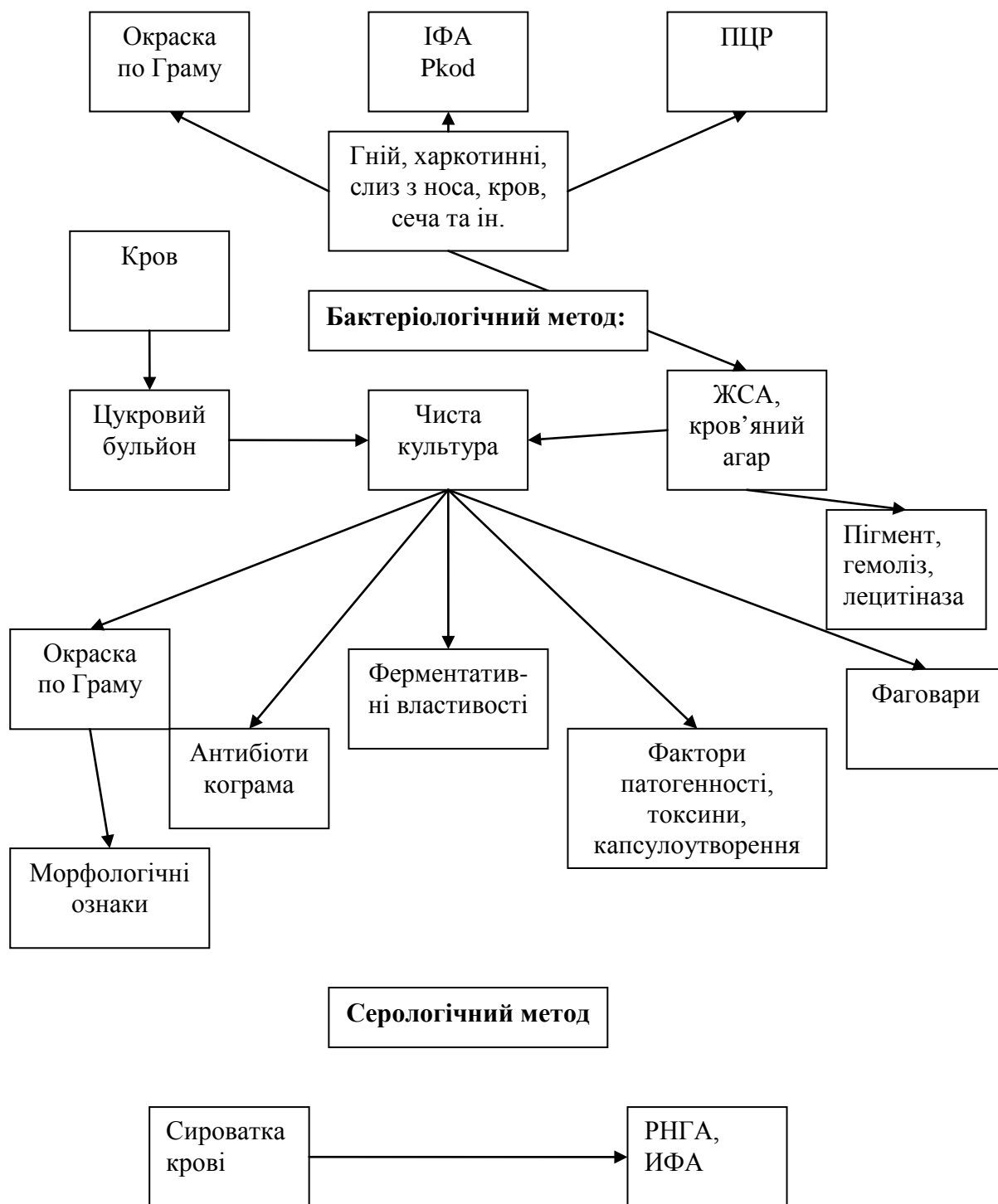
| Сироватка хворого № | Розведення сироватки | | | | Контроль |
|---------------------|----------------------|--------|---------|---------|----------|
| | 1: 250 | 1: 500 | 1: 1000 | 1: 2000 | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |

Висновок: сироватка № ____ належить хворому на ревматизм в активній фазі, № ____ у стадії ремісії, № ____ - здоровому.

Підпис викладача: _____

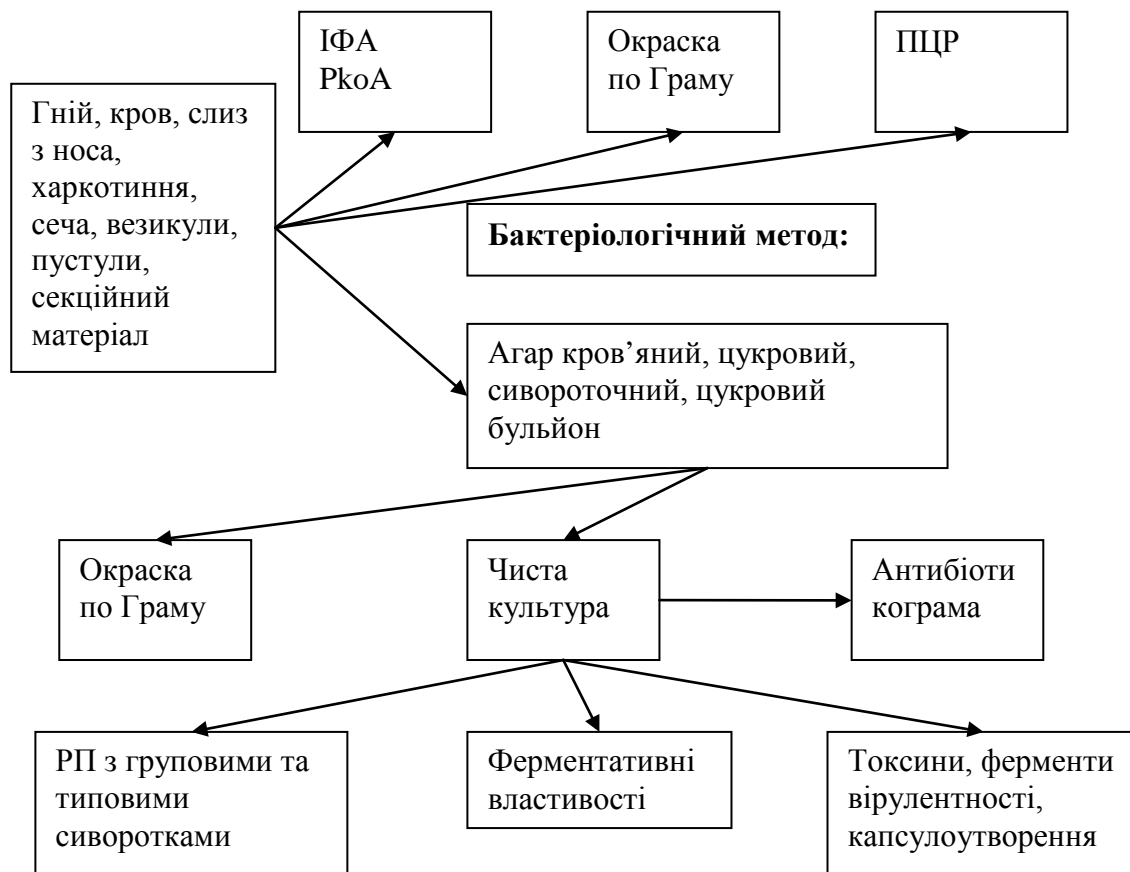
Графологічна структура теми:
Мікробіологічна діагностика стафілококових та стрептококових інфекцій.
Стафілококи

Експрес метод:

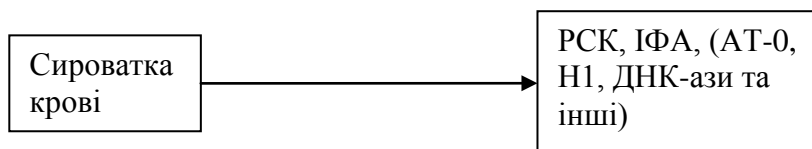


Графологічна структура теми:
Мікробіологічна діагностика стафілококових та стрептококових інфекцій.
Стрептококи

Експрес метод:



Серологічний метод:



ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.2

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА МЕНІНГОКОКОВИХ, ГОНОКОКОВИХ ТА ПНЕВМОКОКОВИХ ІНФЕКЦІЙ

Актуальність теми. У теперішній час зростає ураження людей гонококами, пневмококами, менінгококами. Проти даної патології ніколи широко не використовувались вакцини, тому нинішня несприятлива ситуація розвивається за відсутності колективного штучного імунітету. Звертає на себе увагу, що почастишали захворювання з нетиповою локалізацією означених збудників (нагноєння ран, ураження середнього вуха, слизової прямої кишки та ін.). Ці клініко-епідеміологічні особливості повинні ретельно враховуватись лікарями при відборі патологічного матеріалу, виборі шляху введення ліків, профілактиці.

Мета: провести бактеріоскопічне, бактеріологічне та серологічне дослідження патологічного матеріалу при підозрі на епідемічний цереброспінальний менінгіт, гонорею та крупозну пневмонію.

Конкретні цілі – уміти:

1. Тракувати біологічні та патологічні властивості менінгоkokів, гоноkokів, пневмоkokів.
2. Описувати морфологію збудників менінгіту, гонореї, пневмококової інфекції.
3. Визначати, який патологічний матеріал досліджується при епідемічному цереброспінальному менінгіті, гонореї, пневмококовій інфекції.
4. Визначати у лікворі мегінгококовий агтиген за допомогою РП.
5. Пояснювати відмінності мікробіологічної діагностики при гострій та хронічній гонореї.
6. Проводити мікробіологічну діагностику пневмококової інфекції.
7. Вибирати препарати для діагностики, профілактики і лікування менінгококових та гонококових інфекцій.

Вихідний рівень знань-умінь

1. Розрізняти морфологічні особливості бактерій кокової групи.
2. Фарбувати бактерії за Грамом.
3. Виявляти капсулу у мікроорганізмів.
4. Пояснювати склад поживних середовищ для ауксотрофних бактерій.
5. Пояснювати механізми РП та РЗК, враховувати результати цих реакцій

Для того, щоб ви могли усвідомити чи відповідає вихідний рівень ваших знань, умінь необхідним вимогам, пропонуємо виконати ряд завдань :

Завдання № 1. Збудники менінгіту, гонореї та пневмококи є диплококами. Знайдіть на представленій таблиці диплококи. Укажіть серед них Гр+ та Гр-.

Завдання №2. Які реактиви необхідні для фарбування за методом Грама?

Завдання №3. Для нейсерій та пневмококів капсула є важливим фактором патогенності. Який метод фарбування дозволяє виявити цю структуру мікробної клітини: а) Грама, б) Нейссера, в) Циля-Нільсена, г) Лефлера, д) Бурі-Гінса ?

Завдання № 4. За типом живлення збудники менінгіту, гонореї та пневмококи належать до ауксотрофів. Поясніть термін ауксотрофи, ауксини. Серед запропонованих середовищ укажіть придатні для ауксотрофів: а) МПА, б) кров'яний агар, в) пептонна вода, г) жовчний бульйон, д) печінковий агар.

Завдання № 5. Для виявлення менінгококового антигену у лікворі використовують реакцію кільцепреципітації. Як враховується РП у рідкому середовищі?

Завдання № 6. При діагностиці хронічної гонореї використовується реакція Борде-Жангу, яка є реакцією зв'язування комплементу. Які компоненти необхідні для постановки РЗК? Що буде спостерігатися при позитивній та негативній РЗК?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой – М.: Медицина, 1994
2. Коротяев А.И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология – С-Пб.: Специальная литература, 1998
3. П'яткин К. Д., Кривошеїн Ю.С.. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии / Под ред. Л. Б. Борисова – М.: Медицина, 1984
5. Лекція з теми „Морфологія бактерій”

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Таксономічне положення менінгококів. Морфологічні, біологічні, антигенні та патогенні властивості менінгококів.
2. Роль менінгококів у патології людини, шляхи передачі інфекції.
3. Мікробіологічна діагностика при епідемічному цереброспінальному менінгіті.
4. Морфологічні, біологічні, антигенні та патогенні властивості гонококів.
5. Роль гонококів у патології людини, джерело і шляхи передачі інфекції.
6. Особливості гонококової інфекції у дітей.
7. Методи мікробіологічної діагностики, що використовуються при гострій та хронічній гонореї, бленореї.
8. Імунітет при менінгіті, гонореї.

9. Профілактика і лікування інфекцій, викликаних патогенними нейсеріями.
10. Морфологічні, біологічні та антигенні властивості *S. pneumoniae*
11. Патогенез та мікробіологічна діагностика при пневмококової інфекції.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. А.А.Воробьева.- М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008.- С. 342-355.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. –М.: Медицина, 2005. - С.370-376.
3. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - СПб: Специальная литература, 1998.- С. 340-341, 342-346.
4. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992.- С.243-256.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии/ Под ред.О.В.Бухарина.- М.:Медицина.- 2002.- С. 117-133.
6. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л. Б.Борисова. – М.: Медицина, 1984.- С.133-141, 152-154.
7. Лекція з теми «Збудники менінгококових, гонококових та пневмококових інфекцій».

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: Мікробіологічна діагностика менінгококових, гонококових і пневмококових інфекцій (додаток № 1)

Матеріали та обладнання: пофарбовані мазки з *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae*, *S.pneumoniae*, мікроскоп, реактиви для постановки реакції кільцепреципітації, демонстрація реакції Борде-Жангу, імунобіологічні препарати за темою. Таблиці „Мікробіологічна діагностика інфекцій, викликаних нейсеріями”, „Мікробіологічна діагностика стрептококових інфекцій”, „Пневмококи”, „Незавершений фагоцитоз”.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи:

1. Розглянути готовий мікропрепарат з ліквору, пофарбований за Грамом з метою виявлення у ньому Гр - бобоподібних дипло - та тетракоків і підтвердження клінічного діагнозу цереброспінального менінгіту. Малюнок занести в протокол.
2. Поставити реакцію кільцепреципітації ліквору хворих з підозрою на менінгококову інфекцію з менінгококовою преципітуючою сироваткою. Реакція ставиться у вузьких пробірках. Преципітуюча сироватка більш важкий реагент, тому вона наливається у пробірку першою та утворює нижній шар, а більш легкий реагент – той, що містить антиген (ліквор, позитивні та негативні контролю) - нашаровується зверху. Через 30-60 хвилин врахувати реакцію: у результаті взаємодії антитіла та антигену за на межі їх розчинів утворюється

преципітат у вигляді кільця, що пізніше випадає у осад. Результати відмітити у протоколі, зробити висновок про наявність менінгококового антигену у досліджуваному лікворі. Вказати інші методи, які дозволяють виявити антиген менінгокока у патологічному матеріалі.

3. Провести мікробіологічну діагностику гострої гонореї. а) Промікроскопувати мазки пофарбовані метиленовим синім та за Грамом, приготовлені з гнійних виділень уретри хворого на гостру гонорею. Знайти Гр - диплококи, що нагадують кавові зерна та розташованих всередині лейкоцитів (незавершений фагоцитоз). Малюнки занести в протокол. б) Серед запропонованих імунобіологічних препаратів знайти той, що його введення хворому підвищить імовірність виділення збудника, записати назву у протокол. Вказати середовища для виділення гонококів, звернути увагу на склад середовищ. Описати у протоколі ознаки росту збудника та тести для його ідентифікації.

4. Провести серологічну діагностику хронічної гонореї. Із запропонованого набору імунобіологічних препаратів відібрати ті, що необхідні для постановки реакції, записати їх назви до протоколу. Врахувати результати заздалегідь поставленої реакції Борде-Жангу (РЗК), що дозволяє виявити специфічні протигонококові антитіла у сироватці хворих. Результати занести до протоколу. Вказати метод мікробіологічної діагностики, придатний для масових обстежень, вибрати необхідний для нього препарат.

5. Розглянути під мікроскопом мазки харкотиння хворого з підозрою на крупозну пневмонію. Виявити у харкотинні *S.pneumoniae* - Гр+ диплококи ланцетоподібної форми. Розглянути мазок з чистої культури пневмококів, оброблений полівалентною сироваткою до капсульного полісахариду пневмококів, звернути увагу на наявність капсули та її розміри. Малюнки занести в протокол.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і в ході проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

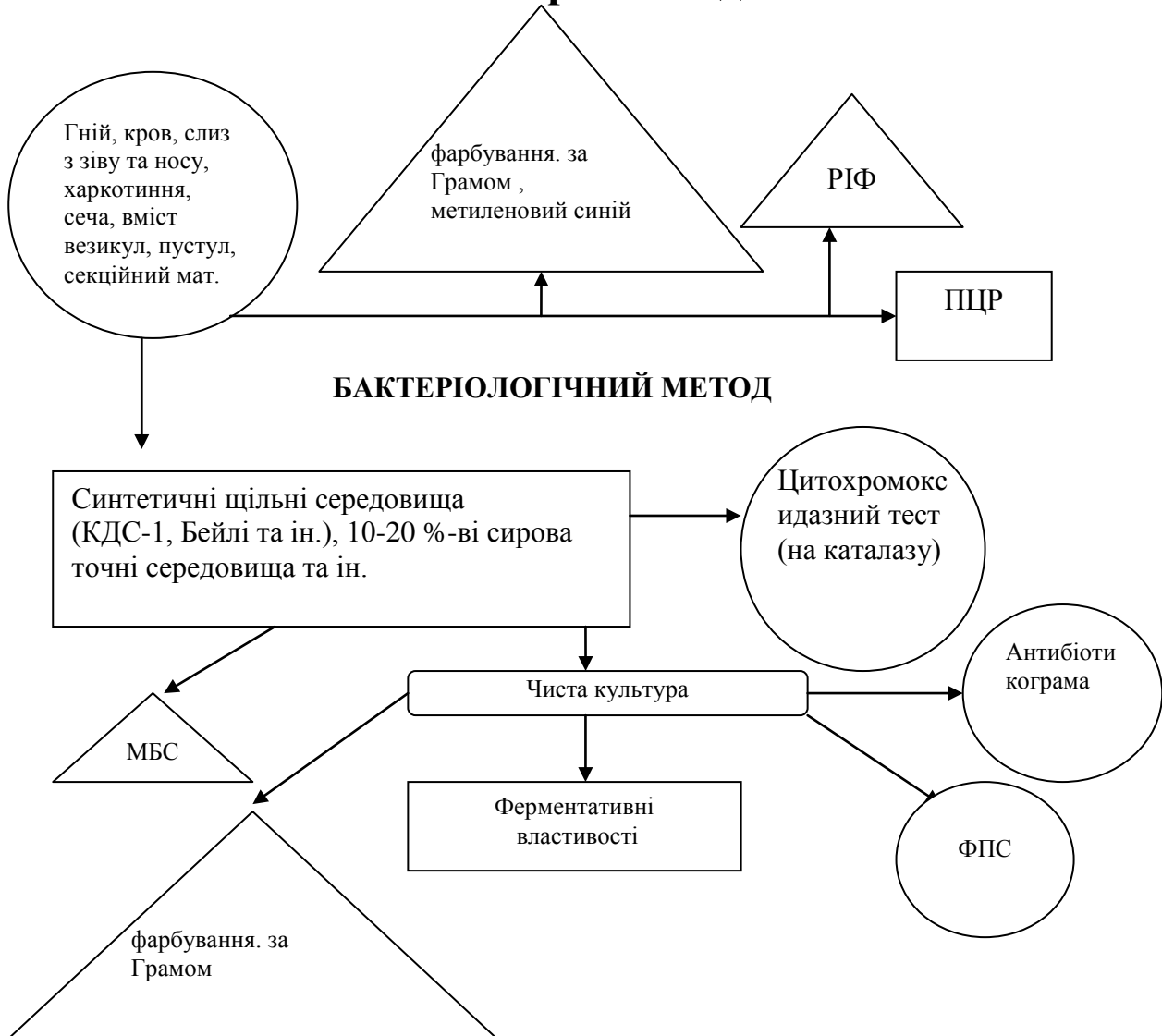
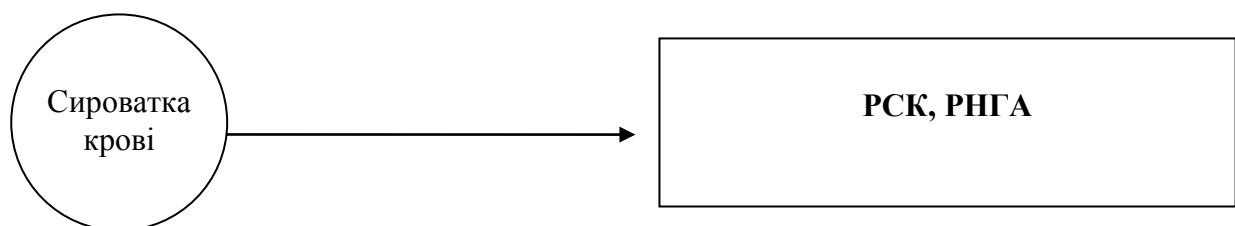
1. Чоловік, що занедужав на гостру гонорею, самостійно лікувався антибіотиками. Гнійні виділення припинилися, але після вживання спиртного через два місяці після лікування з'явилися знов. Результати мікроскопії сумнівні. Як підтвердити діагноз?

2. У мазку з ліквору, пофарбованому за Грамом, виявлені Гр- бобоподібні дипло- та тетракоки. Які дослідження необхідно провести для підтвердження діагнозу: епідемічний цереброспінальний менінгіт?

3. Дитина, що занедужала 20 днів тому, одужує після важкого менінгококового менінгіту. Яке дослідження дозволить встановити, що дитина перестала бути носієм збудника і може відвідувати дитячий садок? Які препарати слід використати для специфічної профілактики менінгіту у дитячому садку, де відзначений випадок такого захворювання?

Графологічна структура теми
”Мікробіологічна діагностика менінгококової, гонококової та
пневмококової інфекцій”

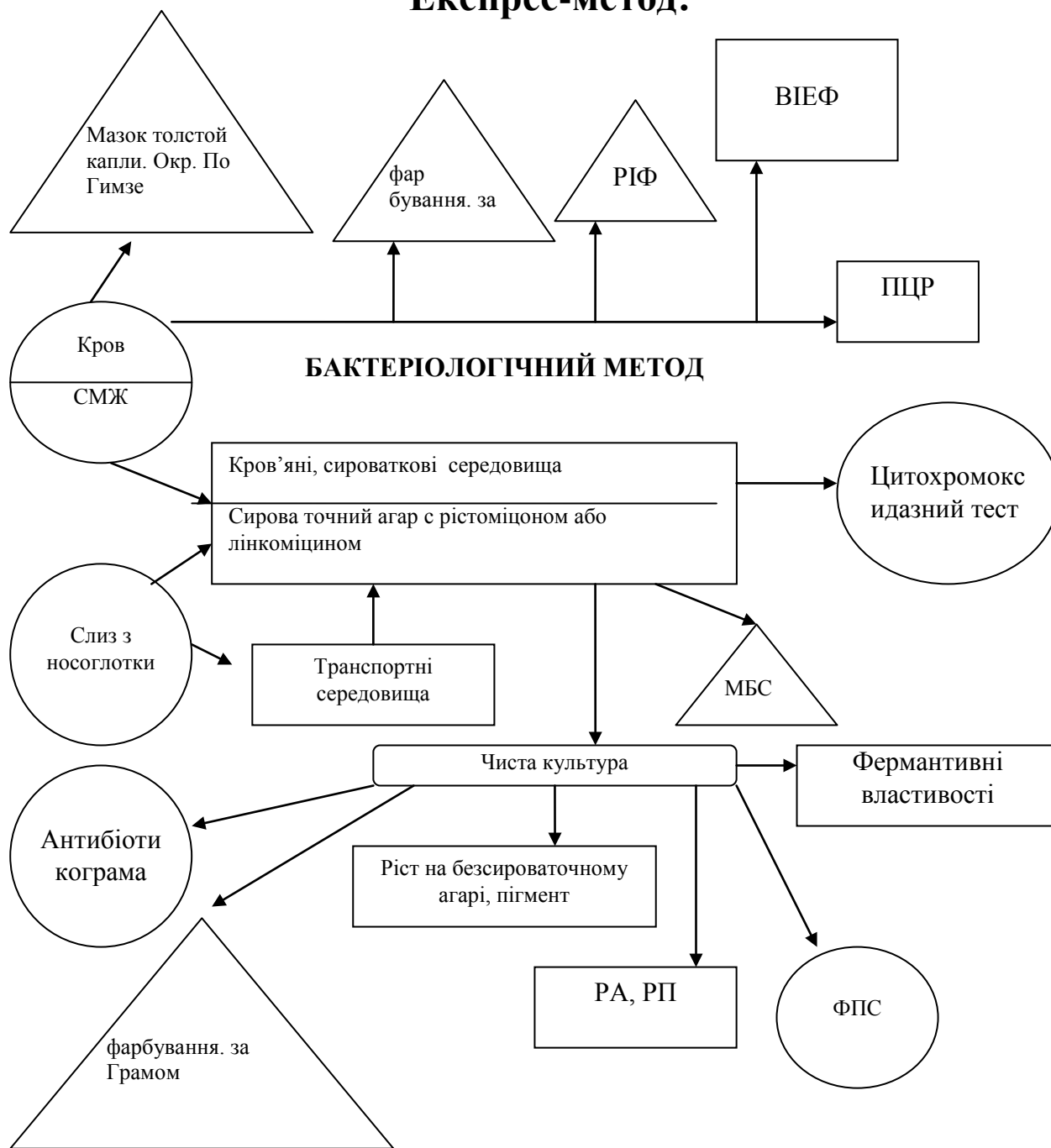
Гонококи

Експрес-метод:**СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД**

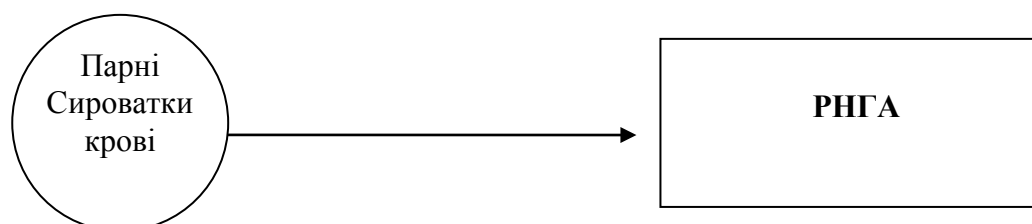
Графологічна структура теми
”Мікробіологічна діагностика менінгокової, гонокової та пневмокової інфекцій”

Менінгококи

Експрес-метод:



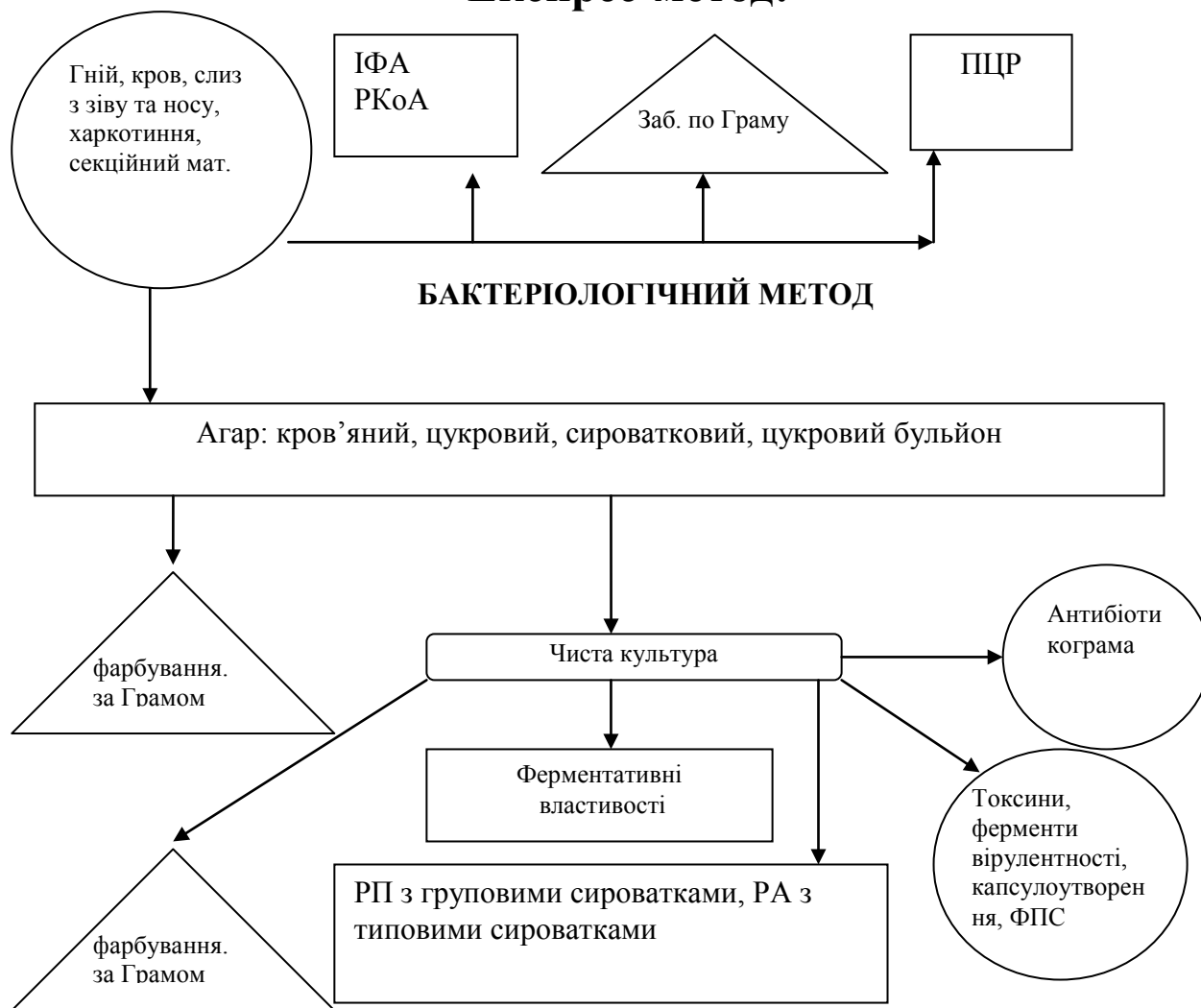
СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД



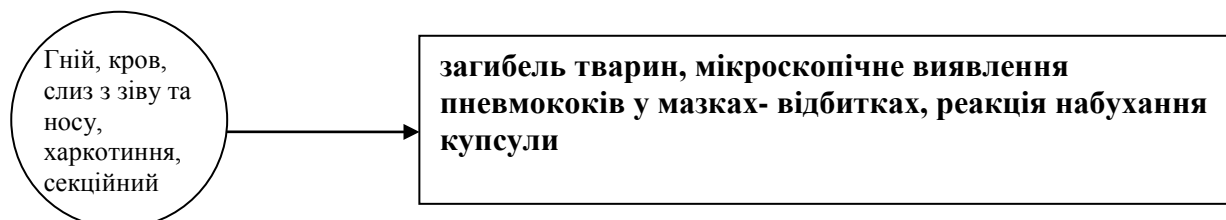
Графологічна структура теми
”Мікробіологічна діагностика менінгококової, гонококової та пневмококової інфекцій”

Пневмококи

Експрес-метод:



БІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.2**

1. Бактеріоскопічне дослідження ліквору при підозрі на епідемічний цереброспінальний менінгіт:

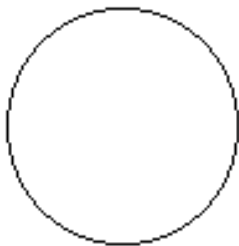


Рис. 1. *Neisseria meningitidis*. Забарвлення за Грамом

2. Серологічна ідентифікація збудника менінгіту в реакції кільцепреципітації ліквору хворих №1 та №2 з менінгококовою преципітуючою сироваткою.

Висновок: реакція позитивна у хворого № _____,

це означає : _____.

Інші методи виявлення менінгококових антигенів у патологічному матеріалі:

3. Мікробіологічна діагностика гострої гонореї

а) бактеріоскопічне дослідження гнійних виділень з уретри:

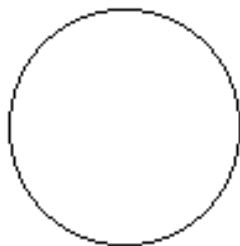


Рис. 2. *Neisseria gonorrhoeae* в гної.
Забарвлення за Грамом

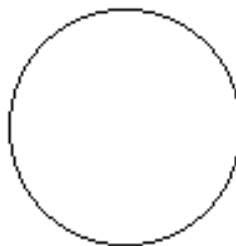


Рис. 3 *Neisseria gonorrhoeae* в гної.
Забарвлення метиленовим синім

б) бактеріологічне дослідження гнійних виділень з уретри:

перед взяттям матеріалу необхідно _____

поживні середовища _____

ознаки росту _____

ідентифікація збудника _____

4. Серологічне дослідження при підозрі на хронічну гонорею.

Перед постановкою реакції сироватку хворого треба _____,

щоб _____.

Використані реактиви _____.

Висновок: реакція Борде-Жангу позитивна з сироваткою хворого № _____,

діагноз _____.

При підозрі на хронічну гонорею використовується також _____ метод,
використовуваний реактив _____.

5. Бактеріоскопічне дослідження харкотиння при підозрі на крупозну пневмонію.

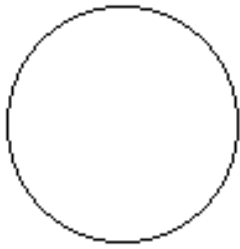


Рис. 4. *Streptococcus pneumoniae*.
Забарвлення за Грамом

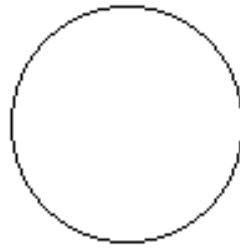


Рис. 5. Реакція набухання капсули

Для постановки реакції набухання капсули використовується _____

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.3
ТЕМА: ЕШЕРІХІЇ. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА
ЗАХВОРЮВАНЬ, СПРИЧИНЕНИХ КИШКОВОЮ ПАЛИЧКОЮ.
ШИГЕЛИ. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ДИЗЕНТЕРІЇ.

Актуальність теми. Кишкова паличка входить до складу нормальної мікрофлори людини. У той же час вона вважається умовно-патогенним мікроорганізмом, здатна викликати дизентерієподібні та холероподібні захворювання, колі-ентерити у дітей, харчові отруєння у дорослих, менінгіти новонароджених, цистити на ін. Шигели є збудниками епідемічного захворювання – бактеріальної дизентерії. Для них характерна інвазія у епітелій кишечника, що викликає некроз, виразки та кровотечі; постінфекційний імунітет не формується, можливе хронічне бактеріоносійство, рецидиви та реінфекції. У діагностиці таких інфекцій основним методом визначення збудника є бактеріологічне дослідження, бо клінічний перебіг захворювання не завжди дозволяє поставити правильний діагноз. Тому саме виділення чистої культури збудника та її ідентифікація дозволяє підтвердити клінічний діагноз, виявити бактеріоносіїв, встановити джерело інфекції та шляхи її передачі, своєчасно провести протиепідемічні заходи. Зниження рівня захворюваності кишковими інфекціями значною мірою залежить від якості лабораторної діагностики.

Мета: Провести бактеріологічну діагностику колієнтериту та бактеріальної дизентерії.

Конкретні цілі-уміти:

- 1.Трактувати біологічні та патогенні властивості збудників колієнтериту та дизентерії.
- 2.Провести бактеріологічне дослідження при підозрі на колієнтерит.
3. Провести бактеріологічне дослідження при підозрі на дизентерію.
- 4.Визначити культуральні та біохімічні властивості збудників кишкових інфекцій.
- 5.Враховувати результати серологічного дослідження при кишкових інфекціях.
- 6.Вибирати діагностичні, профілактичні та лікувальні препарати за темою та пояснювати принцип їх використання.

Вихідний рівень знань - умінь:

- 1.Розпізнавати патогенні бактерії за біохімічними та антигенними властивостями.
- 2.Вибирати живильні середовища для культивування збудників кишкових інфекцій.
- 3.Пояснювати спосіб отримання та використання пробіотиків (А-бактерин, колібактерин, біфідумбактерин, біфікол, лактобактерин).

Для того, щоб ви могли усвідомити чи відповідає вихідний рівень ваших знань-умінь необхідним вимогам пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання №1 Представники сімейства ентеробактерій відрізняються за здатністю ферментувати певні вуглеводи. Яким чином можна дослідити їхню біохімічну активність?

Завдання №2 Збудники кишкових інфекцій є прототрофами. Це означає, що вони здатні рости: а) на середовищах із додаванням крові або сироватки, б) на простих середовищах, таких як МПА та МПБ, в) у присутності антибіотиків, г) як у аеробних, так і в анаеробних умовах, д) на середовищах, що не містять органічних речовин.

Завдання №3 Для визначення антигенних властивостей кишкових бактерій використовують реакцію аглютинації на склі. Який механізм цієї реакції? За якою ознакою враховується позитивна реакція?

Завдання №4 Для профілактики та лікування кишкових інфекцій досить ефективними є пробіотики. Опишіть їх склад та механізм дії, наведіть приклади.

Інформація для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л.Б. Борисова, А.М. Смирновой. – М.: Медицина, 2005. – С..
2. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – Вища школа, 1992. – С..
3. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л.Б. Борисова. – 1984.-С.44, 107-108, 110.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Систематика кишкових бактерій. Їхні загальні ознаки і властивості, що відрізняють представників окремих родів.
2. Екологія та розповсюдження кишкових бактерій, їхня стійкість у зовнішньому середовищі. Патогенність для людини окремих родів та видів.
3. Роль кишкової палички в організмі людини, її антагоністична активність. Антигенна структура *E.coli*, її зв'язок з патогенними властивостями.
4. Збудники колі-ентеритів. Їхня мікробіологічна характеристика. Епідеміологія, контингент, що уражається.
5. Мікробіологічна діагностика колі-ентеритів.
6. Шигели – збудники дизентерії. Їхня морфологія, культуральні та антигенні властивості, біохімічна активність.
7. Порівняльна вірулентність шигел, токсини, що виділяються ними, їх тропізм. Патогенез дизентерії.
8. Мікробіологічна діагностика бактеріальної дизентерії.
9. Імунітет та бактеріоносійство при дизентерії.
10. Специфічна профілактика та лікування інфекцій, викликаних ешеріхіями та шигелами.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л.Б. Борисова, А.М. Смирновой. – М.: Медицина, 2005. – С.376-389.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - СПб: Специальная литература.1998.- С.373-381.
3. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – Вища школа, 1992. – С. 201-208, 214-216.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред.А.А.Воробьева.- М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008.- С. 355-363.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии/ Под ред.О.В.Бухарина.- М.:Медицина, 2002.- С. 146-164.
6. Люта В.А., Кононов О.В. Мікробіологія.- К.: Медицина, 2008.- С. 218-224, 231-236.
7. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л.Б. Борисова. – 1984.-С.176- 181.
8. Лекція з теми «Збудники бактеріальних кишкових інфекцій: ешеріхії, шигели».

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчанням, чому сприяє граф логічної структури теми:”Мікробіологічна діагностика бактеріальних кишкових інфекцій”(додаток №1).

Матеріали та обладнання: Посіви фекалій на середовищах Ендо, Левіна або Плоскірева. Посіви копрокультури на середовищі Ресселя. Предметні стекла, набір реактивів для фарбування за Граммом, мікроскоп. Типові ОВ – колі-сироватки, видові сироватки до шигел Зоне та Флекснера, піпетки. Набір імунобіологічних препаратів за темою. Таблиці „Мікробіологічна діагностика колі-ентеритів” „Мікробіологічна діагностика дизентерії”, „Ентеробактерії”, „Біохімічні властивості кишкових бактерій”

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Провести бактеріологічне дослідження при підозрі на колієнтерит:
 - а) Розглянути колонії мікроорганізмів на середовищі Ендо, що виростили в результаті посіву фекалій хворого з підозрою на колі-ентерит. Описати типову кольорову колонію.
 - б) Зробити мазок з типової колонії, пофарбувати за Грамом та промікроскопувати. Малюнок занести в протокол.
 - в) Поставити реакцію аглютинації суспензій, приготованих із декількох кольорових колоній (гадано E. coli) зі сумішшю ОВ - сироваток. Вказати число аглютинабельних колоній.
 - г) Поставити реакцію аглютинації аглютинабельних суспензій з типовими ОВ-сироватками. Зробити висновок про видову приналежність і серотип виділеного мікроба. Ознайомитися за таблицями та описати у протоколі дослідження, які необхідно провести для постановки остаточного діагнозу.

2. Провести бактеріологічне дослідження при підозрі на дизентерію:

а) Розглянути посів фекалій хворого з підозрою на бактеріальну дизентерію на середовище Ендо. Звернути увагу на безбарвні колонії. Відмітити культуральні властивості збудника у протоколі. Зробити мазок з типової колонії, пофарбувати за Грамом та промікроскопувати. Малюнок занести в протокол

б) Розглянути посів мікроорганізмів з безбарвної колонії на середовище Ресселя. Відмітити у протоколі спроможність виділеного мікроба ферментувати глюкозу і лактозу.

в) Провести серологічну ідентифікацію копрокультури в реакції аглютинації на склі з полівалентною сальмонельозною сироваткою, а також з видовими сироватками до видів шигел, що зустрічаються найбільш часто - *S.flexneri* та *S.sonnei*. Зробити висновок про видову приналежність збудника.

За таблицею ознайомитися з іншими методами діагностики дизентерії та стисло описати їх у протоколі.

3. Розглянути біопрепарати за темою. Знайти серед них діагностичні, лікувальні та профілактичні. Занести до протоколу назви декількох лікувальних та профілактичних препаратів. Один з препаратів охарактеризувати за схемою: склад препарату, спосіб отримання, механізм дії, показання до його застосування.

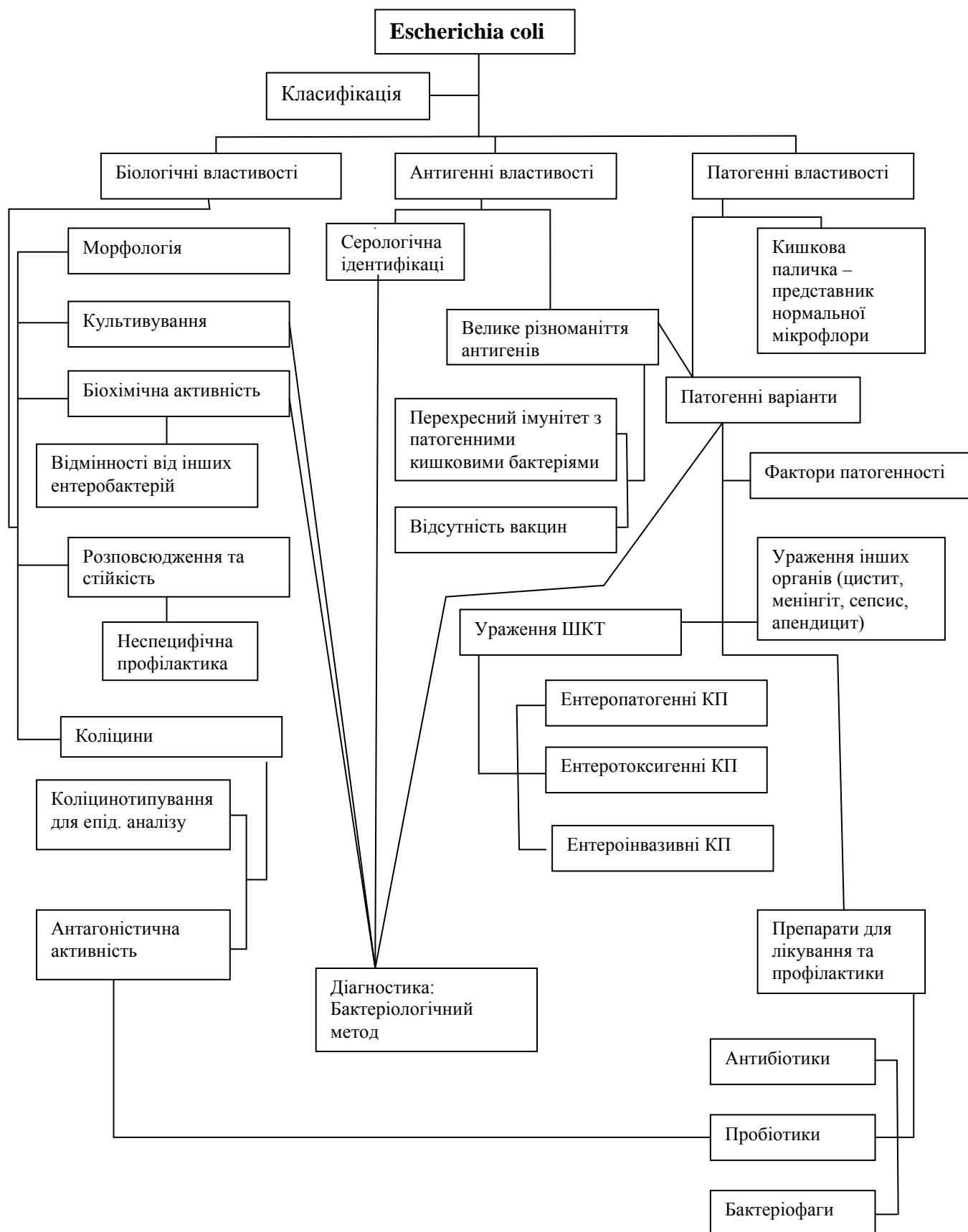
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ході проведення експерименту Вам пропонується виконати наступні навчальні завдання.

1. При бактеріологічному дослідженні фекалій хворого на колієнтерит на середовищі Ендо виявлений ріст колоній червоного кольору. Наявність якого мікроба можна припустити? Які тести застосовуються для визначення виділеного мікроба? За яких умов даний вид бактерій може викликати колієнтерит?

2. З секційного матеріалу людини, що померла в інфекційному відленні з діагнозом гострої дизентерії виділена шигела. Чи міг цей мікроб бути причиною смерті, якщо так, то який вид шигел став причиною смерті?

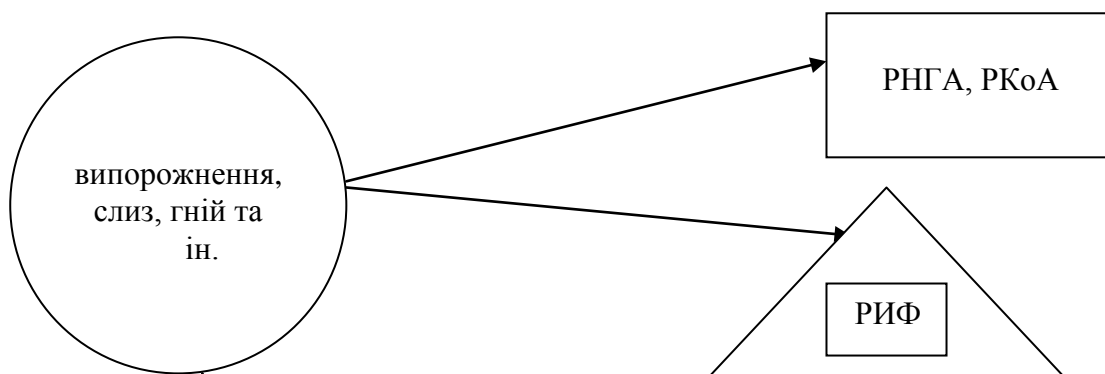
3. У хворого з діагнозом гострої дизентерії при бактеріологічному дослідженні шигели не виявлені. Чи можна на цій підставі відхилити клінічний діагноз? Які рекомендації доцільно дати при повторному бактеріологічному дослідженні, щоб підвищити імовірність виділення збудника?

**Графологічна структура теми
«Ешеріхії. Мікробіологічна діагностика захворювань, спричинених
кишковою паличкою»**



Графологічна структура теми «Шигели. Мікробіологічна діагностика дизентерії»

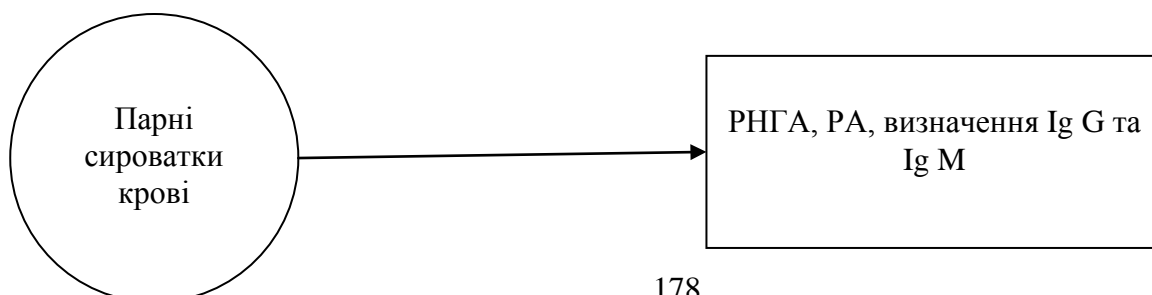
Експрес-метод



Бактеріологічний метод



Серологічний метод



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.3:**

Завдання 1. Бактеріологічна діагностика колі-ентериту.

Патологічний матеріал _____, елективне середовище _____, типові колонії _____.

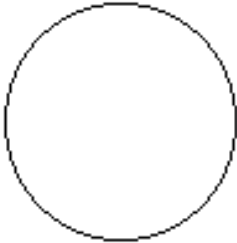


Рис.1. Мазок з кольорової колонії.

З 10 кольорових колоній сумішшю ОВ-сироваток аглютинуються _____.

При аглютинації аглютинабельних суспензій ОВ-сироватками реакція позитивна з типовою сироваткою _____.

Висновок: у хворого виділена ентеропатогенна *E. coli*, серотип _____.

Для остаточного діагнозу необхідно _____.

Завдання 2. Бактеріологічна діагностика дизентерії.

Патологічний матеріал _____,
елективні середовища _____,
типові колонії _____.

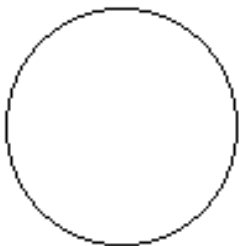


Рис.2. Мазок з безбарвної колонії.

Посів безбарвної колонії на середовище Ресселя: глюкоза _____, лактоза _____.

Серологічна ідентифікація культури в реакції аглютинації з використанням діагностичних сироваток:

Полівалентна сальмонельозна для груп ABCDE _____

Видова Флекснера _____

Видова Зонне _____.

Висновок: з фекалій хворого виділена _____.

Для визначення джерела інфекції проводять _____.

Для ретроспективної діагностики дизентерії, а також стертих форм захворювання використовують _____ метод, ставлять реакції _____; необхідні реактиви _____.

Завдання 3. Біопрепарати для профілактики та лікування інфекцій, спричинених ешеріхіями та шигелами _____

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.4
ТЕМА: САЛЬМОНЕЛИ. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА
ТИФО- ПАРАТИФОЗНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТА
САЛЬМОНЕЛЬОЗНИХ ГАСТРОЕНТЕРИТІВ.

Актуальність теми: Гострі бактеріальні кишкові інфекції залишаються частим і розповсюдженим захворюванням людей. Серед них значна частина припадає на захворювання, спричинених сальмонелами. Сальмонели здатні викликати системні інфекції, такі як черевний тиф та паратифи, а також гастроентерит та госпітальні інфекції. Серйозним ускладненням сальмонельозних інфекцій є бактеріємія, з кров'ю сальмонели можуть потрапити у будь-який орган та викликати осередкові гнійні процеси - від остеомієліту до ендокардиту. Рівень захворюваності на кишкові інфекції залишається високим, незважаючи на поліпшення санітарного стану населених пунктів та умов побуту людей. Однією з причин є те, що санітарна грамотність не завжди призводить до конкретних дій з попередження кишкових інфекцій. Крім того, є цілий ряд причин, пов'язаних з біологією збудників – існування безсимптомних форм інфекції, висока стійкість сальмонел у навколишньому середовищі, широке розповсюдження сальмонельозів серед диких та свійських тварин, що є причиною контамінації харчових продуктів.

Слід пам'ятати, що першими приймають і обслуговують хворих на кишкові інфекції не інфекціоністи, а лікарі поліклінік, швидкої допомоги, дільниці, лікарі приймальних відділень лікарень. Тому успіх боротьби з сальмонельозами багато у чому залежить від їх знань у даній галузі.

Мета(загальна): **уміти** Проводити бактеріологічну та серологічну діагностику тифо-паратифозних захворювань, бактеріологічну діагностику інших сальмонельозів.

Конкретні цілі – уміти:

1. Тракувати біологічні та патогенні властивості сальмонел.
2. Застосовувати придатні методи мікробіологічної діагностики на різних етапах захворювання на черевний тиф.
3. Інтерпретувати результати бактеріологічного дослідження при сальмонельозах.
4. Вибирати діагностичні, профілактичні та лікувальні препарати з теми та пояснювати принцип їх використання.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Описувати морфологію бактерій за результатами мікроскопії.
2. Вибирати живильні середовища для визначення біохімічної активності бактерій.
3. Пояснювати сутність реакції аглютинації.
4. Пояснювати спосіб отримання та використання препаратів (вбита та хімічна вакцина, полівалентний бактеріофаг, діагностичні сироватки)

Для того, щоб Ви могли усвідомити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідним вимогам, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання № 1. Сальмонели – рухливі бактерії, які мають чисельні джгутики, розташовані по всій поверхні клітини. Як називаються такі мікроорганізми? а) монотріхи; б) перітріхи; в) амфітріхи; г) лофотріхи.

Завдання № 2. Які з вказаних поживних середовищ придатне для визначення сахаролітичних властивостей мікроорганізмів: а) кров'яний агар, б) цукровий бульйон, в) середовища Гісса, г) середовище Ресселя, д) середовище Сабуро.

Завдання № 3. При серологічній діагностиці тифо-паратифозних захворювань використовується реакція Відаля, яка є реакцією аглютинації. Що може виступати антигеном у такій реакції?

Завдання № 4. Для профілактики черевного тифу використовується спиртова вакцина. До якого типу вакцин вона належить: а) атенуйована, б) анатоксин, в) вбита, г) хімічна, д) синтетична?

Завдання № 5. Для специфічної профілактики черевного тифу використовується полівалентний бактеріофаг. Який механізм захисної дії цього препарату?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Воробьев А.А. и др. Микробиология.- М.:Медицина, 1998.-С. 59-63,185-188.
2. Дикий И.Л. и др. Микробиология.- К.: ИД «Профессионал», 2004.- С.73-75, 178-179, 290-293.
3. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ под ред. Л.Б.Борисова. – М.:Медицина, 1984.-С.42-47, 107-108.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Сальмонели – збудники тифо-паратифозних захворювань. Їх морфологічні, культуральні та біохімічні властивості. Відмінності від ешеріхій.
2. Антигенні властивості сальмонел, класифікація Кауфмана-Уайта.
3. Джерело, шляхи розповсюдження та вхідні ворота інфекції при черевному тифі. Резистентність збудника в зовнішньому середовищі.
4. Імунітет при тифо-паратифозних захворюваннях. Специфічна профілактика. Типи вакцин, їхня ефективність.
5. Бактеріоносійство при черевному тифі, його діагностика та профілактика.
6. Патогенез черевного тифу. Діагностичні підходи на різних етапах захворювання.
7. Сальмонели – збудники гострих гастроентеритів, їхні біологічні властивості. Шляхи передачі інфекції, патогенез захворювання
8. Лабораторна діагностика сальмонельозів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология/ Под ред. Л.Б. Борисова, А. М. Смирновой. – М.: Медицина, 2005. – с. 389-396.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А.Воробьева.- М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008.- С. 363-369.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии/ Под ред. О.В.Бухарина.- М.: Медицина, 2002.- С. 164-176.
4. Люта В.А., Кононов О.В. Мікробіологія.- К.: Медицина, 2008.- С. 226-229.
5. П'яткиін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992. – С.211-214, 221-226.
6. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ под ред. Л.Б.Борисова. – М.: Медицина, 1984.-С.181- 188.

Матеріали та обладнання: Посів крові на середовище Раппопорт. Мазок з гемокультури. Посіви гемо- і копрокультури на середовище Ресселя. Набір сироваток за Кауфманом-Уайтом. Предметні стекла, піпетки. Готова реакція Відаля. Таблиці: „Мікробіологічна діагностика тифо-паратифозних захворювань”, „Черевний тиф”, „Біохімічні властивості кишкових бактерій”, „Ентеробактерії”.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи:

1. Виділення та ідентифікація гемокультури при підозрі та тифо-паратифозне захворювання:

а) Розглянути посів крові хворого на середовище Раппопорт. Відмітити ознаки росту гемокультури, звернути увагу на зміну кольору індикатора та утворення газу.

б) Промікроскопувати мазок з гемокультури, визначити морфологічні та тинкторіальні властивості збудника, малюнок занести в протокол.

в) Розглянути посів гемокультури на середовище Ресселя, зроблений для накопичення чистої культури і визначення біохімічних властивостей. Відмітити у протоколі спроможність виділеного мікроба ферментувати глюкозу і лактозу.

г) Для визначення видової приналежності збудника провести серологічну ідентифікацію у реакції аглютинації на склі з набором сироваток за Кауфманом - Уайтом. Зробити висновок про видову приналежність збудника.

2. Серологічна діагностика тифо-паратифозного захворювання: врахувати розгорнуту реакцію аглютинації сироватки хворого з О- та Н - діагностикумами черевного тифу, а також діагностикумами паратифів А та В (реакція Відаля). Зробити висновок про наявності та титр відповідних антитіл у крові хворого, уточнити клінічний діагноз.

3. Етапи бактеріологічної діагностики сальмонельозного гастроентериту: користуючись таблицями, підручником та демонстраційними зразками складіть

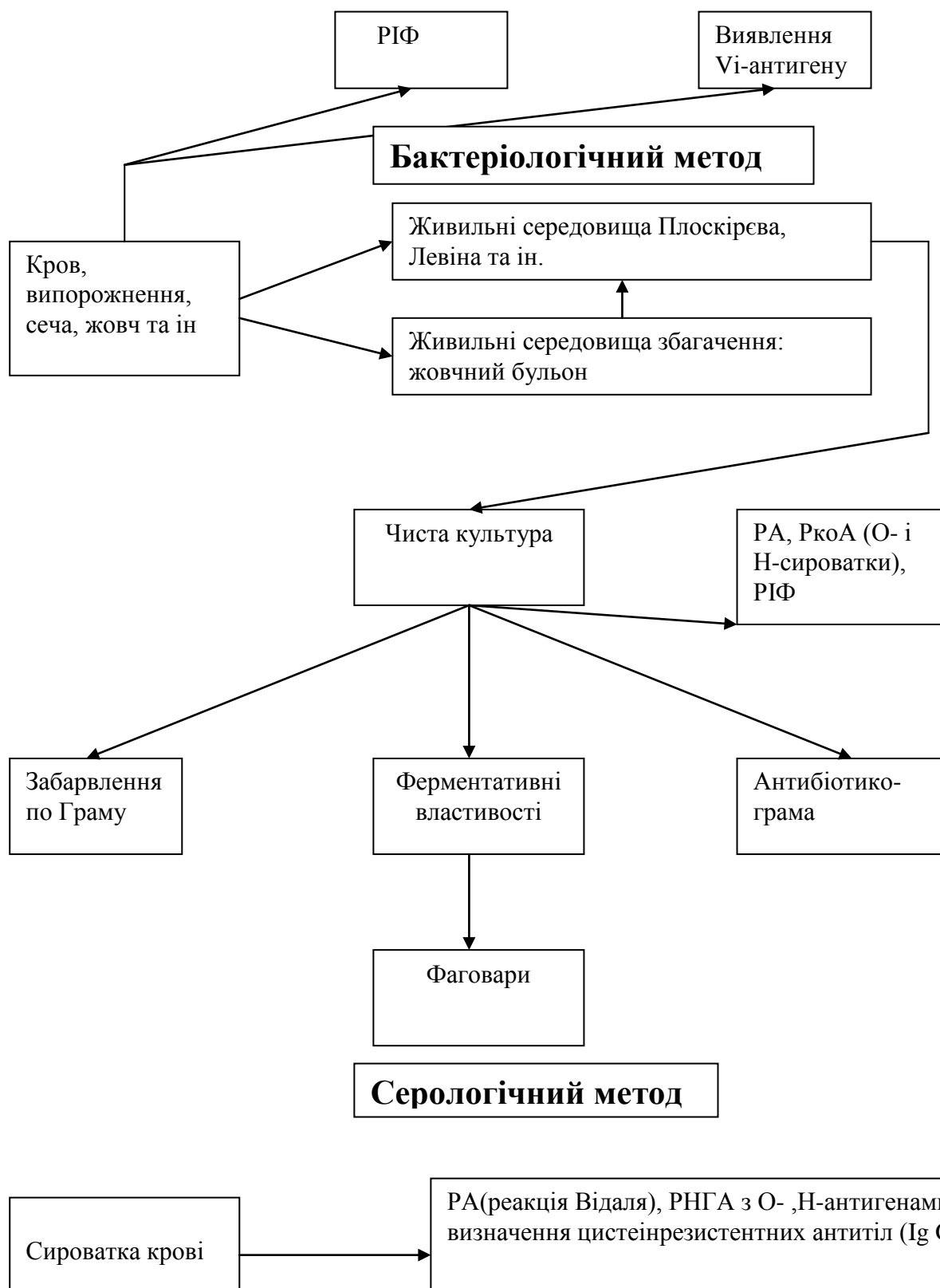
схему бактеріологічного дослідження, у якій відмітьте патологічний матеріал, поживні середовища, ознаки росту, за якими можна відрізнити сальмонели від інших кишкових бактерій, опишіть методику та оцініть значення біохімічної та серологічної ідентифікації збудника. Відобразити у протоколі основні етапи бактеріологічного дослідження, зробити висновок про видову приналежність виділеного збудника.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту Вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. У хворого, що одужує після черевного тифу, різко погіршився стан, з'явилися симптоми «гострого живота». З якими особливостями патогенезу це може бути пов'язане? Які заходи необхідно терміново вжити?
2. До інфекційного відділення надійшов хворий з клінічним діагнозом «черевний тиф» (10-та доба захворювання). *S.typhi* в крові та фекаліях не виявлена. Чи означає це, що діагноз був поставлений помилково? Які дослідження необхідно провести для остаточного висновку?
3. У будівельному загоні в студента, що отримав перед відїздом весь комплекс необхідних щеплень, підвищилася температура без ознак ГРЗ. Є підозра на черевний тиф, але збудник в крові не виявлений. Реакція Відаля позитивна з Н-діагностикумом в титрі 1:100. Чи можна цій підставі підтвердити або відхилити діагноз?
4. До бактеріологічної лабораторії надійшов запит на проведення бактеріологічного дослідження для діагностики черевного тифу (5-та доба захворювання). Який матеріал слід взяти для дослідження? Які поживні середовища слід приготувати для проведення аналізу?

Графологічна структура текми: : „Сальмонели. Мікробіологічна діагностика тифо- паратифозних захворювань та сальмонельозних гастроентеритів”.

Експрес – метод



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.4:**

1. Бактеріологічне дослідження крові при підозрі на тифо-паратифозне захворювання:

Спосіб відбору та необхідний об'єм пат. матеріалу _____

Використані поживні середовища _____

Ознаки росту гемокультури _____.

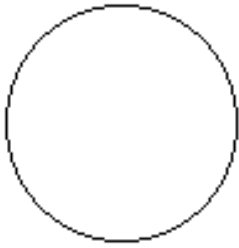


Рис. 1. Мазок з гемокультури. Забарвлення за Грамом

Посів гемокультури на середовище Ресселя: глюкоза _____, лактоза _____.

Серологічна ідентифікація гемокультури за Кауфманом-Уайтом:

| Сироватки сальмонельозні | Полівалентна для груп ABCDE | О-монорецепторні | | | H-монорецепторні | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------|---|---|------------------|---|---|
| | | 2 | 4 | 9 | a | b | d |
| Урахування | | | | | | | |

Висновок: з крові хворого виділена _____.

2. Серологічна діагностика тифо-паратифозних захворювань.

Схема врахування реакції Відаля:

| Діагностикуми | Розведення сироватки хворого (обсяг 0.1 мл) | | | | | | Контроль сироватки - | Контроль антигена |
|------------------------------------|---|--------|--------|--------|---------|---------|-------------------------|----------------------|
| | 1: 100 | 1: 200 | 1: 400 | 1: 800 | 1: 1600 | 1: 3200 | | |
| О-діагностикум черевного тифу | | | | | | | | |
| H - діагностикум черевного тифу | | | | | | | | |
| паратифу А | | | | | | | | |
| паратифу В | | | | | | | | |

Висновок: _____

3. Бактеріологічна діагностика сальмонельозу.

Матеріал, що досліджується _____.

Поживні середовища _____.
Типові колонії _____.

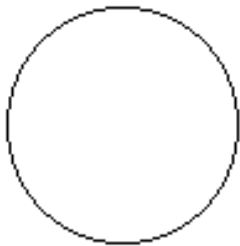


Рис. 2. Мазок з типової колонії, забарвлення за Грамом

Для біохімічної ідентифікації використовуються _____.

Якщо виділено сальмонелу, то _____

Для серологічної ідентифікації використовуються _____.

Висновок: _____

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.5

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ХАРЧОВИХ ТОКСИКО-ІНФЕКЦІЙ ТА ІНТОКСИКАЦІЙ.

Актуальність теми. Розповсюдженню харчових отруєнь допомагає індустріалізація отримання та переробки продовольства, що може привести до інфікування великих партій харчових продуктів. Збільшується також виробництво, переробка та збереження харчових продуктів в індивідуальних господарствах, де зростають можливості порушення технології і зараження харчових продуктів мікроорганізмами. В більшості випадків клініка при харчових токсикоінфекціях стереотипна (гастрит, гастроентерит, ентерит, коліт). Вони можуть проходити подібно гострої дизентерії або холери. Тому лабораторна діагностика даної групи захворювань є обов'язковою. Збудники харчових отруєнь належать до різних морфологічних груп: палички коки, вібріони, гриби.

Мета (загальна): **уміти** оцінювати та аналізувати результати ідентифікації збудників харчових токсикоінфекцій та інтоксикацій за їх морфологічними, біохімічними та біологічними властивостями.

Конкретні цілі – уміти:

1. Класифікувати харчові отруєння та їх збудників.
2. Вибирати придатні живильні середовища для культивування різних збудників харчових токсикоінфекцій та інтоксикацій, розрізняти колонії основних збудників.
3. Розрізняти збудників харчових отруєнь за морфологічними ознаками.
4. Пояснювати роль біологічних властивостей збудників роду *Proteus* для їх ідентифікації.
5. Пояснювати роль кількісного аналізу у діагностиці інфекцій, викликаних умовно-патогенними бактеріями.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Роль відмінностей морфології та біологічних властивостей для ідентифікації бактерій
2. Відмінності ендотоксинів та екзотоксинів бактерій.
3. Етапи та методи виділення чистої культури аеробних бактерій.
4. Живильні середовища та методи ідентифікації анаеробних бактерій

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання №1. Які морфологічні групи бактерій вам відомі?

Завдання №2. Бактерії роду *Proteus* є перитрихами. Що це означає?

Завдання №3. Харчові отруєння можуть викликати *Clostridium perfringens* та *Bacillus cereus*. Чи можна відрізнити клостридії від бацил за результатами мікроскопії, який метод фарбування використовується?

Завдання №4 Назвіть відмінності екзотоксинів від ендотоксинів. Які з них притаманні Gr⁺, а які Gr⁻ бактеріям?

Завдання №5. Назвіть етапи та методи виділення чистої культури аеробних бактерій та анаеробних бактерій.

Завдання № 6. При діагностиці інфекцій, викликаних клебсієлами важливим є виявлення капсули у збудника. Як це можна зробити?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина, 1994. С.25 –31,155-159.

2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.С. 20-24,48, 50-56, 93-95.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Збудники харчових токсикоінфекцій. Їх біологічні властивості. Міжнародна класифікація харчових отруєнь.

2. *Proteus vulgaris* як збудник харчових токсикоінфекцій. Біологічні особливості і розповсюдження. Характер захворювань, що виникають, мікробіологічна діагностика.

3. Клебсієли, їх морфологічні та біологічні властивості. Захворювання, викликані клебсієлами та їх мікробіологічна діагностика.

4. *Pseudomonas aeruginosa* - біологічні властивості і розповсюдження як умовно-патогенного мікроба.

5. *Clostridium perfringens* - збудник харчової інтоксикації. Патогенез, екстрінне лікування та профілактика.

6. Механізм виникнення стафілококової харчової інтоксикації. Характеристика токсину, методи його виявлення.

7. Місце токсикоінфекцій у групі харчових отруєнь. Органи і тканини, що уражаються при харчових токсикоінфекціях.

8. Природні резервуари та джерела поширення збудників харчових токсикоінфекцій.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина,1994. с.145-149,151-159, 170-180.

2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. с.96-104.

3.А.А.Воробьёв та співавтори. Мікробіологія.М. : Медицина,1999, с. 3-19.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми «Збудники харчових токсико-інфекцій та інтоксикацій» (додаток 1).

Матеріали та обладнання: Мікропрепарати бактерій - збудників харчових токсикоінфекцій та інтоксикацій, мікроскоп, посіви збудників харчових токсикоінфекцій на елективних середовищах, демонстраційні посіви протей для визначення його титру у патологічному матеріалі, посіви протей на диференціально-діагностичні середовища.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Розглянути під мікроскопом демонстраційні препарати з бактерій - збудників харчових токсикоінфекцій і інтоксикацій, відмітити характерні морфологічні ознаки. Малюнки занести до протоколу.
2. Розглянути характер росту різноманітних збудників харчових токсикоінфекцій і інтоксикацій на щільних поживних середовищах. Типові колонії описати в протоколі.
3. Врахувати результати бактеріологічного дослідження, яке проводиться при підозрі на харчову токсикоінфекцію протейної етіології. Виявити бактерії роду *Proteus* у патологічному матеріалі або харчових продуктах можна при посівах на щільні середовища (повзучий ріст). Встановлення етіологічної ролі цих умовно-патогенних мікроорганізмів неможливо без проведення кількісних досліджень. Для цього висівають матеріал по 0,1 мл з розведень до 10^{-6} у конденсаційну воду свіжого скошеного агару (метод Шукевича) та вирощують при 37°C протягом 18-24 годин. Визначити та відмітити у протоколі титр збудника за найменшою кількістю засіяного матеріалу, у якому виявлений ріст протей. Розглянути посіви протей на диференціально-діагностичні середовища, відмітити у протоколі біохімічні властивості (таблиця 1), ідентифікувати виділену культуру збудника (таблиця 2).

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. Захворювання на харчову токсикоінфекцію триває 1 - 3 дні. Приблизно такий же час потрібен для бактеріологічної діагностики даного захворювання. Чи є бактеріологічне дослідження необхідним при підозрі на харчову токсикоінфекцію?

2. Серед студентів, які мешкають у гуртожитку, зареєстроване харчове отруєння після вживання в їжу котлет, що протягом доби зберігалися при кімнатній температурі. При бактеріологічному дослідженні з котлет виділені протей, а з патологічного матеріалу - ні. Як довести, що захворювання викликане все-таки протейми?

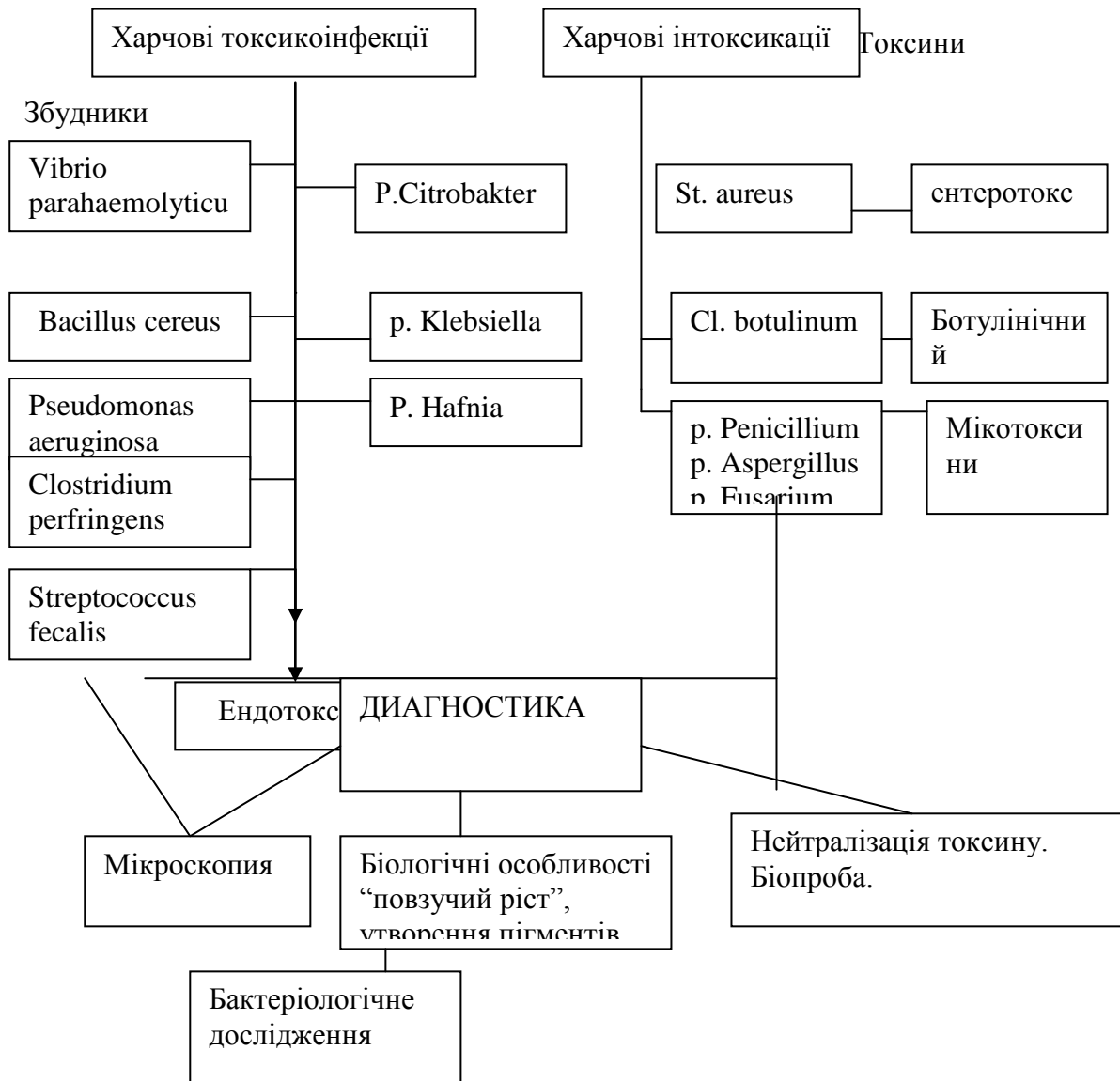
3. До інфекційного відділення протягом доби було доставлено декілька працівників одного комбінату з діагнозом: «Гострий гастроентерит». У всіх відзначене підвищення температури до 38°C, блювота, біль у животі, понос. З анамнезу з'ясовано, що всі вони в обідню перерву їли м'ясний салат, куплений у буфеті підприємства. Який матеріал слід відправити в бактеріологічну

лабораторію для з'ясування етіології даного захворювання? Які мікроорганізми могли його викликати? Як встановити джерело інфекції?

4. У дитячому садку після вживання в їжу сиру у дітей спостерігалось захворювання, що характеризується нудотою, блювотою, поносом. При бактеріоскопії мазків з сиру та блювотних мас виявлені Гр+ коки. Яким буде орієнтовний діагноз? За допомогою яких досліджень його можна підтвердити?

Графологічна структура теми: „Збудники харчових токсикоз-інфекцій та інтоксикацій»

Харчові отруєння



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.5**

Завдання 1. Морфологія збудників харчових токсикоінфекцій та інтоксикацій.

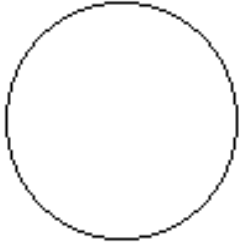


Рис. 1. *Vibrio parahaemolyticus*

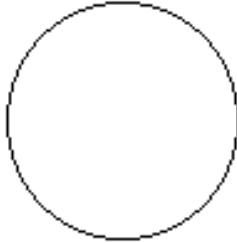


Рис. 2. *Staphylococcus aureus*

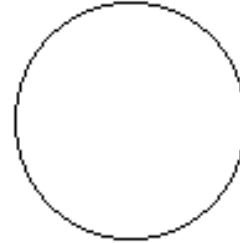


Рис. 3. *Proteus vulgaris*

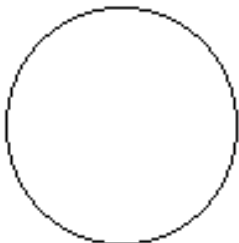


Рис. 4. *Clostridium perfringens*

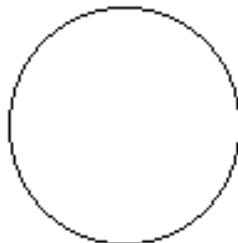


Рис. 5. *Klebsiella*

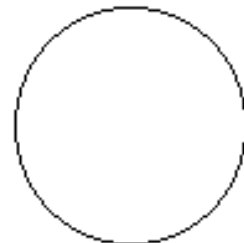


Рис. 6. *Pseudomonas aeruginosa*

Завдання 2. Культуральні властивості збудників харчових токсикоінфекцій:

V. parahaemolyticus на кров'яному агарі _____.

S. aureus на ЖСА _____.

P. vulgaris (проба за Шукевичем) _____.

C. perfringens на середовищі Вільсона-Блера _____.

Klebsiella на МПА _____.

P. aeruginosa на МПА _____.

Завдання 3. Бактеріологічна діагностика харчової токсикоінфекції протейної етіології:

Патологічний матеріал _____.

Елективні та диференціально- діагностичні середовища, що використовуються _____.

Спосіб посіву _____.

Титр протей у досліджуваному матеріалі _____.

Таблиця 1. Біохімічна ідентифікація бактерій роду *Proteus*

| Вид | Ферментація | | | | | Утворення | | | | Розрідженн я желатину |
|-----------------------------------|--------------|-------------------|-------------|-------------|---------------|-----------|---------------------|-------------|------------------------------------|--------------------------|
| | глю- кози | мал ь- този | мані -ту | ксілоз и | салі- цину | індолу | H ₂ S | уреа -зи | Орнітінде - карбокси лази | |
| <i>P. vulgaris</i> | + | + | - | B | B | + | + | + | - | + |
| <i>P. mirabilis</i> | + | - | - | + | B | - | + | + | + | + |
| <i>P. morgani</i> | + | - | - | - | - | + | - | + | + | - |
| <i>P. rettgeri</i> | B | - | + | B | B | + | - | + | - | - |
| <i>P. inconstans</i> | B | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Досліджуван а культура | | | | | | | | | | |

Висновок: харчове отруєння викликане видом _____.

Додаток 3

Таблиця 2. Збудники кишкових інфекцій (за міжнародною класифікацією інфекційних хвороб)

| Гострі кишкові інфекції | Харчові токсикоінфекції | Харчові інтоксикації |
|--|---|--|
| Сімейство Enterobacteriaceae: Триба Esherichieae, р. Esherichia P. Salmonella P. Shigella р. P. Enterobacter Триба Yersinieae Триба Klebsielleae Сімейство Vibrionaceae: Vibrio cholerae Анаероби: Сімейство Bacteroidacea Сімейство Velionellacea | Сімейство Enterobacteriaceae: Триба Esherichieae, р. Citrobacter Триба Klebsielleae, р. Klebsiella р. Hafnia Сімейство Vibrionaceae: Vibrio parahaemolyticus Сімейство Bacillaceae: Bacillus cereus Clostridium perfringens Сімейство Pseudomonadaceae: Pseudomonas aeruginosa Кокова група: Streptococcus faecalis | Бактеріальні білкові токсини: ентеротоксин St. aureus Токсин Cl. botulinum Мікотоксини: Афлотоксини (плісняві гриби P. Penicillium і р. Aspergillus) Фузариотоксин (злакові грибки P. Fusarium) Токсини спорині |

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2.6
ТЕМА: ВІБРІОНИ. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА
ХОЛЕРИ. ХЕЛІКОБАКТЕРІЙ. МІКРОБІОЛОГІЧНА
ДІАГНОСТИКА ХЕЛІКОБАКТЕРІОЗІВ.

Актуальність теми. Холера –це особливо небезпечна кишкова інфекція. В зрівнянні з початком віку кількість захворювання на холеру значно знизилась, але зараз людство переживає 7 пандемію цього захворювання, викликану новим біотопом збудника –*Vibrio cholerae eltor*. За останні 30 років холера неодноразово проникала в південні райони країн СНД. Боротьба з холерою вимагає бистрої та надійної діагностики, проведення глибокого бактеріологічного аналізу, проведення широких протиепідемічних заходів. В період спалахів холери до боротьби з нею приєднуються лікарі самих різних спеціальностей. Вивчення цієї теми дозволяє лікарю скласти уяву про морфологічні, антигенні, патогенні властивості збудників захворювань на холеру та хелікобактеріоз. Висновки в тому, що більшість виразкових явищ мають зв'язок з *H. pylori*, призвело к перегляду погляду на природу виразкового патогенезу. Вивчення властивостей хелікобактерій мають важливе значення для впровадження нових методів лікування виразкового захворювання. Знання цих питань дозволить лікареві зробити вірний вибір діагностики хворих та напрямку лікування.

Мета (загальна): уміти оцінювати та аналізувати результати прискореної та розгорнутої ідентифікації збудників холери та хелікобактеріозів.

Конкретні цілі – уміти:

1. Описувати особливості зросту збудників холери на різних середовищах.
2. Готувати мазки із плівки, та пофарбувати за методом Грама, оцінити рухливість вібріонів та кампілобактерій на препараті “висяча крапля”.
3. Ставити реакцію аглютинації на склі з О-холерною та типовими сироватками та оцінювати результати.
4. Оцінювати сахаролітичні властивості вібріонів на середовищах Хейберга.
5. Аналізувати результати фаготипування, гемаглютинації курячих еритроцитів, еритроцитів барана, поліміксинової проби та реакції Фогеса-Проскауера
6. Оцінювати уреазну, каталазну та оксидазну активність *H. pylori*

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Характеристика морфології та систематики вібріонів та кампілобактерій.
2. Класифікація антигенів збудників кишкових інфекцій.
3. Патогенні властивості бактерій.
4. Живильні середовища для селекції та ідентифікації збудників кишкових інфекцій.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Назвіть морфологічні властивості, та систематичну приналежність вібріонів

Завдання 2. Назвіть антигени ентеробактерій

Завдання 3. Назвіть фактори патогенності бактерій-збудників кишкових інфекцій.

Завдання 4. Назвіть основні селективні та диференціально-діагностичні живильні середовища для бактерій кишкової групи.

Завдання 5. Які фактори патогенності грають роль у пристосуванні хелікобактерій до кислого середовища шлунку?

Завдання 6. Які особливості морфології дозволяють хелікобактеріям пересуватись до поверхні слизових оболонок?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина,1994.С. 27-39, 186-188, 267-269
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.С23-24

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Класифікація та морфологія вібріонів
2. Культуральні та біохімічні властивості збудників холери.
3. Антигени холерних вібріонів: їх значення для діагностики
4. Патогенні властивості збудників холери.
5. Профілактика холери.
6. Методи та етапи мікробіологічної діагностики холери.
7. Біологічні властивості *Helikobacter pylori*
8. Патогенез хелікобактерної інфекції.
9. Сучасні методи діагностики та лікування хелікобактерної інфекції

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. – М.: Медицина, 1994. С.322-326
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - СПб: Специальная литература, 1998.С. 394 –406.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.С 188-193.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє морфологічна структура теми: «Збудники холери та хелікобактерної інфекції» (Додаток 1).

Матеріали та обладнання: культури холерних вібріонів, середовища з поліміксином, вуглеводами по Хейбергу, крохмалю, нітратами предметні стекла, набір фарб для фарбування препаратів за методом Грама, сироватки О-холерна, типові., холерні фаги, спиртівка, мікроскоп.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. З метою прискореної діагностики холери розглянути посіви патологічного матеріалу (фекалії, блювотні маси, вода та ін.) на лужну пептонну воду. Описати в протоколі особливості росту збудника на рідкому поживному середовищі. Приготувати мазок з плівки, що утворилася на поверхні поживного середовища та пофарбувати його за Грамом. Препарат промікроскопувати, малюнок занести до протоколу. Приготувати також препарат «висяча крапля» або «розчавлена крапля», користуючись методом темнопольної мікроскопії оцінити рухливість бактерій.

2. Для розгорнутого бактеріологічного дослідження поставити реакцію аглютинації на склі суспензії бактерій, що досліджуються з О-холерною сироваткою. Врахувати результат реакції.

Поставити нітратно-індолову пробу (реакція холера - рот). Холерні вібріони утворюють індол, відновлюють значну кількість нітратів (KNO_3) середовища в нітрити (KNO_2). При додаванні до 24-годинної культури у пептонній воді концентрованої H_2SO_4 з розрахунку 2-3 краплі на 1 мл культури звільнюється HNO_2 , яка зв'язується з індолом та утворює нітратно-індол (рубіново-червоне забарвлення середовища). Дати попередню відповідь про видову приналежність виділеного збудника.

При підозрі на холеру розглянути посіви патологічного матеріалу на лужний агар для отримання ізольованих колоній. Описати вигляд типової колонії, відсіяти її на скошений агар для накопичування чистої культури. Визначення роду збудника співпадає з п. 2.

Відмінність виділеного збудника від холероподібних вібріонів встановити за допомогою наступних тестів:

а) розгорнута реакція аглютинації культур, що досліджуються з О- холерною сироваткою (врахування готової реакції). Відмити, з якою культурою реакція позитивна до титру аглютинуючої сироватки;

б) визначення діастатичної активності при посіві культури на 1%-ву пептонну воду з 0,5%-ми розчинного крохмалю (середовище Кодама) . Після інкубації при 37°C протягом 6 годин у пробірку додають декілька крапель розчину Люголя. При розкладанні крохмалю синє забарвлення середовища не спостерігається;

в) сахаролітичні властивості - досліджуються при посіві на середовища Хейберга, що містять в якості джерела вуглецю сахарозу, мальтозу чи арабінозу. Ферментація того або іншого цукру призводить до зміни рН середовища, що реєструється за зміною забарвлення індикатора.

Поставити реакцію аглютинації на склі з типовими сироватками Огава та Інаба (для культури, що дала позитивну реакцію з О-холерною сироваткою). Визначити серотип виділеного збудника.

Провести ідентифікацію біотипу виділеного збудника за допомогою наступних тестів:

а) реакція гемаглютинації курячих еритроцитів. На предметне скло наносять краплю фізіологічного розчину і розтирають в ній петлю 18-годинної агарової

культури, додають краплю 2,5%-вої суспензії курячих еритроцитів. В якості контролю використовуються: 1) крапля фізіологічного розчину + крапля 2,5%-вої суспензії еритроцитів, 2) крапля фізіологічного розчину + крапля культури, що досліджується. При позитивній реакції через 1 хвилину настає склеювання еритроцитів. Контролі повинні давати негативний результат. Холерні вібріони Ель-тор аглютинують курячі еритроцити, класичні холерні вібріони - ні;

б) гемолітична активність. У бульйонній культурі вібріону з еритроцитами барана гемоліз настає через 2 години інкубації при 37°C. Раніше спроможність вібріонів Ель-тор лізирувати у рідкому середовищі еритроцити барана вважалася їх основною відмінністю від класичних вібріонів. Зараз ця реакція втратила своє значення для диференціації класичних вібріонів і вібріонів Ель-тор, вона також не є специфічною саме для холерних вібріонів, частіше вона властива для NAG вібріонів. Однак цю властивість необхідно визначати для повної характеристики виділеного штаму;

в) поліміксинова проба. В розплавлений та охолоджений агар додають поліміксин з розрахунку 50 ОД на 1мл, середовище перемішують і розливають у чашки Петрі. На сектори засівають петлею або пастеровською піпеткою культури, що досліджуються. Вібріони Ель-тор ростуть на середовищі з поліміксином, класичні холерні вібріони - ні;

г) реакція Фогеса-Проскауера. Культуру вібріону засівають у пробірку з 5 мл глюкозо-фосфатного бульйону. Через 1-3 доби до 1мл культури, що виросла, додають 0,6 мл -нафтолу та 0,2 мл 40%-вого розчину КОН. Пробірки ставлять у термостат на 30 - 60 хвилин. При позитивній реакції з'являється червоне забарвлення середовища внаслідок утворення ацетилметилкарбінолу з глюкози. Холерні вібріони Ель-тор частіше дадуть позитивну реакцію Фогеса-Проскауера, але можуть і не давати. Класичні холерні вібріони не утворюють ацетилметилкарбінолу, тому реакція негативна;

д) лізіс фагами. Досліджувану культуру було засіяно газом на чашці Петрі і нанесено по краплі холерного фага С та фага Ель-тор 2. Відзначити відсутність росту культури в місці внесення того або іншого фагу.

Результати тестів занести у таблицю, порівняти властивості виділеної культури та відомих біоварів холерного вібріону. Зробити кінцевий висновок з ідентифікації збудника.

3. Ознайомитися з методами мікробіологічної діагностики хелікобактеріозів:

Розглянути гістологічні препарати, пофарбовані гематоксілін-еозином або імпрегновані сріблом за Уортином-Старі. Знайти у препаратах зігнуті, S-подібні, або у вигляді “крил чайки” бактерії, малюнок занести у протокол.

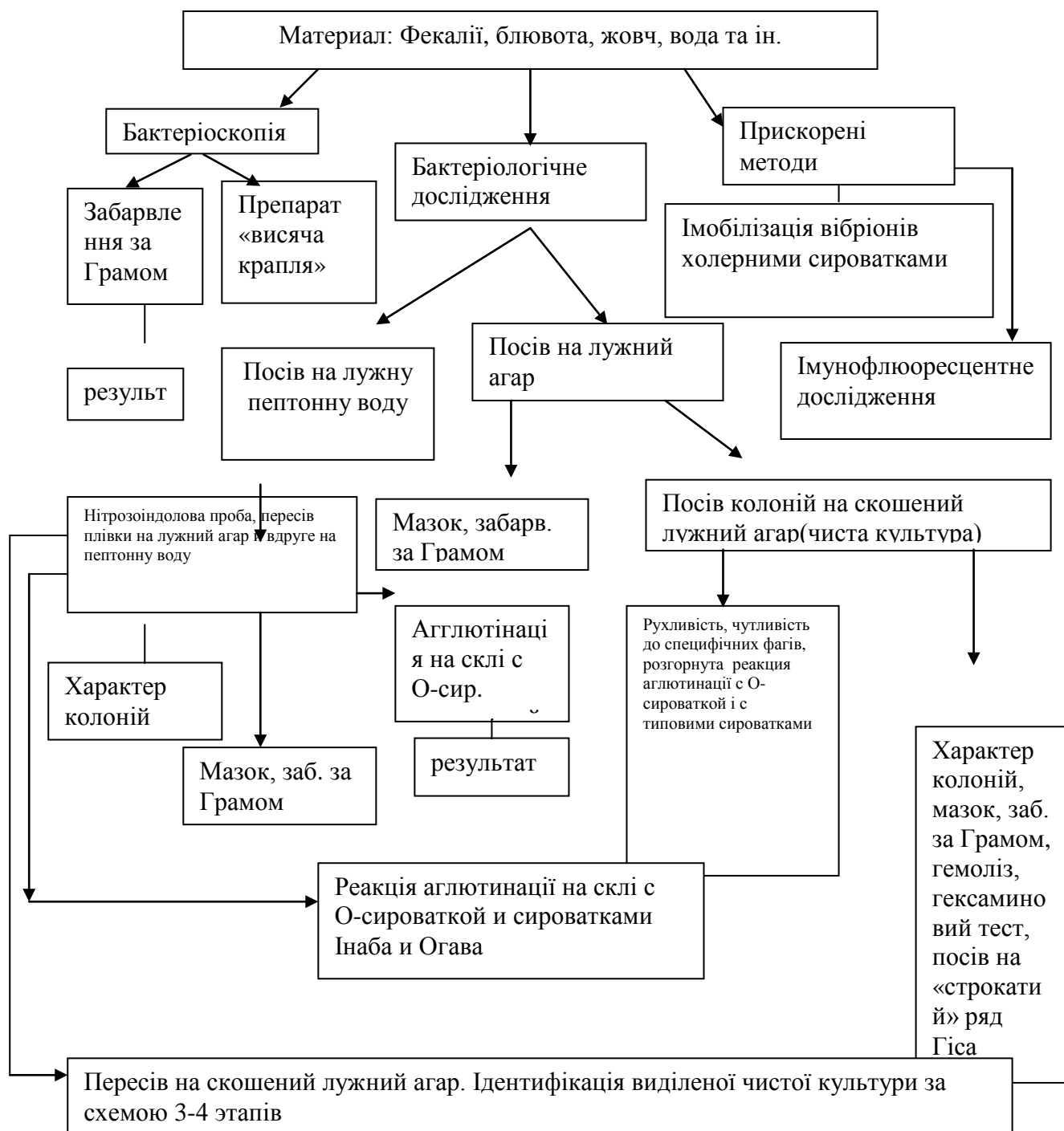
Розглянути посіви чистої культури *H.pylori* на агарі із додаванням 5-17% еритроцитів та антибіотика цефалоспоринолу або на “шоколадному” агарі, які культивувалися у мікроаерофільних умовах (концентрація CO₂ - 5-10%). Описати культуральні ознаки збудника у протоколі.

Ознайомитися із методом індикації *H.pylori* у біоптатах через визначення уреазної активності (кло-тест) та імуноферментними тест-системами для діагностики хелікобактеріозів.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. До інфекційного відділення надійшов хворий з профузним поносом і блювотою. В лабораторію особливо небезпечних інфекцій направлений матеріал - блювотні маси, в яких виявлені Гр- рухливі злегка зігнуті палички. Який метод діагностики був використаний? Поставте попередній діагноз, запропонуйте схему подальшого дослідження.
2. З фекалій хворого на гастроентерит виділена культура, схожа з холерним вібріоном за морфологічними і біохімічними ознаками, але вона не аглютинується О-холерною сироваткою. Які додаткові дослідження треба провести, щоб довести, що виділена культура є холерним вібріоном?
3. У місцевості, у епідемічному відношенні неблагополучної за холерою, досліджені два колодязі з питною водою. В одному з них виявлений холерний бактеріофаг Ель-тор 2, в іншому холерні фаги не виявлені. Дайте висновок про можливість використання води з цих колодязів.
4. Хелікобактерії часто являються причиною виразкової хвороби, гастритів. Які діагностичні дослідження треба провести?

Графологічна структура теми: „Збудники холери та хелікобактерної інфекції” Мікробіологічне дослідження при холері



Зразок протоколу до практичного заняття № 2.6

Завдання 1. Прискорена діагностика холери:

Патологічний матеріал _____.
 Поживне середовище _____,
 Ріст на середовищі _____.

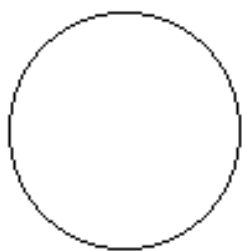


Рис. 1. Вібріони. Мікроскопія плівки, що утворилася на рідкому поживному середовищі

Рухливість _____.

Завдання 2. Розгорнута діагностика холери.

Аглютинація з О-холерною сироваткою _____.

Нітрозо-індолова проба _____.

Попередня відповідь _____.

Бактеріологічний метод діагностики холери:

Патологічний матеріал _____.

Поживні середовища _____,

ріст на середовищах _____.

Відмінності від холероподібних вібріонів:

а) реакція з О-холерною сироваткою _____.

б) діастатична активність _____.

в) біохімічні властивості (ферментація вуглеводів):

сахароза _____, маноза _____, арабіноза _____.

РА з типовими сироватками: Огава _____, Інаба _____.

Тести ідентифікації біоварів холерного вібріону.

| Тести | <i>Vibrio cholerae</i> asiatica | <i>Vibrio cholerae</i> el- tor | Досліджувана культура |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| РГА з курячими еритроцитами | - | + | |
| Гемоліз еритроцитів барана | - | + | |
| Ріст на середовищі з поліміксином | - | + | |
| Реакція Фогеса - Проскауера | - | + | |
| Лізіс фагами: фаг С | + | - | |
| Фаг Ель-тор2 | - | + | |

Висновок: виділений холерний вібріон, біовар _____, серотип _____.

Завдання 3. Мікробіологічна діагностика хелікобактеріозів.
бактеріоскопічне дослідження

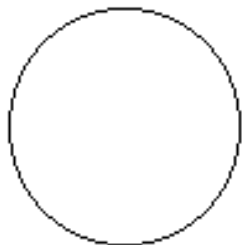


Рис. 2. Н. pylori у біоптаті

Бактеріологічне дослідження хелікобактеріозу.

пат.матеріал _____

поживне середовище _____

умови культивування _____

типові колонії _____

Інші методи діагностики хелікобактерної інфекції

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2.7

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ДИФТЕРІЇ, КАШЛЮКУ ТА ПАРАКАШЛЮКУ.

Актуальність теми. Дифтерія і кашлюк - в минулому епідемічні захворювання, що уражають здебільшого дітей. Обов'язкова імунізація, виявлення хворих і носіїв, використання сучасних методів діагностики значно знизили захворюваність, однак не вплинули на розповсюдження збудника серед людей, не зменшили числа бактеріоносіїв, за рахунок яких підтримується епідемічний процес. В останні роки випадки дифтерії стали реєструватися у виці після 15-17 років, коли штучний імунітет різко знижується, що ставить завдання захисту від дифтерії старших вікових груп. Кашлюк також продовжує реєструватися, незважаючи на планові щеплення. Особливо він небезпечний для дітей раннього віку. Рання діагностика захворювань, що викликаються бордетелами, сприяє своєчасному призначенню специфічної терапії, знижує число ускладнень.

Мета (загальна): уміти проводити мікробіологічну діагностику дифтерії, кашлюку та паракашлюку. Освоїти принципи специфічної профілактики та терапії даних захворювань

Конкретні цілі – уміти:

- 1.Інтерпретувати біологічні властивості збудників дифтерії, кашлюку та паракашлюку.
- 2.Підібрати елективні та диференціально-діагностичні, середовища, які використовуються у бактеріологічній діагностиці дифтерії і коклюшу, оцінити культуральні та біохімічні властивості збудників.
- 3.Пояснювати роль факторів патогенності збудників дифтерії, кашлюку та паракашлюку. Уміти визначати токсигенність мікроорганізмів.
- 4.Вибірати препарати специфічної профілактики та специфічного лікування, серодіагностики захворювань, та ідентифікації бактерій по антигенним властивостям.

Вихідний рівень знань – умінь:

- 1.Пояснювати зв'язок між хімічним складом, структурою та функцією структурних елементів бактеріальної клітини та її тінкторіальними властивостями.
- 2.Знання локалізації, хімічного складу мікробних антигенів та їх ролі в імунній відповіді.
- 3.Механізми обміну генетичним матеріалом у бактерій.
- 4.Знати методи специфічної профілактики та специфічної терапії.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Який зв'язок та значення мають структури бактеріальної клітини, та хімічний склад?

Завдання 2. Перелічіть відомі вам мікробні антигени.

Завдання 3. Дайте пояснення термінів: токсигенність, токсичність.

Завдання 4. Перелічить механізми обміну генетичним матеріалом між бактеріями

Завдання 5. У дифтерійної палички тільки лізогенні штами є токсигенними.

Поясніть цю фразу.

Завдання 6. Збудник кашлюку здатен дисоціювати на S та R форми. Чим вони відрізняються?

Завдання 7. Для визначення токсигенності дифтерійної палички використовують реакцію преципітації у гелі. Який реактив необхідний для її постановки?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова,- М.: Медицинское информационное агентство, 2005. - С.30-45, 107-112, 190-199, 273, 339-347.
2. Микробиология /Под ред. А.А.Воробьева и др. - М.: Медицина, 1994. - С.213-215, 217-219.
3. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.- С.274-283, 316-332.Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.- С.155-157,164-169.
4. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-142 с.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.-С. 128-260.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

- 1.Загальна характеристика бактерій роду *Corynebacterium*.
- 2.Морфологічні і культуральні властивості збудників дифтерії.
- 3.Токсигенність збудника дифтерії. Патогенез захворювання.
- 4.Антигени *C. diphtheriae*, особливості імунітету та специфічної профілактики дифтерії.
- 5.Методи, що застосовуються для мікробіологічної діагностики дифтерії.
- 6.Морфологія та культуральні властивості бордетел.
- 7.Патогенез захворювань, що викликаються бордетелами.
- 8.Антигени збудника коклюшу, імунітет, специфічна профілактика.
- 9.Етапи мікробіологічної діагностики коклюшу.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология// Под ред. Л.Б.Борисова,- М.: Медицинское информационное агентство, 2005. - С. 421-423, 432-436.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - СПб: Специальная литература, 1998.- С. 408-414.
3. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992.- С.240-243, 286-292.
- 4.Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л. Б. Борисова. – М.: Медицина, 1984.- С.160-162, 171-175.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання,чому сприяє граф логічної структури теми: «Мікробіологічна діагностика дифтерії, кашлюку та паракашлюку.» (додаток №1).

Матеріали та обладнання: пофарбовані препарати *C. diphtheriae* та *B. pertussis*, мікроскоп; посіви дифтерійних бактерій на середовищах Ру, Бучина, Клауберга, Тінсдаля; посіви бордетелл на середовищах Борде-Жангу, КВА; середовища з глюкозою, сахарозою, крохмалем, цистеїном, сечовиною та цитратом. Таблиці „Мікробіологічна діагностика дифтерії”, „Мікробіологічна діагностика кашлюку та паракашлюку”, „Реакція преципітації”.

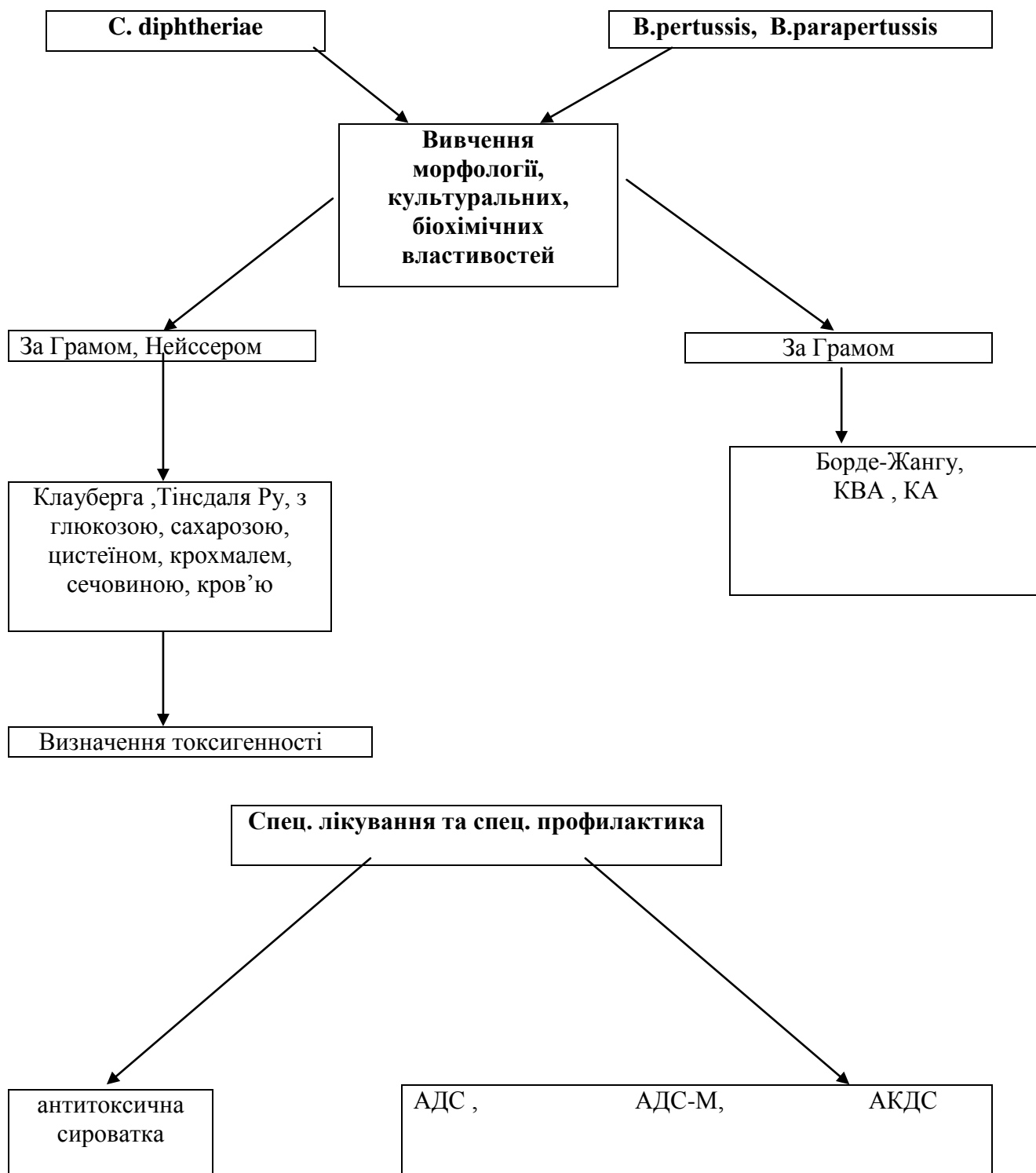
Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Розглянути під мікроскопом препарати *C. diphtheriae* (забарвлення за Грамом та за Нейссером), звернути увагу на наявність та розташування волютинових гранул у клітинах та на розташування самих клітин у мазку. Малюнки занести у протокол та підписати.
2. За демонстраційними посівами та таблицями вивчити етапи виділення чистої культури збудника дифтерії. Описати у протоколі поживні середовища і особливості росту збудника на них (колір, форма, розміри, поверхня колоній), для диференціально-діагностичних середовищ відмітити наявність або відсутність ферментації субстрату. Ознайомитися з прискореним методом діагностики дифтерії.
3. Визначити токсигенність виділеної культури методом преципітації в агарі. Для цього на поверхні щільного поживного середовища у чашці Петрі помістити смужку фільтрувального паперу, насичену антитоксичною протидифтерійною сироваткою. На рівній відстані від неї підсіяти виділені від хворих і носіїв культури *C. diphtheriae*, в якості контролю використовують явно токсигенний штам. Реакція враховується за утворенням ліній преципітації в агарі.
4. Провести бактеріоскопічне дослідження при підозрі на кашлюк, для цього промікроскопувати мазки *B. pertussis*, пофарбовані за Грамом. Звернути увагу на розміри клітин збудника, характер забарвлення. Малюнок занести до протоколу.
5. Розглянути посіви, які демонструють виділення чистої культури збудника кашлюку. Описати в протоколі методи відбору патологічного матеріалу, використовувані елективні та диференціально-діагностичні середовища, характер росту *B. pertussis* на цих середовищах. Описати в протоколі наступні етапи бактеріологічного дослідження, методи ідентифікації збудників кашлюку та паракашлюку.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. З зіву здорової дитини виділена Гр+ паличка. В мазку розташовується частоколом, розщеплює глюкозу, утворює уреазу, проба на цистіназу та токсигенність негативна. Чи є дитина носієм дифтерійної палички?
2. У дитини, хворої на токсичну форму дифтерії, реакція на введення розведеної 1: 100 кінської сироватки виявилася різко позитивною. Якою повинна бути тактика лікаря в лікуванні цієї дитини?
3. Із слизової носу виховательки дитячого саду виділена *C. diphtheriae*. Чи можна допускати її до роботи з дітьми?
4. У дитини спостерігаються клінічні ознаки кашлюку, однак на кашлюк вона хворіла рік тому. Які дослідження необхідно провести для уточнення діагнозу?

**Графологічна структура теми:
«Мікробіологічна діагностика дифтерії, кашлюку та паракашлюку»**



Протокол до практичного заняття № 2.7

Тема: Мікробіологічна діагностика дифтерії, кашлюку та паракашлюку.

1. Бактеріоскопічне дослідження при підозрі на дифтерію.

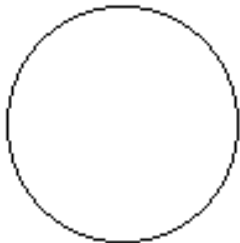


Рис. 1. *C. diphtheriae*. Забарвлення за Грамом

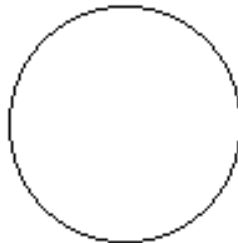


Рис. 2. *C. diphtheriae*. Забарвлення за Нейссером

2. Бактеріологічна діагностика дифтерії:

Патологічний матеріал _____.

Ріст на середовищах: Ру _____,
 Клауберга _____,
 Бучина _____,
 Тінсдаля _____,
 з глюкозою _____,
 з сахарозою _____,
 з цистеїном _____,
 з крохмалем _____,
 з сечовиною _____,
 з кров'ю _____.

Прискорений метод діагностики дифтерії: (описати використане поживне середовище та спосіб виявлення збудника)

_____.

3. Визначення токсигенності виділеного штаму *C. diphtheriae*.

Умовні позначення:

- 1.Смужка фільтрувального паперу, насиченого протидифтерійною сироваткою
- 2.Контрольний посів явно токсигенного штаму дифтерійної палички
- 3.Посіви культур, виділених від хворих з підозрою на дифтерію
- 4.Лінії преципітації

Рис.3.Визначення токсигенності дифтерійної палички методом преципітації в агарі

Висновок: токсигенною є культура, виділена від хворого № _____.

4. Бактеріоскопічне дослідження при підозрі на кашлюк.

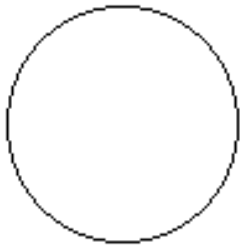


Рис. 4. *Bordetella pertussis*. Забарвлення за Грамом

5. Бактеріологічна діагностика коклюшу.

Патологічний матеріал _____.

Ріст на середовищах: Борде-Жангу _____,

КВА _____,

МПА _____

з кров'ю _____,

з сечовиною _____,

з цистеїном _____.

Подальші етапи ідентифікації коклюшних бактерій _____

_____.

Підпис викладача: _____

Ферментативні особливості коринебактерій

| Ферментація | Коринебактерії | | | | | |
|-------------|----------------|-------|--------|---------|------|------------|
| | дифтерії | | Гофман | Ксерози | Акне | дифтероїди |
| | Gravis | Mitis | | | | |
| Сечовини | - | - | + | + | | В |
| Глюкози | + | + | - | + | + | + |
| Маніту | - | - | - | - | + | - |
| Мальтози | + | + | - | + | + | В |
| Сахарози | - | - | - | + | - | В |
| Галактози | + | + | - | + | - | - |
| Крохмалю | + | - | - | - | - | - |
| Декстрану | + | - | - | + | - | - |
| Глікогену | + | - | - | - | - | - |

Розпізнавальні ознаки бордетел

| Ознаки | | Вид мікроба | | |
|--------------------------|------|---------------------|--|------------------------------------|
| | | B. pertussis | B. parapertussis | B. bronchoseptica |
| Ріст на МПА | | Не росте | Росте з коричневим забарвленням | Росте |
| Ріст на МПА з тирозином | | Не росте | Росте з яскраво-коричневим забарвленням | Росте без зміни кольору середовища |
| Ріст на КВА | | Колір не змінюється | Колір середовища змінюється на буро-коричневий | Колір не змінюється |
| Ріст на кров'яному агарі | | Колір не змінюється | Викликає потемнення середовища | Колір не змінюється |
| Наявність уреаз | | Немає | Є | Є |
| Анти-генні факто - ри | Рід | - | 7 | - |
| | Вид | 1 | 14 | 12 |
| | Інші | 2,3, 4, 5, 6 | 8, 9,10 | 8, 9, 10, 11 |

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.8

ТЕМА: МІКОБАКТЕРІЇ

Актуальність теми Зниження існуючого рівня захворюваності населення туберкульозом може бути досягнуто при вирішенні комплексу проблем: подоланні лікарської стійкості збудників, підвищенні ефективності вакцини, розробкою надійних методів діагностики захворювань, пов'язаних із L-формами та формами мікобактерій туберкульозу, що фільтруються, а також з нетиповою локалізацією збудника, а також поліпшенням соціально-побутових умов життя людей. Виділення *M.tuberculosis* в різноманітному патологічному матеріалі в залежності від органу, що уражається, має вирішальне значення не тільки для діагностики захворювання, але і для прогнозування його перебігу, для вибору раціональної схеми протитуберкульозної терапії та оцінки її ефективності. Клінічна картина при пневмоніях, що викликаються іншими збудниками майже ідентична. Це підвищує роль мікробіологічних методів у діагностиці даних захворювань.

Мета (загальна): уміти оцінивши вплив біологічних властивостей кислотостійких бактерій на організм людини, та враховуючи особливості взаємодії мікобактерій з популяцією людини і зовнішнім середовищем, провести діагностику мікобактеріозів.

Конкретні цілі – уміти:

- 1.Провести бактеріоскопічну діагностику туберкульозу і мікобактеріозів.
- 2.За допомогою бактеріологічного методу діагностувати туберкульоз.
- 3.Інтерпретувати результати алергологічного методу діагностики туберкульозу.
- 4.Використовувати біологічний метод у діагностиці мікобактеріозів.
- 5.Трактувати особливості імунітету при туберкульозі та уміти використовувати спецпрофілактику.

Вихідний рівень знань – умінь:

- 1.Знати форми імунних відповідей (кафедра мікробіології).
- 2.Знати біомолекулярну організацію ліпідів, жирних кислот (кафедра біохімії).
- 3.Пояснювати зв'язок між хімічним складом, структурою та функцією структурних елементів бактеріальної клітини (кафедра мікробіології).
- 4.Знати механізми дії сульфаніламідних та антибіотичних препаратів (кафедра мікробіології).

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання1. Який зв'язок та значення мають хімічний склад та структури бактеріальної клітини.

Завдання2. Назвіть відомі Вам методи, які можна використати для діагностики інфекційних захворювань.

Завдання 3. Представники яких груп антибактеріальних препаратів впливають на кислотостійкі мікроорганізми?

Завдання 4. Перелічити знайомі Вам складні методи фарбування, та вибрати придатну методику фарбування кислотостійких мікроорганізмів.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с.187-191, 437-444.
2. Биохимия/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. с.287-297.
3. Воробйов А.А. з співавторами. Мікробіологія. М.: Медицина. 1999.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Збудники туберкульозу і мікобактеріозів: мікробіологічні характеристики, типи, особливості тінкторіальних властивостей.
2. Мікробіологічні методи діагностики туберкульозу.
3. Особливості імунітету при туберкульозі. Епідеміологія туберкульозу. Стійкість збудника у зовнішньому середовищі.
4. Специфічна профілактика. Характеристика вакцини.
5. Інші патогенні мікобактерії. Мікробіологічна діагностика лепри.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б. Борисова,- М.: Медицинское информационное агентство, 2005. - С. 436-443.
2. Микробиология /Под ред. А.А.Воробьева и др. - М.: Медицина, 1994. - С.213-215, 217-219.
3. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.- С.274-283, 316-332.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.- С.155-157,164-169.
4. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-142 с.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графіологічна структура теми: «МІКОБАКТЕРІЇ» (додаток №1).

Матеріали та обладнання: мікропрепарати бактерій туберкульозу (у харкотинні та корд-фактор); середовища Левенштейна-Йенсена та картопляно-гліцеринова з посівами *M. tuberculosis*. Таблиці „Мікробіологічна діагностика туберкульозу”, „Мікобактерії”, „Лепра”. Імунобіологічні препарати за темою.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

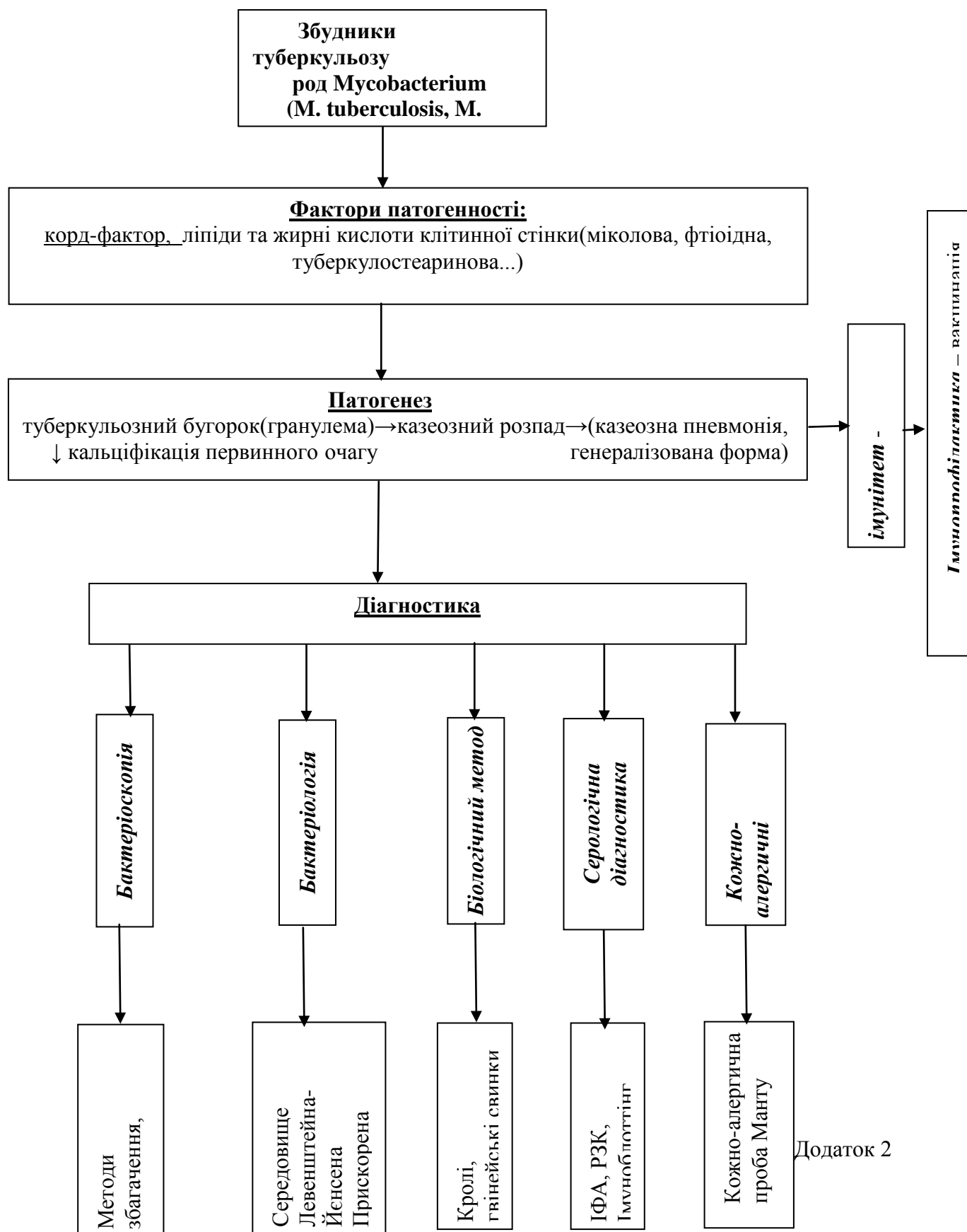
1. Промікроскопувати мазок мокроти хворого на туберкульоз, пофарбований за Цилем-Нільсеном, а також препарат мікроколоній *M. tuberculosis*, вирощених за методом Прайса. Знайти у мазках кислотостійкі бактерії, звернути увагу на розташування клітин збудника у пат. матеріалі та у мікроколоніях.
2. Вивчити і описати в протоколі культуральні властивості *M. tuberculosis* на середовищах Левенштейна-Йенсена і Павловського (картопляно-гліцеринове середовище), відзначити швидкість росту і утворення пігменту.

3. Вивчити і схематично описати в протоколі подальші етапи бактеріологічного дослідження при діагностиці туберкульозу (біохімічні тести та визначення чутливості до хіміотерапевтичних препаратів). Зробити висновок щодо видової приналежності збудника та вказати придатні хіміотерапевтичні засоби.
4. За таблицями ознайомитися із біологічним методом діагностики туберкульозу. Відмітити у протоколі, які тварини найбільш придатні для виявлення мікобактерій людського та бичачого типу, та як враховуються результати біопроби.
5. Розглянути діагностичні та профілактичні біопрепарати з теми, відібрати з них ті, що використовуються для постановки алергічної проби та для серологічної діагностики туберкульозу.
6. Промікроскопувати зішкряб шкіри хворого на лепру, пофарбований за Цилем-Нільсеном. Знайти у препараті внутрішньоклітинно розташовані скупчення кислотостійких бактерій.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. Жінка з відкритою формою туберкульозу легенів народила дитину доношену з нормальною масою тіла. Мати стурбована тим, що її дитина хворою туберкульозом. Яка тактика лікаря?
2. Батьки заперечують проти вакцинації дитини вакциною БЦЖ, тому що у родині немає і ніколи не було хворих туберкульозом. Як повинен надійти лікар?
3. В сечі хворого з підозрою на туберкульоз нирок виявлені кислотостійкі бактерії. Підтверджує чи це клінічний діагноз? Які необхідно провести додаткові дослідження?

Графологічна структура теми: «МІКОБАКТЕРІЇ»



Додаток 2

**Зразок протоколу
до практичного заняття №2.8**

1. Бактеріоскопічне дослідження при підозрі на туберкульоз:

Патологічний матеріал _____

Методи забарвлення _____

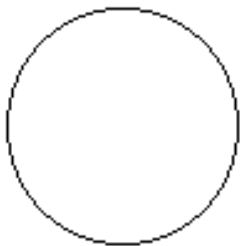


Рис. 1. *M. tuberculosis*

2. Прискорений метод діагностики туберкульозу

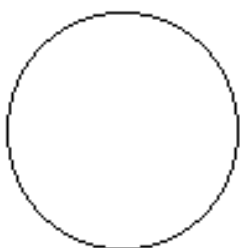


Рис. 2. Мікроколонії *M. Tuberculosis* (за методом Прайса)

3. Культуральні властивості *M. tuberculosis*:

На середовищі Левенштейна-Йенсена _____

На картопляно-гліцериновому середовищі _____

4. Схема подальшого дослідження при діагностиці туберкульозу

Біохімічні тести: ніацинова проба _____,

пероксидазна активність _____, термостабільність каталази _____,

Чутливість до хіміотерапевтичних препаратів:

Стрептоміцин _____, ПАСК _____,

Тубазид _____, Циклосерин _____,

Етіонамід _____.

Постановка біопроби: використовувані тварини _____,

результати зараження _____.

5. Діагностичні препарати

для серодіагностики _____,

для алергічної проби _____.

6. Бактеріоскопічна діагностика лепри.

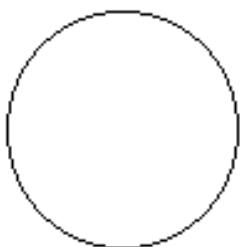


Рис. 3. Зішкряб шкіри хворого. Забарвлення за Цилем-Нільсеном

Дата _____

Підпис викладача: _____

Властивості мікобактерій

| Властивості | M. tuberculosis | M. bovis | M. avium | M. smegmatis |
|--|-----------------|----------|----------|--------------|
| Швидкість зростання | Поволі | Поволі | Поволі | Швидко |
| Утворення пігменту в темряві | - | - | - | +/- |
| Зростання при 22°C на яєчному середовищі | - | - | +/- | + |
| Зростання на МПА | - | - | - | + |
| Пероксидазна активність | + | + | - | - |
| Термостабільність каталази | - | - | + | + |

Клінічні границі стійкості мікобактерій:

Стрептоміцин - 5 мкг/мл

ПАСК - 10 мкг/мл

Тубазид - 1 мкг/мл

Циклосерин - 30 мкг/мл

Етіонамід - 30 мкг/мл

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2.9
ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА
КЛОСТРІДІАЛЬНИХ АНАЕРОБНИХ ІНФЕКЦІЙ.

Актуальність теми. Звичайно, клостридальні анаеробні інфекції розвиваються після попадання в рану ґрунту, що містить збудника. Однак почастишали випадки захворювання, пов'язані з діями медичних робітників (ін'єкції, операції, інструментальні обстеження, проведені з використанням перев'язочного і шовного матеріалу, приладів та інструментів, заражених клостридіями або їхніми спорами внаслідок порушення правил асептики, антисептики, стерилізації. При раневій анаеробній інфекції уражаються, як правило, нижні кінцівки, в випадку нетипової локалізації процесу (легені, кишечник, щелепи, матка та ін.) діагноз встановлюється занадто пізно, що призводить до високої летальності. Саме так ускладнює діагностику нетипова для харчових отруєнь клінічна картина при ботулізмі.

Мета(загальна): провести мікробіологічну діагностику газової гангрені, правця, ботулізму.

Конкретні цілі – уміти:

1. Характеризувати біологічні властивості збудників клостридальних анаеробних інфекцій.
2. Пояснювати роль та механізм дії факторів патогенності збудників газової гангрені, правця, ботулізму.
3. Інтерпретувати результати різних методів мікробіологічних досліджень з діагностики анаеробних інфекцій.
4. Вибирати препарати для специфічного лікування та специфічної профілактики клостридальних анаеробних інфекцій.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Аналізувати та пояснювати морфологічні, біохімічні, тінкторіальні властивості клостридій.
2. Використовувати складні методи фарбування: Грама, Ожешки, Бурі-Гінса.
3. Створювати умови для культивування анаеробів.
4. Характеризувати особливості антитоксичного імунітету.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Поясніть: яке значення мають спори бактерій? Чим обумовлена висока стійкість спор до зовнішнього впливу?

Завдання 2. Збудник газової гангрені є облігатним анаеробом, але певною мірою проявляє аеротолерантність. Поясніть підкреслені терміни.

Завдання 3. Наведіть приклади методів та поживних середовищ для культивування анаеробів.

Завдання 4. Патогенність клостридій в основному пов'язана з токсиноутворенням. Вкажіть властивості екзотоксинів: а) білкова природа, б)

специфічність дії, в) міцний зв'язок з клітинною стінкою, г) термостабільність, д) мають властивості гаптенів, е) можуть бути виявлені за допомогою РН.

Завдання 5. Як можна створити штучний активний та пасивний антитоксичний імунітет?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с.70-80, 130-131
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 1994.
3. Микробиология /Под ред. А.А.Воробьева и др. - М.: Медицина, 1994.
4. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.
5. Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.
6. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Загальна характеристика патогенних клостридій.
2. Збудник правця. Особливості токсиноутворення і серовари. Джерела інфекції, шляхи зараження, перші ознаки захворювання.
3. *Збудники газової гангрені. Механізм виникнення захворювання.*
4. Збудник ботулізму. Основний фактор патогенності, шляхи зараження, патогенез захворювання.
5. Метод мікробіологічної діагностики клостридiальних інфекцій.
7. Специфічна профілактика і лікування інфекцій, викликаних патогенними клостридiями.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с.421-437.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 1994. - С. 327-338
3. П'яткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.- С. 262-274.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.- С. 141-149.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: “Мікробіологічна діагностика клостридiальних анаеробних інфекцій”(додаток 1).

Матеріали та обладнання: пофарбовані за Грамом мазки - препарати некротизованої тканини, мікроскоп; посіви анаеробів на середовищах Кітта-

Тароцци, Вільсона-Блера, та за методом Веньяль-Війона; сироватка людини, котра отримала щеплення проти правця, правцевий еритроцитарний діагностикум, діагностичні, лікувальні та профілактичні біопрепарати за темою. Таблиці: «Спори у бактерій», «Мікробіологічна діагностика ботулізму», «Мікробіологічна діагностика анаеробної раневої інфекції».

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. З метою бактеріоскопічної діагностики раневої анаеробної інфекції промікроскопувати мазки з патологічного матеріалу (гній з рани, некротизована тканина), пофарбовані за Грамом. Звернути увагу на розміри клітин збудника, наявність чи відсутність спор, присутність сторонньої мікрофлори. Малюнок занести до протоколу.
2. Врахувати результати посіву матеріалу, що досліджується, на молоці та на середовищі Кітта-Тароцци (описати зміни поживного середовища), на середовищі Вільсона-Блера та за методом Віньяль-Вейона (описати морфологію ізолюваних колоній). Приготувати мазок з типової колонії і пофарбувати за Грамом, при мікроскопії мазків відмітити розташування спор у клітинах, діаметр спор. Малюнок занести до протоколу.
3. Визначити в РНГА напруженість поствакцинального антитоксичного імунітету у людини, котра отримала щеплення проти правця. Для постановки РНГА до розведень сироватки, що досліджується, додати рівну кількість правцевого еритроцитарного діагностикуму. В якості контролю використати діагностикум без сироватки. Врахувати результати реакції, відзначивши характер утворення осаду еритроцитів. Визначити титр антитоксинів у досліджуваній сироватці.
4. Вивчити біологічний метод визначення типу ботулінічного токсину за таблицею. Реакція нейтралізації токсину проводиться на білих мишах, яким вводять кров хворого з підозрою на ботулізм, змішану з антитоксичною сироваткою певного типу або полівалентною. Реакція вважається позитивною (токсин нейтралізований сироваткою того ж типу), якщо піддослідна тварина вижила. У протоколі заповнити таблицю постановки та обліку реакції.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. У дитини, яка регулярно одержувала всі планові щеплення - травматична рана, дуже забруднена землею. Чи є необхідність робити профілактичне щеплення і якщо "так", то який препарат слід ввести?
2. Земельну ділянку планується використати для будівництва дитячого комбінату. Як перевірити забрудненість ґрунту патогенними клостридіями?
3. У хворого, який напередодні вживав в їжу гриби домашнього консервування, з'явилася різка слабкість, двоїння в очах. Про яке захворювання слід думати і яка тактика ведення хворого?
4. Хворий - літній чоловік, мешканець сільської місцевості, - приїхав до міста на прийом до стоматолога, бо зазнає скрути при відкриванні рота. З анамнезу з'ясувалося, що днів 10 тому, працюючи на городі, хворий наступив на шип

якоїсь рослини і сильно вколов ногу. Ранка загоїлася і практично не турбує хворого. Яке захворювання повинен запідозрити лікар і яка його тактика?

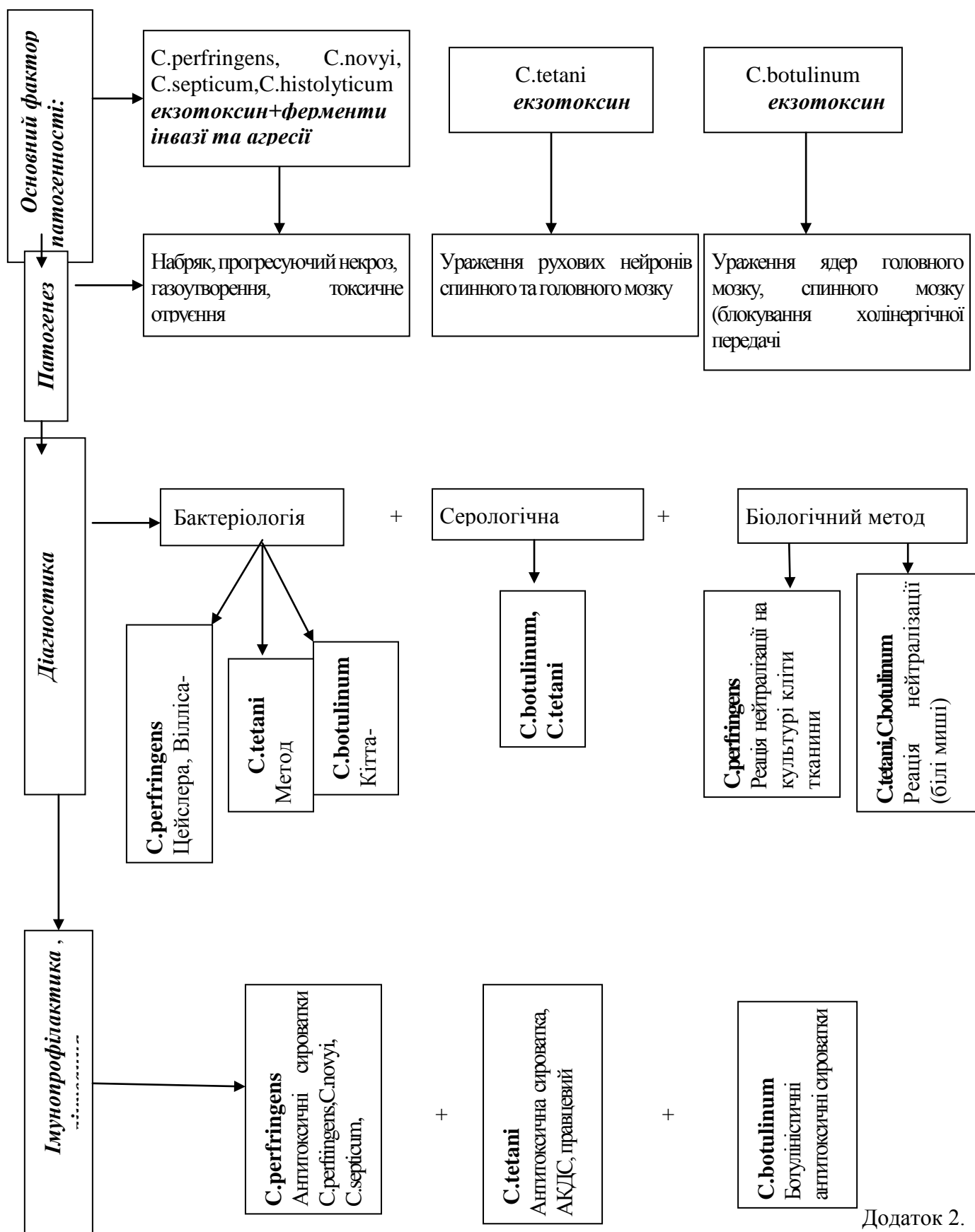
5. Підозрюють, що овочева ікра домашнього консервування була причиною спалаху ботулізму. Як це довести?

6. У хворого з травматичною раною, дуже забрудненою землею, в силу обставин не була вчасно проведена первинна хірургічна обробка. Збільшується набряк нижньої кінцівки, яку було травмовано. Про яке захворювання слід думати? Як швидко підтвердити діагноз і які прийняти міри?

7. Чи можливо протягом 3-4 годин, не маючи спеціальних середовищ, за допомогою мікробіологічних методів поставити діагноз: "Газова гангрена"? Якщо "так", то як це зробити?

Графологічна структура теми

Мікробіологічна діагностика кластрідіальних анаеробних інфекцій.



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.9**

1. Бактеріоскопічне дослідження при підозрі на анаеробну раневу інфекцію.

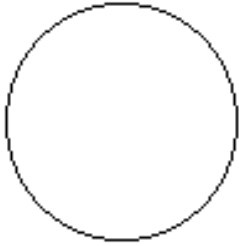


Рис. 1. Збудник анаеробної інфекції в патологічному матеріалі

2. Бактеріологічне дослідження _____

Ріст культури: на молоці _____
 на середовищі Кітта-Тароцци _____
 на середовищі Вльсона-Блера _____
 за методом Віньяль-Вейона _____

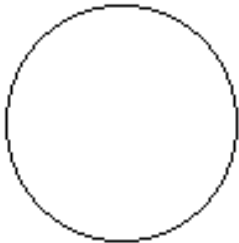


Рис. 2. Мазок із чистої культури збудника анаеробної інфекції

Висновок: на підставі морфології, тинкторіальних і культуральних властивостей мікроорганізмів, можна припустити, що у досліджуваному матеріалі присутній (вказати вид клостридій) _____.

3. Визначення титра антитоксинів у сироватці людини, яка вакцинувалася проти правця.

Врахування РПГА

| Розведення сироватки | 1: 25 | 1: 50 | 1: 100 | 1: 200 | 1: 400 | 1: 800 | 1: 1600 | 1: 3200 | Контроль |
|----------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|
| результат | | | | | | | | | |

Висновок: титр анатоксинів у сироватці вакцинованого _____, що свідчить про достатньо/недостатньо напружений імунітет.

4. Визначення типу ботулінічного токсину:

Врахування реакції нейтралізації

| Введена суміш | Кров + сироватка А | Кров + сироватка В | Кров + сироватка Е | Кров + полівалентна сироватка |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|
| результат | | | | |

Висновок: захворювання викликане *Cl. botulinum*, що утворює токсин типу _____.

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2.10

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА СПІРОХЕТОЗІВ

Актуальність теми. Поширення спірохетозів багато в чому визначається соціально-економічними і санітарно-побутовими умовами. В останні роки відзначається зростання захворюваності спірохетозами, що часто протікають з нечітко вираженими типовими клінічними признаками. Діагностика спірохетозів ускладнюється трудністю культивування збудників на поживних середовищах, виділення їхньої чистої культури. Тому, основними методами діагностики є бактеріоскопічний, серологічний і в значній частині випадків - біологічний методи. Боротьба зі спірохетозами ускладнена високою лікарською тривалістю збудників і слабо розробленими методами вакцинопрофілактики, тому велике значення має санітарна освіта населення, пропаганда здорового способу життя.

Мета(загальна): Провести мікробіологічну діагностику сифілісу, лептоспірозу і зворотного тифу.

Конкретні цілі – уміти:

- 1.Інтерпретувати біологічні властивості спірохет.
- 2.Пояснювати особливості формування імунної відповіді при інфекціях, спричинених представниками порядку спірохеталіс
- 3.Інтерпретувати діагностичну роль різних методів мікробіологічного дослідження спірохетозів.

Базовий рівень знань – умінь:

1. Пояснювати морфологічні та тинкторіальні відмінності спірохет у порівнянні з іншими прокаріотами.
2. Пояснювати основні механізми формування імунної відповіді організму людини при бактеріальних інфекціях.
3. Використовувати темнопольну мікроскопію та фарбування за Романовським-Гімзою..
4. Враховувати та інтерпретувати результати РЗК, РП, реакції іммобілізації.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1.В залежності від чого підрозділяються спіралеподібні форми бактерій? Перелічіть.

Завдання 2.Як ділять бактерії?

Завдання 3.Яким типом джгутиків забезпечується рухомість плаваючих бактерій?

Завдання 4. Які системи беруть участь у постановці реакції зв'язування комплекменту?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с.30-43, 148-234.

2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 2005. - С.30-45, 328-337.
3. Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.- С.155-157,164-169.
4. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-142 с.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Загальна характеристика спірохет: морфологія, систематика, патогенні і непатогенні спірохети.
2. Збудник сифілісу:
 - а) морфологія, культуральні і антигенні властивості трепонем;
 - б) патогенез, імунітет при сифілісі; дія антибіотиків;
 - в) діагностичні підходи в різні періоди захворювання.
3. Збудники лептоспірозів. Біологічні і антигенні властивості. Особливості мікробіологічної діагностики. Профілактика лептоспірозів.
4. Зворотний тиф. Біологічні властивості збудника. Патогенез захворювання. Методи лабораторної діагностики.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с.481-491.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 1994. - С.340-350.
3. П'яткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.- С.294-307.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова.- М.: Медицина, 1984.- С. 211-212, 217, 224-229.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: „Мікробіологічна діагностика спірохетозів” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: пофарбовані за Романовським-Гімзою та Бурі препарати з вмісту твердого шанкру, мазки з крові, які пофарбовані за Романовським-Гімзою, мазки-препарати збудників для мікроскопії у темному полі; демонстраційна реакція Вассермана, таблиці для вивчення біологічного методу діагностики лептоспірозу та зворотного тифу.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити методи діагностики сифілісу у різні періоди захворювання
 - а) Провести бактеріоскопічну діагностику сифілісу (первинного). Для цього промікроскопувати готовий тушевий препарат за Бурі або пофарбований за Романовським-Гімзою, виготовлений з вмісту твердого шанкру. Звернути увагу на кількість завитків у збудника. Малюнок занести до протоколу.
 - б) Засвоїти принцип і методику серологічної діагностики сифілісу (вторинного). Врахувати результати готової реакції Вассермана - РЗК з кардіоліпіновим і ультразвуковим антигеном. Відмітити результати в протоколі.

в) За допомогою серологічного методу оцінити ефективність лікування хворих на сифіліс, врахувавши результати реакції мікропреципітації з тим самим антигеном. Результати занести до протоколу.

2. Вивчити методи мікробіологічної діагностики лептоспірозу:

а) Бактеріоскопічне дослідження при підозрі на лептоспіроз. Вказати у протоколі, які препарати та методи фарбування найбільш придатні для цього. Вивчити морфологію лептоспир за готовими препаратами або таблицями, звернути увагу на характер первинних та вторинних завитків. Малюнок занести до протоколу.

б) Бактеріологічний методі діагностики лептоспірозу вивчити за таблицями. Описати в протоколі поживні середовища, умови та строки культивування, характер росту збудника на середовищі, спосіб виявлення збудника.

в) Ознайомитися з біологічним методом діагностики лептоспірозу. Відмітити у протоколі використані методи зараження лабораторних тварин і врахування результатів біопроби.

г) Ознайомитися з реакціями, які використовуються для серодіагностики лептоспірозу. Зробити у протоколі малюнок, який відображає результат реакції аглютинації лептоспир.

3. Провести бактеріоскопічне дослідження з метою діагностики зворотного тифу. Для цього промікроскопувати мазок з крові хворого, взятої під час приступу хвороби, пофарбований за Романовським-Гімзою. Звернути увагу на розміри клітин збудника, характер та кількість завитків, інтенсивність забарвлення. Малюнок занести до протоколу.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. У хворого, молодого чоловіка, відмічається висока температура тіла, сильний головний біль. Захворювання почалося зненацька, через тиждень після того, як хворий займався відловом ондатр на островах. Про яке захворювання можна думати? Як довести передбачуваний діагноз? Яке призначити специфічне лікування? Які профілактичні щеплення необхідно зробити людям, котрі займаються відловом ондатр?

2. При огляді посівів урінокультури хворого з підозрою на лептоспіроз, середовище залишилося прозорим. Чи можна зробити висновок, що у сечі хворого не виявлений збудник?

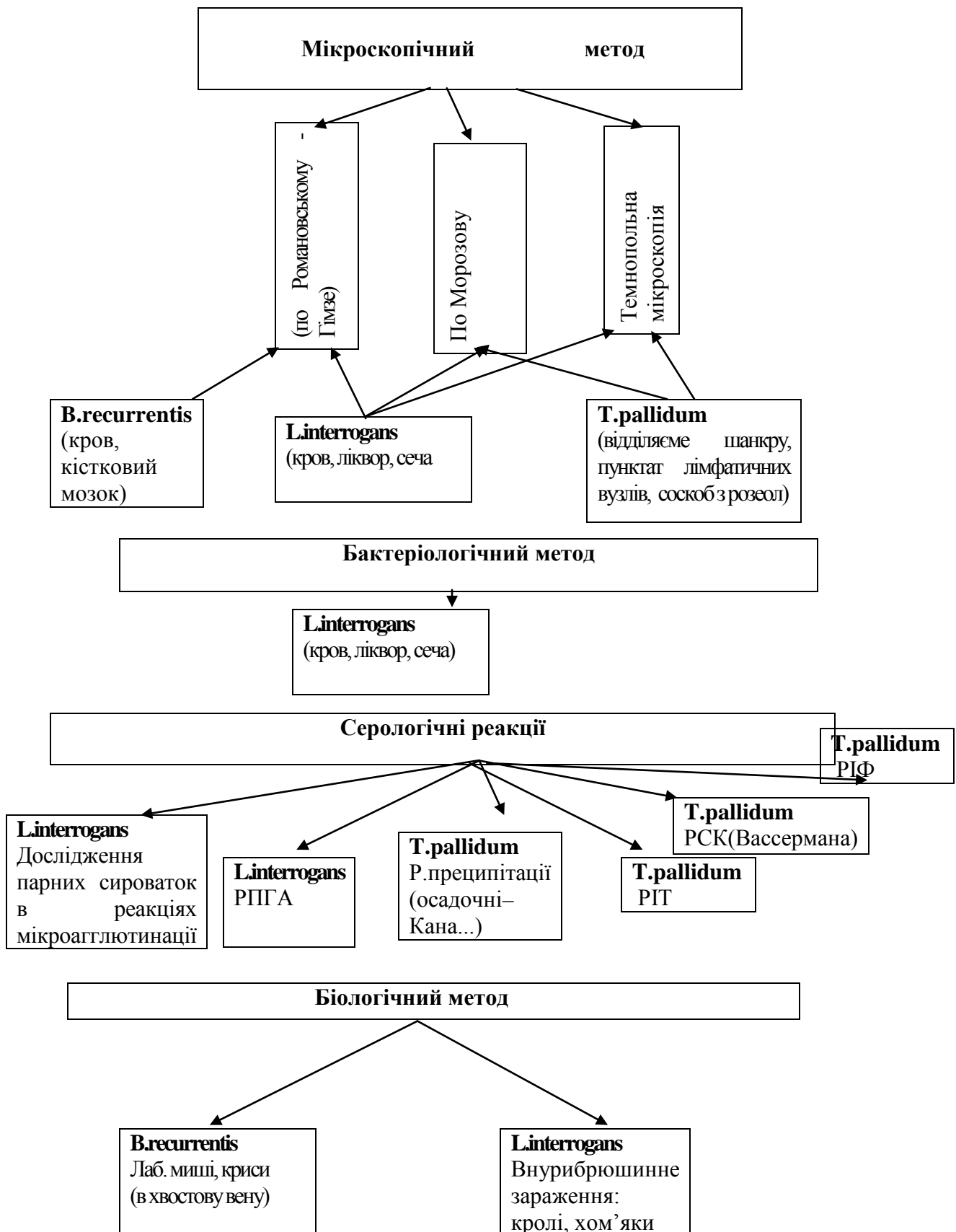
3. У студента, який збирався під час трудового семестру працювати провідником в поїзді, поставлена в обов'язковому порядку реакція Вассермана виявилася позитивною. Чи можна на підставі цього факту робити висновок про захворювання і якщо ні, то яка подальша тактика лікаря?

4. У жінки, яка вважала себе здоровою, почали випадати брови. Косметолог, до якого вона звернулася, припустив наявність прихованого, так званого "німого" сифілісу. Як підтвердити або відхилити передбачуваний діагноз?

6. Хворий звернувся до лікаря зі скаргами на появу на слизовій статевих органів виразки. Результати реакції Вассермана негативні. Оцініть тактику лікаря, зробіть висновок.

7. У хворого після інтенсивного лікування клінічні прояви сифілісу зникли, реакція Вассермана позитивна. Оцінити результати лікування, визначити подальшу тактику.

**Графологічна структура теми:
„МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА СПИРОХЕТОЗІВ”**



Зразок протоколу до практичного заняття № 2.10

Тема: Мікробіологічна діагностика спірохетозів

1. Лабораторна діагностика сифілісу:

а) бактеріоскопічне дослідження при первинному сифілісі;

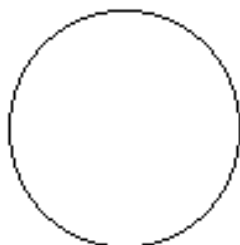


Рис.1. *T. pallidum*. Мазок із твердого шанкру

б) серологічне дослідження при вторинному сифілісі. Врахування реакції Вассермана

| Діагностікум Сироватка | Кардіоліпіновий | Ультразвучений | Без діагностикуму |
|---------------------------|-----------------|----------------|----------------------|
| Завідомо+ | | | |
| Завідомо - | | | |
| Досліджувана | | | |

Висновок: реакція Вассермана у хворого _____
(позитивна або негативна).

в) оцінка ефективності лікування хворих на сифіліс. Врахування реакції мікропреципітації:

| Сироватки | №1 Завідомо + | №2 Завідомо - | №3 Хворого А | №4 Хворого Б | №5 Хворого В |
|-----------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Результат | | | | | |

Висновок: реакції негативні у хворих _____, отже, лікування успішне.

2. Лабораторна діагностика лептоспірозу.

а) бактеріоскопічне дослідження

придатні методи фарбування _____

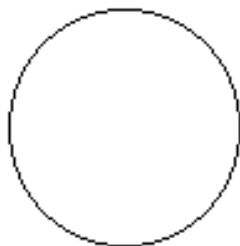


Рис. 2. *Leptospira interrogans*

б) бактеріологічне дослідження:

Патологічний матеріал _____

Використані поживні середовища _____

Умив та строки культивування _____

Характер росту збудника на поживному середовищі _____

Спосіб виявлення збудника _____

в) біопроба

| | У перші дні захворювання | На III тижні захворювання |
|--|--------------------------|---------------------------|
| Патологічний матеріал | | |
| Лабораторні тварини і спосіб зараження | | |
| Мета постановки біопрови | | |

г) серологічне дослідження

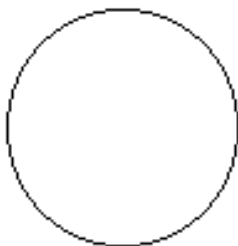


Рис. 3. Реакція аглютинації лептоспир. Темнопольна мікроскопія.

3. Бактеріоскопічне дослідження при діагностиці зворотного тифу:

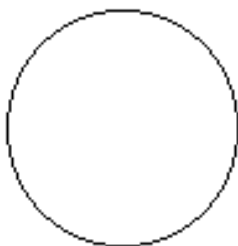


Рис. 4. *Borrelia recurrentis*. Мазок із крові хворого

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.11

ТЕМА: РИКЕТСІЇ, ХЛАМІДІЇ, МІКОПЛАЗМИ. МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА РИКЕТСИОЗІВ, ХЛАМІДІОЗІВ ТА МІКОПЛАЗМОЗІВ.

Актуальність теми. Рикетсії є збудниками епідемічного висипного тифу, численних плямистих лихоманок та лихоманки КУ, яка не є епідемічним захворюванням, але досить часто зустрічається на території України. Хламідії викликають у людей трахому – тяжке ураження очей, що може призвести до втрати зору. Також поширений уrogenітальний хламідіоз: більш ніж 50% негонококових уретритів, що має наслідки безпліддя та інших хвороб. Мікоплазми входять до складу нормальної мікрофлори ротової порожнини, дихальних та сечо-статевих шляхів, можуть викликати ГРЗ, пневмонії та уретрити. Всі ці інфекції характеризуються складністю діагностики та лікування і відсутністю (за винятком рикетсиозів) засобів специфічної профілактики.

Мета (загальна) уміти: Провести мікроскопічне дослідження при трахомі, культуральне – при мікоплазмозі і серологічну діагностику висипного тифу та пневмоніях.

Конкретні цілі - уміти:

1. Пояснювати механізм серологічної реакції для постановки діагнозу висипного тифу.
2. Тракувати результати серологічної діагностики пневмонії з діагностикумами (правильно визначати збудника захворювання).
3. Оцінювати титр антитіл при позитивній реакції на початку та у кінці захворювання на пневмонію.
4. Вміти при мікроскопічному дослідженні знайти у препараті особливості морфологічної структури хламідій, мікоплазм.

Вихідний рівень знань – умінь::

1. Пояснювати морфологічну будову хламідій, мікоплазм та рикетсій та їх особливості розмноження .
2. Тракувати поняття „патогенність” та „властивості антигенів”.
3. Інтерпретувати механізм серологічних реакцій, що використовуються для діагностики інфекційних хвороб.
4. Описувати методи забарвлення бактерій .

Для того, щоб Ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань.

Завдання 1. Назвіть не менше 3-х ознак, які характерні для хламідій та рикетсій.

Завдання 2. Антигени мають такі властивості:

- a) Імуногенність
- b) Антигенність
- c) Специфічність
- d) Валентність
- e) Усі перераховані

Завдання 3. Реакція Вейля – Фелікса, яку застосовують для діагностики висипного тифу є реакцією аглютинації. Що уявляє собою реакція аглютинації?

Завдання 4. Який з складних методів забарвлення застосовується як для виявлення мікроорганізмів так і для структур еукаріотних клітин.

Завдання 5. Антигени рикетсій мають таку саму специфічність, як антигени протеїв. Як називають антигени з такою властивістю?

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Керівництво до лабораторних занять з мікробіології під ред. Л.Б.Борісова.М.-Медицина.-1984.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология.- Медицинское информационное агенство.- 2002.
3. Попов М.М., Циганенко А.Я., Мінухін В.В. Основи імунології. – Харків.- 2005.
4. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Мікробіологія.- К.: Вища школа, 1992.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Особливості морфології, біології і систематика рикетсій, їх антигенні властивості.
2. Захворювання, що викликаються рикетсіями. Методи діагностики рикетсіозів.
3. Морфологія, біологія і систематика хламідій.
4. Хламідіози, методи їхньої діагностики.
5. Морфологічні, культуральні та патогенні властивості мікоплазм. Діагностика мікоплазмозів.
6. Профілактика та лікування захворювань, викликаних рикетсіями, хламідіями та мікоплазмами.

Література для засвоєння знань-умінь за данною темою:

- 1.Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія під редакцією Л.Б.Борісова. М.- Медицина,2002. С.470-479.
2. Матеріали лекції за темою: „ Патогенні рикетсії, хламідії, мікоплазми”.
- 3.Керівництво до лабораторних занять з мікробіології під ред.Л.Б.Борісова.М.- Медицина.-1984.
4. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Мікробіологія.- К.: Вища школа, 1992.- С.316-332.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми „Рикетсії, хламідії, мікоплазми” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: Готові мазки – зішкряби епітелію кон'юнктиви повік, демонстрація серологічних реакцій, посіви з ростом культури мікоплазма на поживних середовищах, мікроскоп, таблиці та біопрепарати за темою.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

- 1.Провести серологічну діагностику висипного тифу у реакції Вейля-Фелікса (у модифікації Нобля – для прискорення результату). Сироватку хворого розвести 1:5, 1:10,1:20, 1:40, 1:80. В аглютинаційні пробірки налити по

0,1 мл кожного розведення сироватки і додати по 0,1 мл діагностикуму ОХ19. (Слід помітити, що при додаванні антигену сироватка розводиться вдвічі проти початкового розведення, тобто у пробірці, куди було взято сироватку у розведенні 1:5, реакція проходить при розведенні 1:10, де було налито сироватку 1:10, реакція йде 1:20 і т.д.). Штатив з пробірками збовтувати 5 хвилин, а потім додати у кожен пробір по 0,8 мл ізотонічного розчину NaCl та врахувати результати реакції. Результат відмітити у протоколі.

2. Промікроскопувати зішкряб епітелію кон'юнктиви повік хворого з підозрою на трахому, пофарбований за Романовським-Гімзою. Знайти у препараті тільки Провачека та окремі клітини хламідій. Малюнок занести у протокол.

3. Провести мікробіологічну діагностику мікоплазменої інфекції. Для цього за допомогою лупи розглянути посів на серцево-мозковий агар матеріалу, взятого від хворого на уретрит. Знайти колонії мікоплазм та описати їх у протоколі. Маленький шматочок середовища із колонією помістити на предметне скло та накрити покривним склом, на яке нанесена крапля спиртового розчину метиленового синього. Препарат висушити, промікроскопувати та відобразити у протоколі морфологію збудника.

4. Провести серологічну діагностику пневмоній, викликаних рикетсіями, хламідіями та мікоплазмами у РЗК. Врахувати результати реакції з сироватками хворого на 1 та 4 тижні захворювання.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. У жінки 73 років спостерігається дрібний висип на шкірі, висока температура, запаморочення. Зараження кров'ю хворої курячих ембріонів у жовтковий міхур показало наявність дуже дрібних Гр- мікроорганізмів паличкоподібної та кокової форми. Реакція Вейля-Фелікса позитивна. У дитинстві хвора перенесла тиф, але не пам'ятає, який саме. Який метод діагностики дозволить з'ясувати, чи є це захворювання випадком епідемічного висипного тифу, або хвороби Брілля?

2. У чоловіка 40 років, який страждає на хронічне запалення сечостатевої системи, було проведено бактеріологічне дослідження виділень з уретри. При посіві пат. матеріалу на сироваточний агар з холестеринем виростили дрібні колонії з щільним центром, що виростає у поживне середовище, та напівпрозорою периферією. Про якого збудника слід думати у першу чергу? Яка картина буде спостерігатися при мікроскопії мазків з колоній? Який метод фарбування слід використати?

3. У дівчинки 11 років, яка доглядала тварин у шкільному "живому куточку", спостерігається захворювання, схоже на грип (слабкість, лихоманка, втрата апетиту, сильний головний біль). Пізніше з'явилися симптоми бронхопневмонії. Збудник вдалося виділити із крові хворої при зараженні курячих ембріонів у жовтковий міхур. Шкірний тест з хламідієм позитивний у хворої та ще у трьох школярів, що працювали у "живому куточку". Про яке захворювання слід думати у першу чергу? Які тварини могли бути найбільш імовірним джерелом інфікування дітей?

**Графологічна структура теми «Рикетсії, хламідії, мікоплазми.
Мікробіологічна діагностика рикетсозів, хламідіозів та мікоплазмозів» ч.1.**



**Графологічна структура теми «Рикетсії, хламідії, мікоплазми.
Мікробіологічна діагностика рикетсозів, хламідіозів та мікоплазмозів» ч.2.**

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ
ХЛАМІДІОЗАХ**

Патологічний матеріал для дослідження

Соскоб з уретри, шийки
матки, харкотиння

Виділення культури
хламідій

1. Курячі ембріони
(РНГА)

2. Культура клітин
(ПФ)

3. Фарбування за
Романовським-
Гімза

4. ПЦР

Серологічна
діагностика

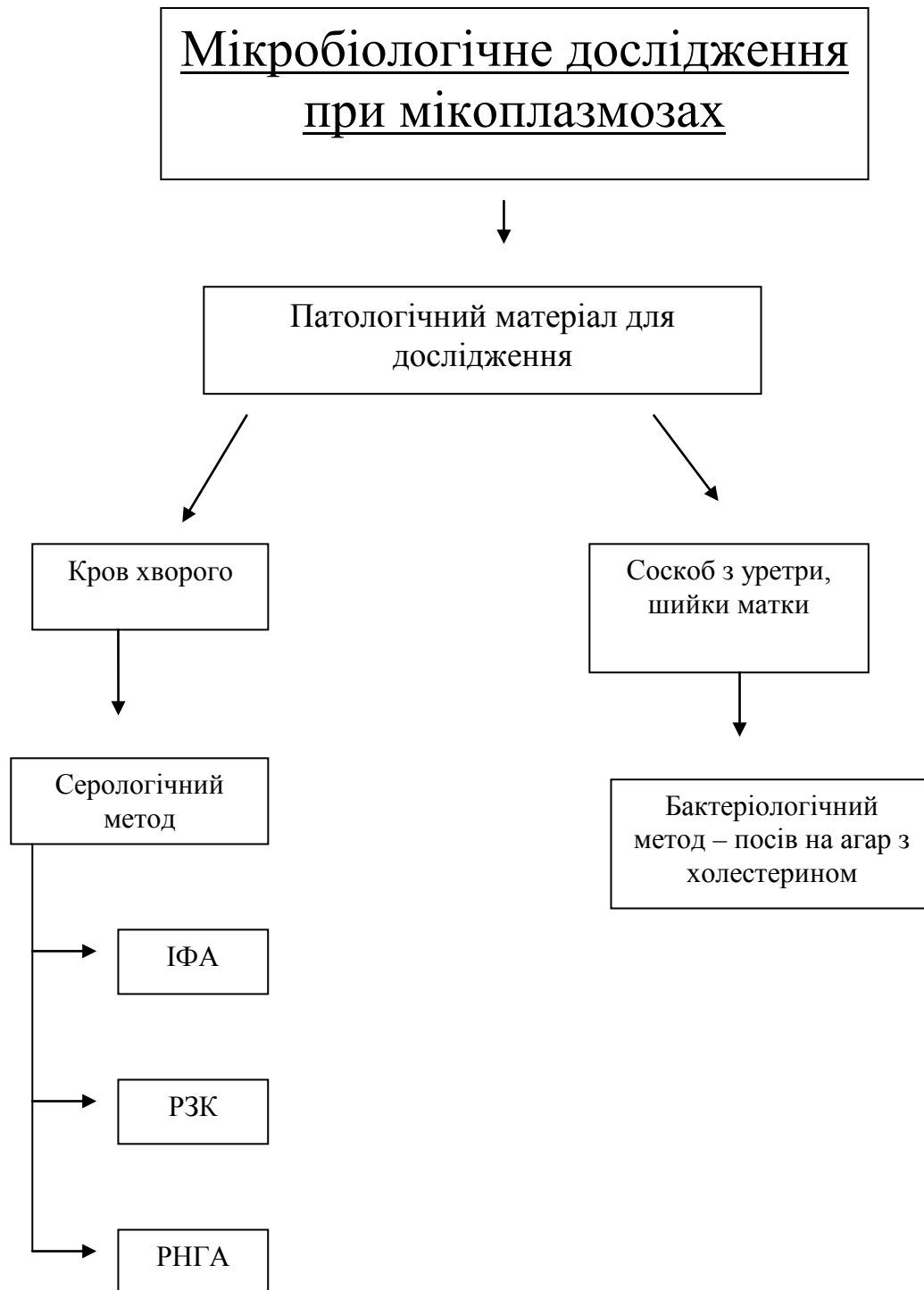
Кров хворого

ІФА

РЗК

Заключення:

**Графологічна структура теми «Рикетсії, хламідії, мікоплазми.
Мікробіологічна діагностика рикетсозів, хламідіозів та мікоплазмозів» ч.3.**



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.11**

1. Серологічна діагностика висипного тифу.

Врахування реакції Вейля-Фелікса.

| | | | | | |
|----------------------|------|------|------|------|-------|
| Розведення сироватки | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 |
| Результат | | | | | |

Висновок:

2. Мікроскопічна діагностика трахоми.

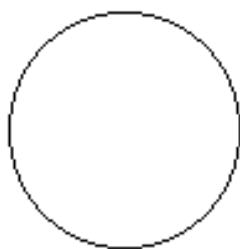


Рис. 1. Зішкряб кон'юнктиви. Забарвлення за Романовським-Гімзою.

3. Мікробіологічна діагностика мікоплазмосу.

Поживні середовища _____.

Типові колонії _____.

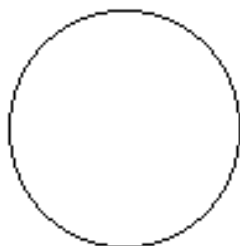


Рис. 2. Мікоплазми. Забарвлення метиленовим синім.

4. Серологічна діагностика пневмоній, викликаних *Coxiella burneti*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*:

Врахування РСК

| Діагностикум | Розведення сироватки | | | | |
|---|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| | 1: 10 | 1: 20 | 1: 40 | 1: 80 | 1: 160 |
| На початку захворювання: Рикетсії Бернета Хламідії пситтакозу Мікоплазми пневмоній | | | | | |
| Наприкінці захворювання: Рикетсії Бернета Хламідії пситтакозу Мікоплазми пневмоній | | | | | |

Висновок:

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.12

ТЕМА: МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ЗООНОЗНИХ ІНФЕКЦІЙ

Актуальність теми. Зоонозні інфекційні захворювання людей, це ті при яких джерелом збудників є інфіковані тварини (хворі або носії). Виділяють дві групи зоонозів: 1- захворювання які передаються від свійських та інших синантропних тварин (бруцельоз, сибірка, сап, орнітоз, токсоплазмоз, лейшманіоз, балантидіоз), 2- природно-осередкові зоонози, які передаються від диких тварин (чума, туляремія, лістеріоз, рикетсіози, кліщові спірохетози). Основний метод лабораторної діагностики зоонозних інфекцій – виділення чистої культури збудника, для діагностики сибірки та зоонозів протозойної етіології – мікроскопічний метод. Досить широко використовується серологічний метод та зараження лабораторних тварин. При бруцельозі, туляремії, сибірці, сапі, можлива постановка алергічної проби. У ряді випадків для постановки діагнозу корисним є мікробіологічне дослідження підозрілих тварин, продуктів харчування та сільськогосподарської сировини.

Мета(загальна): уміти засвоїти методи лабораторної діагностики чуми, сибірки, бруцельозу та туляремії.

Конкретні цілі - уміти:

1. Інтерпретувати біологічні властивості збудників зоонозних інфекцій.
2. Тракувати їхню роль у патології людини.
3. Пояснювати застосування різних методів мікробіологічної дослідження для діагностики хвороб, спричинених ними.
4. Характеризувати біопрепарати для специфічної профілактики та терапії відповідних інфекцій.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Використовувати морфологічні ознаки для ідентифікації бактерій.
2. Тракувати склад та мету використання поживних середовищ для виділення чистої культури збудника.
3. Оцінювати ефективність серологічного дослідження для діагностики інфекційних хвороб.
4. Інтерпретувати властивості біопрепаратів, які використовуються для профілактики та діагностики інфекцій.

Для того, щоб Ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання №1. Збудника чуми та сибірки мають капсулу. На якій властивості капсули основані методи її виявлення при мікроскопії?

Завдання №2. Яке значення мають спори у бацил:

- а. Для розмноження
- б. Для зберігання виду у несприятливих умовах
- в. Для накопичення резервних поживних сполук
- г. Захисна реакція при попаданні в макроорганізм
- д. Ознака старіння клітини

Завдання №3. Навести приклади серологічних реакцій, які використовуються у діагностиці інфекційних захворювань.

Завдання №4. У діагностиці сибірки, бруцельозу, туляремії використовується шірна алергічна проба. Як вона ставить і як враховується? До якого типу алергії належить ця реакція?

Завдання №5. Існують як живі так і вбиті вакцини проти бруцельозу та туляремії. У якому випадку призначають той чи інший тип вакцини?

Інформацію для поповнення знань – умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. – М.: Медицина, 2002.
2. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992.
3. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология.- М: Медицина, 1998.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л. Б. Борисова. – М.: Медицина, 1984.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Морфологічні, біологічні та патогенні властивості збудника чуми.
2. Патогенність *Y.pestis* для людини. Методи діагностики чуми.
3. Морфологічні, біологічні та патогенні властивості збудника сибірки. Шляхи передачі інфекції та основні форми захворювання у людей.
4. Морфологічні, біологічні та патогенні властивості бруцелл. Особливості патогенезу та мікробіологічної діагностики бруцельозу.
5. Морфологічні, біологічні та патогенні властивості збудника туляремії, методи лабораторної діагностики захворювання.
6. Специфічна профілактика та лікування зоонозних інфекцій.

Література для засвоєння знань – умінь за данною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. – М.: Медицина, 1994. - С.286-290, 300-307.
2. П'яткин К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. – К.: Вища школа, 1992.- С.221-225, 234-240, 256-262.
3. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология.- М: Медицина, 1998.- С.210-219, 319-329, 378-389.
4. Руководство к лабораторным работам по микробиологии/ Под. ред. Л. Б. Борисова. – М.: Медицина, 1984.- С.198-211.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: „Зоонозні інфекції” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: Мікропрепарати збудників зоонозних інфекцій, демонстраційні посіви цих збудників на елективних та диференціально-діагностичних середовищах, діагностикуми та діагностичні сироватки та алергени, вакцинні препарати за темою

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Розглянути під мікроскопом мазки зі збудниками зоонозних інфекцій, позначені №№ 1-4, порівняти їх із зображеннями на таблицях та встановити, під яким номером представлено кожен збудник. Малюнки занести у протокол під відповідними номерами, вказавши назву збудника.

2. За таблицями ознайомитися з етапами бактеріологічного дослідження при зоонозних інфекціях. Відмітити у протоколі використувані поживні середовища, ознаки росту, біохімічні властивості, що мають діагностичне значення, препарати для серологічної ідентифікації збудників, додаткові тести.

3. Ознайомитися із серологічним методом діагностики зоонозів, для цього із запропонованого набору біопрепаратів вибрати відповідні діагностикуми, визначити тип та назву серологічних реакцій, у яких вони використовуються. Стислу інформацію занести у таблицю.

4. Серед запропонованого набору знайти біопрепарати, які використовуються для діагностики зоонозних інфекцій алергічним методом. Відмітити у протоколі їх назви із зазначенням захворювань, для діагностики яких вони використовуються.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями та ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1 У жінки, яка купила дублянку, через кілька днів після її носіння на шиї з'явився карбункул. До бак. лабораторії було направлено шматочок хутра від коміра дублянки, в якому за допомогою реакції термопреципітації було виявлено антигени збудника особливо небезпечної інфекції. Який мікроорганізм був причиною захворювання?

2. У селищі спостерігається масова загибель щурів. При мікроскопічному дослідженні мазків-відбитків з органів померлих тварин виявлені овоїдні мікроорганізми, більш інтенсивно забарвлені на полюсах. Які дослідження слід провести для остаточної ідентифікації збудника? Які засоби специфічної профілактики необхідно використати для захисту людей та свійських тварин?

3. Жінка, 30 років, звернулась до лікаря зі скаргами на пітливість, хвилюподібну лихоманку, головний біль та біль у суглобах. Хвора сказала, що, на фермі, де вона працює дояркою, у корів часто трапляються аборти. Які мікроорганізми могли спричинити це захворювання? Які методи діагностики слід використати для перевірки цього припущення? 4. Партію яловичини було вилучено з продажу, бо в мазках-відбитках з м'яса, легенів та лімфатичних залоз тварин виявлено крупні Гр+ капсульні, спороутворюючі палички, розташовані по одній та у вигляді коротких ланцюжків. До якого захворювання могло привести вживання цього м'яса у їжу?

**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.12**

Завдання 1. Морфологічні ознаки збудників зоонозних інфекцій.

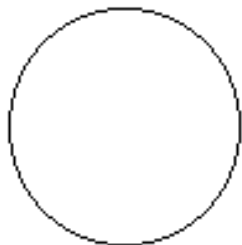


Рис.1

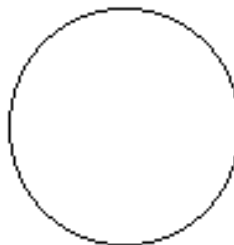


Рис. 2

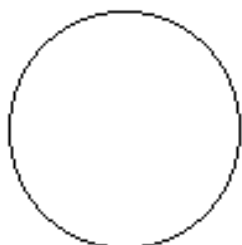


Рис.3

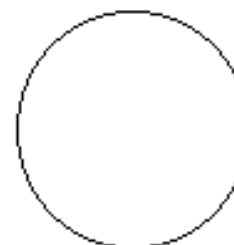


Рис. 4

2. Бактеріологічний метод діагностики зоонозів.

| | Пат. матеріал | Елективні середовища | Ознаки росту | Біохімічна ідентифікація | Серологічна ідентифікація | Додаткові тести |
|---|------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|
| Ч у м а | | | | | | |
| С и б і р к а | | | | | | |
| б р у ц е л ь о з | | | | | | |
| Т у л я р е м і я | | | | | | |

3.Серологічна діагностика зоонозних інфекцій

| Назва | Реакції | Використані біопрепарати |
|-----------|---------|--------------------------|
| чума | | |
| сибірка | | |
| бруцельоз | | |
| туляремія | | |

4.Використання шкірно- алергічної проби у діагностиці зоонозних інфекцій

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.13
ТЕМА: ПАТОГЕННІ ГРИБИ ТА
АКТИНОМІЦЕТИ.МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА МІКОЗІВ ТА
АКТИНОМІКОЗІВ.

Актуальність теми. Відомо близько 100 видів грибів, патогенних для людини. З них тільки дерматофіти та дріжджеподібні грибки здатні передаватися від людини людині. Гриби і актиноміцети можуть уражати як шкіру, так і внутрішні органи людини, тому хворі на мікоз або актиномікоз можуть звертатися до лікарів будь-якого профілю. Поверхневі грибкові інфекції шкіри, волосся, нігтів можуть бути хронічними, але вони рідко викликають серйозні порушення стану хворого. Тоді як глибокі та системні мікози іноді призводять до летального ісходу. Використовування антибіотиків приводить к розвитку кандидозів. В стані імунodefіциту людини мікози виникають як вторинна інфекція. Ураження людей грибами і актиноміцетами слабо контролюється органами охорони здоров'я. Відсутні засоби ефективної профілактики цих захворювань, хоча вони часто характеризуються тяжким перебігом і важко піддаються лікуванню.

Мета (загальна): уміти диференціювати мікози за характером ушкоджень організму.Звернути увагу на особливості ідентифікації збудників, яка проводиться по культуральним та морфологічним властивостям. Вміти аналізувати результати прискореної та розгорнутої ідентифікації збудників мікозів та актиномікозів по утворенню субстратного та повітряного мицелію, спороутворенню, брунькуванню.

Конкретні цілі – уміти:

7. Описувати особливості зрісту збудників кандидозів на живільному середовищі.
8. Вміти приготувати мазки із патматеріалу, оцінювати відмінності дріжджеподібних грибів роду *Candida* від роду *Sacharomyces*.
9. Оцінювати морфологію субстратного та поверхневого мицелію актиноміцетів на різних живільних середовищах.
- 10.Готувати мазки із мицелія .
- 11.Готувати мазки із соскобів шкіри, волосся.
- 12.Розрізняти розтошування спор на препаратах із пошкодженого волосся при епідермофітіях.

Базовий рівень знань – умінь:

- 1.Відмінності морфології та структури мікроскопічних грибів-микроміцетів
2. Культуральні властивості збудників мікозів
3. Морфологічні та культуральні властивості дріжджоподібних грибів.
4. Методи культивування микроміцетів
5. Які ознаки актиноміцетів спільні з бактеріями, а які з грибами?

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання 1. Назвіть морфологічні та біохімічні властивості міксоміцетів: а) мають хітин, в) мають целюлозу, г) мають пептидоглікан, д) розмножуються спорами, е) мають глікоген.

Завдання 2. Назвіть культуральні властивості мікроміцетів

Завдання 3. Чому актиноміцети вважають перехідною формою між бактеріями та грибами?

Завдання 4. Чому такі антибіотики як пеніцилін та тетрациклін не ефективні при грибкових інфекціях?

Завдання 5. Деякі гриби володіють природною люмінесценцією. Поясніть це фізичне явище.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина, 1994. С.441 – 446.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С.249- 250.
3. Билай В.И. Основы общей микологии.- К. Вища школа. 1989. С.6-51.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Патогенні гриби - збудники мікозів у людини та тварин.. Морфологія і класифікація грибів. Розповсюдження грибів. Відмінності від бактерій (в тому числі від актиноміцетів).
2. Класифікація мікозів. Види глибоких мікозів.
3. Збудники тріхофітії. Їх характеристика. Патогенність для людини. Лабораторна діагностика.
4. Збудники мікроспорії і парші. Їхня характеристика. Патогенність для людини. Лабораторна діагностика.
5. Збудники епідермофітії. Їхня характеристика. Патогенність для людини. Лабораторна діагностика.
6. Дріжджоподібні гриби роду *Candida* - збудники кандидозів. Морфологія і культуральні властивості.
7. Патогенність для людини грибів роду *Candida*. Фактори, сприятливі для виникнення кандидозів у дорослих і дітей. Лабораторна діагностика. Антибіотикотерапія.
8. Актиноміцети - збудники актиномікозів. Клінічні прояви. Схожість і відзнака збудників з грибами.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под. ред. Л. Б. Борисова, А. М. Смирновой. –М.: Медицина, 1994. С.442 –465.

2. Билай В.И. Основы общей микологии. – К. Выща шк. Головное изд - во.1989.-392с.
3. Определитель актиномицетов. Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова и др. М. : Наука, 1983.248 с.
4. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология - СПб: Специальная литература, 1998.С. 491-510.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.С 251- 255.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє графологічна структура теми: „Патогенні гриби та актиноміцети. Мікробіологічна діагностика мікозів та актиномікозів (додаток 1).

Матеріали та обладнання: мікропрепарати патогенних та умовно-патогенних, грибів і актиноміцетів. Посіви грибів роду *Candida* на МПА. Посіви патогенних грибів на середовищах Сабуро, Чапека, грибному агарі. Мікроскоп. Предметні та покривні стекла. Пат. Матеріал (пошкоджене епідермофітами волосся, соскоби з поверхні шкіри).

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

- 1.Провести мікроскопічну діагностику мікозів волосистої частини голови. Для цього розглянути два препарати волосся, ушкодженого грибом, відзначити розташування спор в середині волоса та на його поверхні. Користуючись таблицею визначити вид збудника. Малюнки занести у протокол під відповідним номером (Рис.1. *Trichosporon*, Рис.2 *Microsporum*).
2. Провести мікроскопічну діагностику епідермофітії – розглянути препарати, приготовані із шкіри або нігтів хворого на мікоз стопи. Знайти гіфи та спори збудника у шкірних лусочках. Малюнок занести до протоколу.
3. Провести культуральне дослідження при інфекціях, викликаних дерматофітами – розглянути їхні посіви на середовищі Сабуро та описати у протоколі культуральні властивості; за мікропрепаратами з чистої культури або за таблицями вивчити морфологію дерматофітів, звернути увагу на відмінності у вигляді конідій різних видів збудників, малюнки занести у протокол.
- 4.Провести мікробіологічну діагностику кандидозу статевих шляхів:
 - а) розглянути мікропрепарат з пат.матеріалу, знайти псевдо міцелії *Candida*, малюнок занести у протокол;
 - б) розглянути посів пат.матеріалу на середовищі Сабуро або МПА, описати у протоколі культуральні властивості збудника;
 - в) зробити мазок з типової колонії, пофарбувати метиленовою синькою, розглянути під мікроскопом та порівняти морфологію збудника у чистій культурі та в ураженому організмі, малюнок занести у протокол.
- 5.Провести мікробіологічну діагностику актиномікозу:
 - а) промікроскопувати препарат з гною хворого на абсцес актиноміцетної етіології, знайти скупчення гіфів збудника (друзи), малюнок занести у протокол;

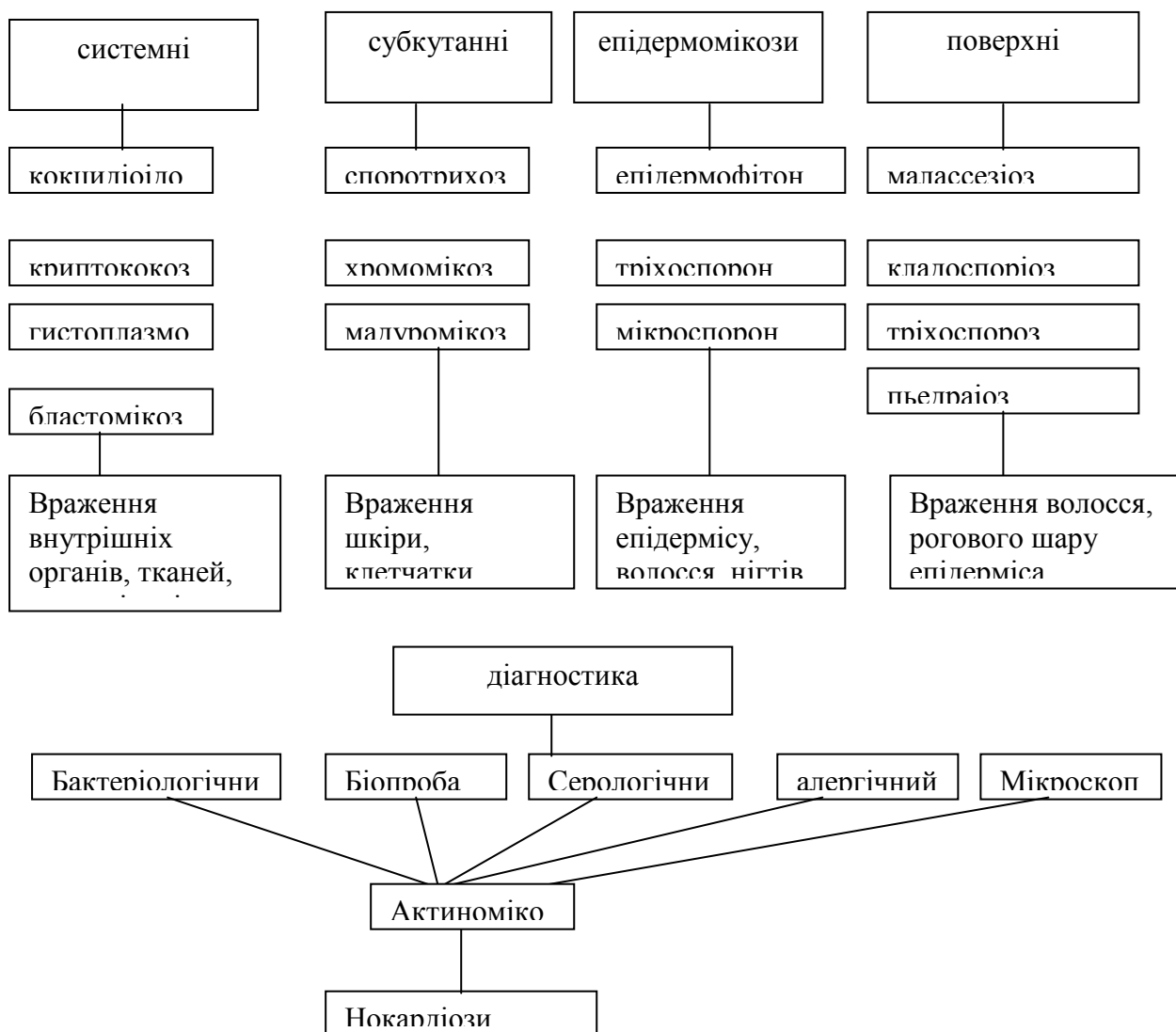
- б) розглянути посів пат.матеріалу на тіогліколеве середовищі або на кров'яний сердечно-мозковий агар, описати у протоколі культуральні властивості збудника;
- в) зробити мазок з типової колонії, пофарбувати за Грамом, розглянути під мікроскопом та порівняти морфологію збудника у чистій культурі та в ураженому організмі, малюнок занести у протокол.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. Хворий - літній чоловік, мешканець сільської місцевості, - приїхав до міста на прийом до стоматолога, бо на поверхні язика з'явився білий налет, зазнає неприємні почуття при вживанні кислого. Яке захворювання повинен запідозрити лікар і яка його тактика?
2. Хворий на запалення легенів тривалий час приймав антибіотики per os. Які в зв'язку з цим можуть виникнути ускладнення? Як провести дослідження, щоб підтвердити передбачуваний діагноз?
3. Робітник ферми звернув увагу на ділянки облісіння, що з'явилися на волосистій частині голови. Лікар при огляді облісілих плям виявив рожевувато-червоні луски. Яке захворювання можна запідозрити, як провести дослідження і лікування?
4. При посіві на середовище Сабуро матеріалу з ураженого грибками волосся зросли сухі зморшкуваті куполоподібної форми колонії. В мікроскопічному препараті, приготовленому з колоній, виявлені нитки міцелію, що нагадують за формою "роги оленя", канделябри або булаву. Яке захворювання дасть таку картину?
5. Ви знаходитесь на сільській лікарській ділянці. Лабораторія відсутня. У вашому розпорядженні тільки мікроскоп. Як провести дослідження волосся, шкіри або нігтів при підозрі на грибкове захворювання? Які істотні відмінності в препараті при розгляданні волосся, пошкодженого мікроспорією, трихофітією або паршею Ви повинні виявити?
6. Лазня, яку відвідував чоловік, знаходилась в антисанітарному стані. Через декілька днів він змушений був звернутися до лікаря зі скаргами на свербіж, мокнучі тріщини, почервоніння в міжпальцевих проміжках ступень. З яким захворюванням це може бути пов'язане? Як провести дослідження?

**Графологічна структура теми: Патогенні гриби та актиноміцети.
Мікробіологічна діагностика мікозів та актиномікозів.**

Мікози



**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.13**

Завдання 1. Мікроскопічна діагностика мікозів волосистої частини голови:

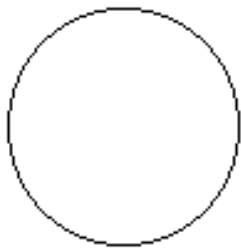


Рис.1. Trichophyton в ушкодженому волоссі

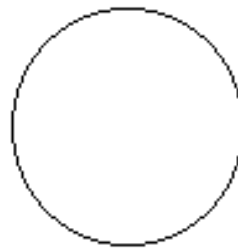


Рис. 2. Microsporum в ушкодженому волоссі

Завдання 2. Мікроскопічна діагностика епидермофітії

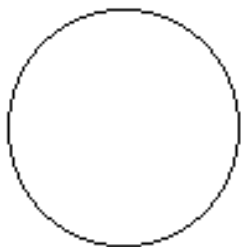


Рис. 3. Epidermophyton в ушкодженій тканині.

Завдання 3. Культуральне дослідження при інфекціях, викликаних дерматофітами.
Ріст збудників на середовищі Сабуро:

Trichophyton _____

Microsporum _____

Epidermofyton _____

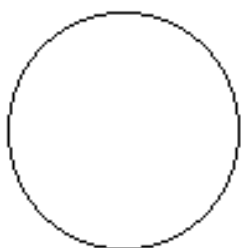


Рис. 4. Чиста культура Trichophyton

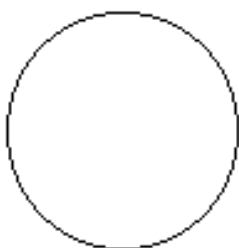


Рис. 5. Чиста культура Microsporum

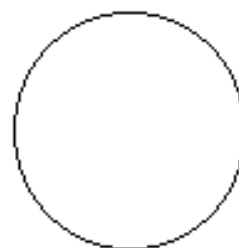


Рис. 5. Чиста культура Epidermophyton

Завдання 4. Мікробіологічна діагностика кандидозів:

а) мікроскопія

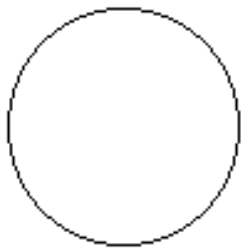


Рис. 7. *Candida albicans* у пат.матеріалі

б)Ріст *Candida* на щільному середовищі _____

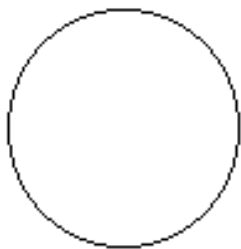


Рис. 8. Чиста культура *Candida albicans*

Завдання 5. Мікробіологічна діагностика актиномікозу:

а) мікроскопія

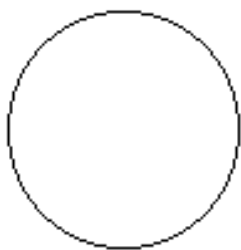


Рис. 9. Друзи актиноміцету у гною.

б) ріст збудника на поживному середовищі _____
_____ .

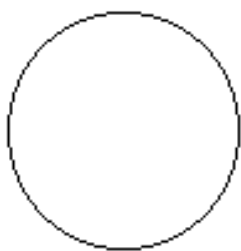


Рис. 10. Мазок з типової колонії.

Дата _____

Підпис викладача: _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2.14

ТЕМА: КЛІНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Актуальність теми. Мікробіологічні дослідження посідають важливе місце в загальному комплексі клініко-лабораторних досліджень, що застосовуються для профілактики, діагностики і лікування гнійно-запальних захворювань та ускладнень у хворих в лікувальних установах, де відзначається збільшення цих поразок і ріст госпітальної інфекції.

Етіологічна структура збудників інфекційних процесів в останнє десятиріччя змінилася: значно збільшилася питома вага захворювань, що викликаються умовно-патогенними мікроорганізмами (близько 200 видів умовно-патогенних мікроорганізмів). Зростає роль неспороутворюючих анаеробів в інфекційній патології. Проблема госпітальних інфекцій набула особливої актуальності, бо за нанесеним збиткам ця патологія перевершила багато інфекційних хвороб. Так, у 4.5-18 % осіб, що госпіталізувалися, розвивається госпітальна інфекція, а у 4-7 % померлих вона є основною причиною смерті, незважаючи на те, що збудники, як правило, відносяться до умовно-патогенним мікроорганізмів.

Мета (загальна): визначати предмет і задачі клінічної мікробіології, освоїти правила і техніку забору, транспортування і мікробіологічного дослідження патологічного матеріалу при захворюваннях, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, а також при госпітальних інфекціях

Конкретні цілі – уміти:

1. Застосовувати правила і техніку забору, транспортування і мікробіологічного дослідження патологічного матеріалу при захворюваннях, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, а також при госпітальних інфекціях.
2. Проводити мікробіологічне дослідження відкритих інфікованих ран уніфікованим методом.
3. Використовувати уніфікований метод мікробіологічного дослідження при сепсисі.
4. Освоїти мікробіологічний метод дослідження сечі при бактеріурії.
5. Оволодіти методикою мікробіологічної діагностики гнійно-запальних інфекцій, викликаних неспоровими анаеробами.
6. Визначати методи мікробіологічної діагностики, етіотропної терапії, профілактики опортуністичних та госпітальних інфекцій.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Тракувати біологічні властивості умовно-патогенних мікроорганізмів кокової та кишкової групи.
2. Пояснювати механізми антибіотикорезистентності мікроорганізмів.
3. Визначати основні етапи дослідження при застосуванні бактеріологічного методу діагностики.
4. Описувати способи культивування анаеробних бактерій.

Для того, щоб ви могли уявити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань

Завдання №1. Які з перерахованих мікроорганізмів є умовно-патогенними:

а) *Protes vulgaris*, б) *Streptococcus pyogenes*, в) *Bordetella parapertussis*,
г) *Staphylococcus epidermidis*, д) *Bacillis subtilis* е) *Pseudomonas aeruginosa*?

Завдання №2. Стафілококки, які виділяються при госпітальних інфекціях, часто проявляють стійкість до пеніцилінів, причому ця властивість може передаватися від однієї бактерії іншим. Як можна пояснити це явище?

Завдання №3. Перелічити відомі вам фактори патогенності мікроорганізмів.

Завдання №4. Як виділити чисту культуру бактерій?

Завдання №5. Чому анаеробні бактерії гинуть при контакті із киснем повітря?

Завдання №6. Наведіть приклади створення анаеробних умов за допомогою різних чинників.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.И.Коротяева: Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.с. 239-260.

2. Биохимия/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. с.61-64.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Поняття клінічної мікробіології. Задачі, що вирішуються цим розділом мікробіології.

2. Відмінності захворювань, що викликаються умовно-патогенними мікроорганізмами від захворювань, що викликаються облігатно-патогенними мікроорганізмами.

3. Поняття госпітальної і позалікарняної інфекції, що викликається умовно-патогенними мікроорганізмами. Госпітальні штами, їхні властивості.

4. Основні правила забору патологічного матеріалу для мікробіологічного дослідження. Як попередити контамінацію?

5. Стафілококи - збудники гнійних процесів. Тести патогенності стафілококів.

6. Стрептококи як збудники гнійно-запальних процесів. Екологічні групи.

7. Синьогнійна паличка. Біологічні властивості, захворювання, що викликаються. Діагностика, ідентифікація.

8. Кишкова паличка і протей як збудники гнійно-запальних захворювань і госпітальної інфекції.

9. Характеристика неспорових анаеробів: бактероїдів і фузобактерій та ін. Захворювання, що ними викликаються.

10. Клінічні показання для проведення мікробіологічного дослідження на неспорові анаероби. Правила забору матеріала для виділення анаеробів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред.

Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой.- М.: Медицина, 1994. - С. 483-496.

2. Микробиология /Под ред. А.А.Воробьева и др. - М.: Медицина, 1994. - С.209-210, 270-273.

3. П'яткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія. - К.: Вища школа, 1992.- С.243-256.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчанням, чому сприяє графологічна структура теми: «Клінічна мікробіологія» (додаток №1).

Матеріали та обладнання: інструменти, що використовуються для відбору патологічного матеріалу, чашки Петрі з демонстрацією кількісного врахування бактерій в матеріалі, що досліджується. Таблиці „Неспорові анаероби”.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. З метою ознайомлення з уніфікованим методом мікробіологічного дослідження відкритих інфікованих ран розглянути посів гною з рани хворого на кров'яному агарі, відмітити підозрілі колонії, описати їхні ознаки у протоколі. Промікроскопувати пофарбований за Грамом мазок з типової колонії, малюнок занести у протокол. На підставі культуральних і морфологічних властивостей збудника та користуючись таблицями відмітити у протоколі наступні етапи дослідження, необхідні для остаточної ідентифікації збудника, встановлення джерела інфекції, вибору препаратів для хіміотерапії.

2. Провести кількісне мікробіологічне дослідження при бактеріурії. Розглянути готовий мірний посів сечі хворого на МПА способом "секторних посівів". Відмітити ріст бактерій у секторах та за допомогою таблиці (див. Додаток, п.13) визначити кількість мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі.

3. Вивчити особливості мікробіологічної діагностики інфекцій, спричинених неспоровими анаеробами. Розглянути інструменти, посуд, устаткування, що використовується для відбору та транспортування пат. матеріалу при підозрі на анаеробну інфекцію. За демонстраційними посівами та таблицями вивчити культуральні та біохімічні властивості неспорових анаеробів. Зробити відповідні відмітки у протоколі. За готовими мазками вивчити морфологію бактероїдів, малюнок занести у протокол.

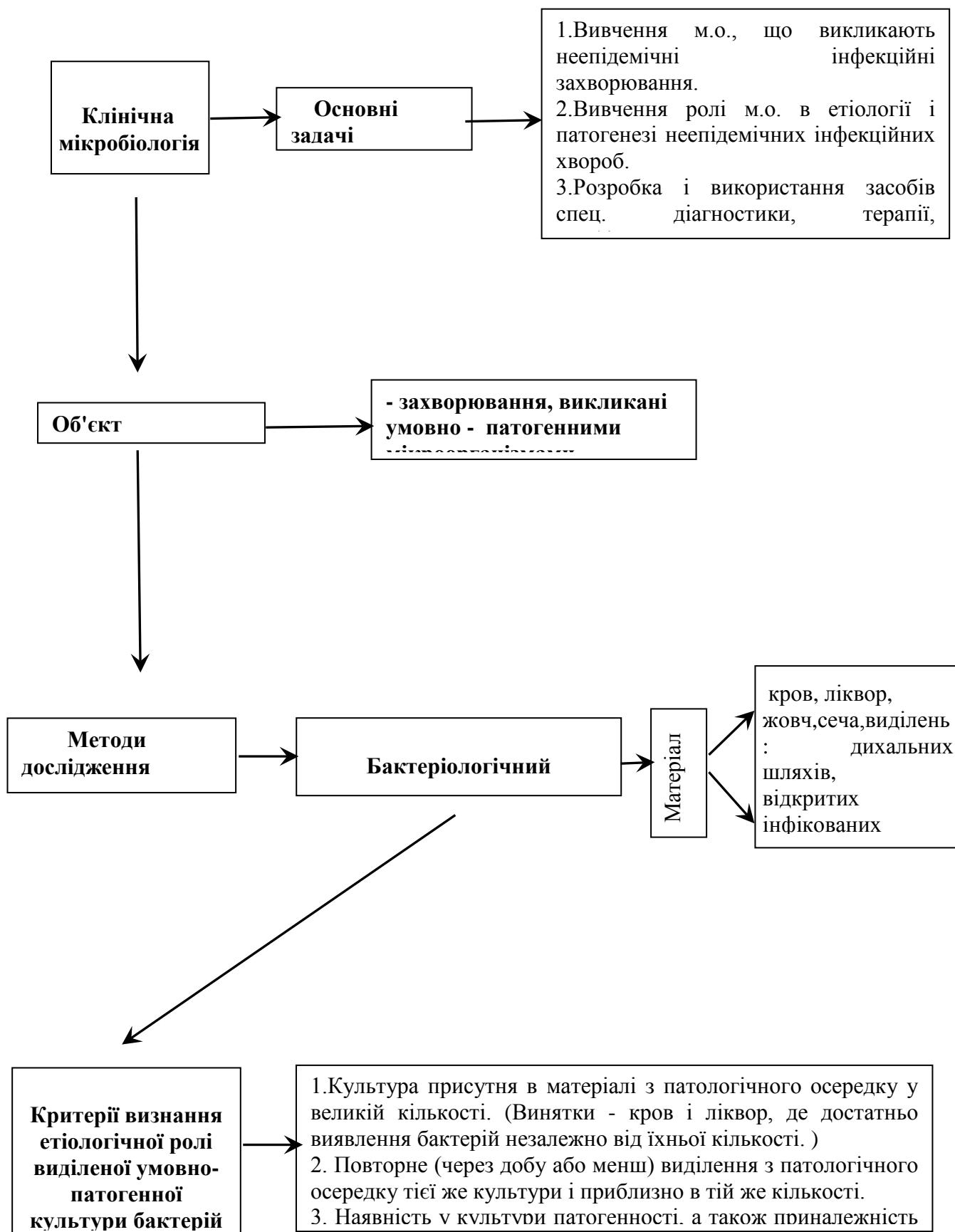
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчаючі завдання.

1. У чоловіка, який потрапив до лікарні з діагнозом «грип» розвинулася пневмонія, викликана стафілококом. Як можна встановити, належить збудник виниклого ускладнення до госпітальних штамів чи був занесений до стаціонару зовні?

2. При діагностиці госпітальних інфекцій, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, дуже важливим для встановлення етіологічної ролі збудника є визначення його кількості у патологічному матеріалі. Яким чином це можна зробити? У яких випадках кількісне дослідження не є обов'язковим і для встановлення діагнозу достатньо довести присутність мікроорганізмів у патологічному матеріалі?

3. У прооперованого хворого виникло гнійне ускладнення. Мікроскопія мазків гною, взятого з глибини операційної рани, показало наявність грам-позитивних сферичних мікроорганізмів, розташованих ланцюжком. Але при посіві пат.матеріалу на кров'яний агар, який інкубувався у звичайному термостаті, росту культури не виявлено. Як це можна пояснити? Яких умов треба дотримуватися, що виділити культуру збудника?

**Графологічна структура теми:
«Клінічна мікробіологія»**



Зразок протоколу до практичного заняття №:2.14

1. Уніфікований метод мікробіологічного дослідження відкритих інфікованих ран.

Патологічний матеріал _____,

спосіб відбору _____.

Поживне середовище _____, типові колонії _____.

_____.

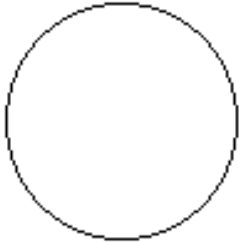


Рис. 1. Мазок з типової колонії, фарбування за Грамом.

Подальші етапи дослідження:

для встановлення видової приналежності збудника _____

_____;

для визначення джерела інфекції _____;

для вибору лікувальних препаратів _____.

2. Мікробіологічне дослідження при бактеріурії.

Ріст мікроорганізмів у секторах:

A _____, I _____, II _____, III _____.

Висновок _____.

3. Мікробіологічна діагностика анаеробних гнійно-запальних і раневих інфекцій.

Патологічний матеріал _____,

спосіб відбору _____.

_____.

Запобіжні засоби при транспортуванні пат. матеріалу _____

_____.

Поживні середовища для виділення та ідентифікації неспорів анаеробів _____

_____.

Характер росту анаеробів на середовищах _____

_____.

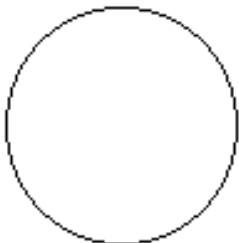


Рис. 2. Бактероїди, фарбування за Грамом.

Дата _____

Підпис викладача: _____

Методичні рекомендації по вибору, взяттю і транспортуванню матеріалу для мікробіологічного дослідження неепідемічних поразок

Розділ медичної мікробіології, що вивчає захворювання, викликані умовно-патогенними мікроорганізмами, називається "клінічна мікробіологія".

Основні задачі клінічної мікробіології:

1. Вивчення біології мікроорганізмів, що викликають неепідемічні інфекційні захворювання.
2. Вивчення ролі мікроорганізмів в етіології і патогенезі цих хвороб.
3. Розробка і використання засобів специфічної діагностики, терапії і профілактики не епідеміологічних інфекційних захворювань.
4. Мікробіологічний контроль за дотриманням протиепідемічного режиму в лікувально-профілактичних установах.

Клінічна мікробіологія вивчає мікробні захворювання, що зустрічаються в соматичних відділеннях всіх клінічних спеціальностей (терапія, хірургія, акушерство, гінекологія, педіатрія, травматологія, ортопедія, урологія, отоларингологія і ін.). Крім того, в її компетенцію входять такі загальні для усіх клінічних дисциплін питання, як госпітальні інфекції. Нормальна мікрофлора, дисбактеріоз, чутливість мікроорганізмів до антибіотиків, антисептиків і дезінфектантів.

Мікробіологічне дослідження при діагностиці захворювань, що викликаються умовно-патогенними мікроорганізмами, має вирішальне значення в постановці діагнозу в зв'язку з тим, що умовно-патогенні мікроорганізми, викликаючи поразки будь-яких органів, дають малу специфічність клінічних симптомів. Головним методом діагностики умовно-патогенних інфекцій є бактеріологічний. Мікроскопічний метод звичайно не використовується із-за неспецифічності клінічної картини, що викликається умовно-патогенними мікроорганізмами у експериментальних тваринних. Алергічний метод також не застосовують в зв'язку з відсутністю сенсibilізації або її малої специфічності. Серологічний засіб, хоча і використовується, але має допоміжне значення.

При проведенні бактеріологічного дослідження слід враховувати, що в матеріалі для дослідження часто знаходиться асоціація мікроорганізмів, в яку входять як збудники захворювання, так і заносні з інших органів і зовнішнього середовища види мікроорганізмів.

Критерії етіологічної ролі виділеної умовно-патогенної культури бактерій

Виділена культура визнається збудником хвороби при дотриманні наступних критеріїв:

1. Культура присутня в матеріалі з патологічного осередку у великій кількості. В залежності від виду бактерій., стадії захворювання, характеру перебігу хвороби (гостра, хронічна), матеріалу для дослідження етіологічно значущим вважається присутність в мл або в одному грамі матеріалу 10 - 10 бактерій. Винятки складають кров і ліквор, де достатньо виявлення бактерій незалежно від їхньої кількості.
2. Повторне (через добу або менш) виділення з патологічного осередку тієї же культури і приблизно в тій же кількості.
3. Наявність у культури патогенності, а також приналежність її до госпітальних штамів.
4. Наростання в 4 і більш раз у сироватці хворого антитіл до культури, що підозрюється збудником процесу (ауто культура).
5. Виявлення кореляції між чутливістю культури до антибіотиків і ефективністю терапії відповідними антибіотиками.
6. Виділення від групи хворих(в випадку спалаху захворювання) ідентичних культур.
7. Наявність прямої кореляції між клінічним поліпшенням хвороби і зменшенням кількості культури.

Основне значення в встановленні етіології захворювання мають 1 і 2 критерії. Інші критерії мають одностороннє значення: їх наявність підтверджує етіологічну роль виділеної культури, відсутність - не дозволяє виключити її роль в виникненні хвороби.

Загальні правила забору, зберігання і пересилання матеріалу

Результати діагностики багатьох мікробних захворювань у значній мірі залежать від правильного вибору матеріалу і дотримання таких умов його забору, доставки, зберігання і обробки

1. Вид матеріалу визначається клінічною картиною захворювання. Тобто він повинен відповідати локалізації передбачуваного збудника на даному етапі патогенезу хвороби. Наприклад, при бронхо- легневих захворюваннях для дослідження беруть харкотиння, при поразках сечової системи - сечу. У випадках відсутності або неясності локальних осередків для дослідження беруть кров.
2. Збирають достатню кількість матеріалу, наприклад, при дослідженні крові беруть 5-10 мл.
3. Матеріал беруть можливо раніше. В початковому періоді хвороби збудники виділяються частіше, їх більше, вони мають більш типову локалізацію. Ранній етіологічний діагноз припускає більш раннє і, отже, більш ефективне лікування і профілактику нових випадків хвороби.
4. Забір матеріалу повинен здійснюватися до початку антимікробної терапії. Якщо таку терапію розпочато, то її при необхідності треба перервати на 1-2 дні, а потім забирати матеріал. Також необхідно поступати при повторних дослідженнях.
5. Необхідно попередити можливу контамінацію матеріалу власною нормальною мікрофлорою хворого і мікробами навколишнього середовища. Для цього отримання матеріалу повинно проводитися в асептичних умовах. В процедурному кабінеті, стерильними інструментами, в стерильний посуд. Крім того, шляхи, через які виділяється або забирається матеріал, повинні бути максимально звільнені від нормальної мікрофлори. Наприклад, прополіскуванням порожнини рота і глотки при взятті харкотиння, промиванням входу в уретру при заборі сечі, усуненням верхніх мас виразки, гнійної рани і ін.
6. Слід виключити можливість попадання в матеріал антимікробних препаратів: дезінфектантів, антисептиків, антибіотиків, контакт з металами, що мають олігодінамічну дію, з ватою, що містить вільні жирні кислоти.
7. Будь-який клінічний матеріал повинен розцінюватися як потенційно небезпечний для людини. Тому при його заборі, зберіганні, доставці, обробці для запобігання зараження повинні виконуватися такі ж міри техніки безпеки, як і в бактеріологічній лабораторії.
8. Після взяття матеріал повинен бути в можливо більш короткі терміни доставлений в лабораторію і почате його дослідження. За відсутності можливості швидкої доставки в лабораторію (наприклад, вночі), його поміщають в побутовий холодильник (або додають консервант).
9. Будь-який, в лабораторію матеріал, що доставляється, повинен мати направлення з зазначенням в ньому назви установи що направляє матеріал, прізвища, імені, по-батькові, віку, адреси хворого, дати захворювання, виду матеріалу, дня і години його взяття, передбачуваного клінічного діагнозу, мети дослідження, підпису лікаря.
10. Після дослідження залишки матеріалу підлягають знищенню (краще автоклавуванням або спалюванням), а посуд, контейнери, інструменти - обеззараженню.

Техніка взяття досліджуваного матеріалу для лабораторного дослідження в баклабораторії

1. Взяття крові.

1.1. Для отримання гемокультури беруть не менше 10 мл крові у дорослих і 5 мл у дітей. Посів роблять в велику кількість рідкого поживного середовища(1:10), щоб розведенням подолати природні бактерицидні властивості крові.

Для взяття крові необхідно користуватися стерильним шприцом. За відсутності централізованої стерилізаційної треба прокип'ятити 20-грамовий (для дітей 10-грамовий) шприц і відповідні голки з мандреном для венопунктури протягом 40-45 хвилин в окремому стерилізаторі. По закінченні стерилізації злити воду і охолодити шприц, не відкриваючи стерилізатора. Зібрати шприц стерильним пінцетом, насадити голку і витягти мандрен. Кров

беруть біля постелі хворого або у перев'язочній з дотриманням всіх правил асептики і тут же її засівають.

Одна людина обробляє шкіру над веною (70% спиртом, а після цього 5% настояюю йоду, знову спиртом), пунктує вену і бере кров. Помічник в цей час над вогнищем спиртівки відкриває пробки флаконів з поживним середовищем і підставляє їх під цівку крові з шприцу, опалює горловини і пробки флаконів і закриває їх.

1.2. Для бактеріоскопічного дослідження крові готують мазки або "товсту каплю". При взятті крові з пальця, каплю крові, що виступила знімають обезжиреним предметним склом, крапля повинна поміститися на відстані 1 см від вузького краю скла. Іншим предметним склом підводять по краплі під кутом 45° і після розподілу крові в цьому гострому куту, швидким рухом проводять другим склом, розмазуючи кров вздовж першого скла.

"Товсту краплю" готують або з краплі крові з шприцу, або з краплі крові з пальця, нанесеної на предметне скло дотиком. Кутом іншого скла або кінчиком голки круговими рухами розмазують краплю до розмірів двохкопійчної монети. Препарати крові висушують на повітрі, загортають в папір і відправляють до лабораторії.

1.3. Для серологічного дослідження кров беруть з вени (інколи з мочки вуха, пальця) в кількості 3-5 мл. Кров збирають в чисту пробірку з ватною пробкою і відсилають в лабораторію. Лікар-бактеріолог повинен стежити за дотриманням правил асептики на всіх етапах взяття і посіву крові.

2. Взяття ліквору. Для бактеріологічного аналізу використовують ліквор, взятий при люмбальній пункції або пункції бокових шлуночків мозку, що робить лікар.

Свіжевзятий ліквор з шприцу без голки над спиртівкою вносять в стерильну центрифужну пробірку в кількості 1-2 мл. Ліквор для дослідження негайно доставляють в лабораторію, де ще теплим віддають на аналіз, бо менінгококи при охолодженні гинуть. При необхідності можна зберігати ліквор протягом декількох годин при температурі 37°C . Для пересилання використовують ізотермальні ящики, грілки, термос, де підтримується температура 37°C .

3. Взяття жовчі. Жовч збирають при зондуванні в процедурному кабінеті окремо порціями А, В, С в три стерильні пробірки, або під час операції за допомогою шприцу в одну пробірку, дотримуючись правил асептики. Отримані порції жовчі доставляють в лабораторію не пізніше 1-2 годин від моменту взяття, стежачи за тим, щоб пробірки знаходились саме у вертикальному положенні

4. Взяття сечі. Дослідженню підлягає середня порція вільно випущеної мочи, взятої в кількості 3-5 мл стерильний посуд після ретельного туалету зовнішніх статевих органів.

Мікроби, що знаходяться у сечі швидко розмножуються при кімнатній температурі, що може дати хибні результати при визначенні ступеня бактеріурії. В зв'язку з цим, від моменту взяття проби сечі до початку її дослідження в лабораторії повинно минати не більш 1-2 годин при зберіганні при кімнатній температурі і не більш доби при зберіганні в холодильнику.

5. Взяття виділень дихальних шляхів (виділень зіву і носу, харкотиння, вміст бронхів, ексудати, резецировані тканини).

Матеріал збирають з дотриманням правил асептики в стерильні баночки або пробірки і доставляють в лабораторію. Зберігання матеріалу сприяє розмноженню сапрофітної мікрофлори, що спотворює результати аналізу. Тому інтервал між взяттям проби і посівом не повинен перевищувати 1-2 години.

Харкотиння. Перед збором ранкової мокроти хворий чистить зуби і полоще рота кип'яченою водою.

Вміст бронхів одержують при бронхоскопії. При цьому не рекомендується вводити більш 5 мл фізіологічного розчину з наступним його відсмоктуванням в стерильну пробірку.

Пунктат інфільтрату або абсцесу легенів одержують за допомогою трансторакальної пункції.

З ротової порожнини матеріал беруть натще або через 2 години після їжі стерильним ватним тампоном зі слизової оболонки на уражених ділянках.

З носовий порожнини матеріал забирають сухим стерильним ватним тампоном. Котрий вводять вглиб порожнини носу. Матеріал з носоглотки беруть стерильним задньоглоточним тампоном, який обережно вводять через ніс в носоглотку.

При підозрі на клебсієли досліджують матеріал з носоглотки і обох половин носової порожнини.

6. Взяття виділень відкритих інфікованих ран робить лікар, що лікує при дотриманні правил асептики. Шкіру навколо рани обробити спиртом. Некротичні маси і гній видаляють стерильною серветкою. Взяття матеріалу двома стерильними ватними тампонами роблять круговими обертальними рухами від центру поверхні рани до краю. Один тампон використовують для мікроскопії, інший - для посіву. Дослідження - не більш ніж через 1 годину. Зберігання в холодильнику припустимо не більш 2-х годин.

7. Взяття виділень очей робить лікар-окуліст в розпал запального процесу. За 5-6 годин до дослідження скасовуються всі медикаменти і процедури. Виділення з кон'юнктиви беруть простерилізованою петлею або скляною паличкою. При рясних гнійних виділеннях використовують стерильні ватні тампони, якими беруть гній з внутрішньої поверхні нижньої вії рухом до носу.

Матеріал з роговиці беруть після обезболювання петлею або вологим тампоном в кабінеті лікаря, готують мазок на обезжиреному предметному склі (його висушують, обводять границі мазка з зворотної сторони скла) і роблять посів на сироваточний бульйон і тіогліколевий бульйон (для анаеробів). Мазки і посіви доставляють в лабораторію.

8. Взяття матеріалу з вуха. При поразці зовнішнього вуха проводять обробку шкіри 70% спиртом з наступним промиванням фізіологічним розчином. Після цього виділення з осередку збирають на стерильний ватний тампон.

При поразці середнього і внутрішнього вуха досліджують пунктати і матеріал, отриманий під час оперативних втручань, зібраний в стерильний посуд.

9. Взяття матеріалу при гінекологічних захворюваннях проводить лікар акушер-гінеколог при підозрі на інфекційну природу процесу (до проведення мануального дослідження). Виділення з вульви і піхви беруть стерильним ватним тампоном. При запаленні бартолінієвих залоз роблять їх пункцію. При заборі матеріалу з шийки матки і порожнини матки піхвову частину матки обробляють ватним тампоном, змоченим стерильним фізіологічним розчином. З цервікального каналу матеріал беруть тонким ватним тампоном, з матки - спеціальним інструментом (шприц-аспіратор).

При запальному процесі в придатках матки отримання матеріалу з осередку інфекції (гній, ексудат) можливо при оперативному втручанні або при діагностичній пункції через піхвовий звід. При підозрі на анаеробну інфекцію посів повинен бути виконаний відразу після взяття матеріалу шляхом поміщення тампона в пробірку в тіогліколевим напіврідким агаром.

Паралельно лікар-гінеколог готує мазки для мікроскопії, використовуючи тампони, гінекологічний інструмент. Мазок висушується при кімнатній температурі, покривається чистим предметним склом або поміщається в чашку Петрі (щоб не пошкодити клітини) і відправляється в лабораторію. Досліджують відразу після взяття. Зберігання в холодильнику не більш 2-х годин.

10. Взяття матеріалу при аутопсії для отримання вірогідного результату повинно проводитися лікарем не пізніше 12 годин після смерті хворого з дотриманням правил асептики.

Проби крові одержують з лівого шлуночка серця шприцом або пастерівською піпеткою.

Пункцію і біопсію проводять після обробки ділянки, що досліджується 3% перекисом водню і наступного видалення антисептика стерильним фізіологічним розчином. З дотриманням правил асептики 2-3 шматочка органів або тканин (0.5-1 см) поміщають для транспортування в стерильні чашки Петрі або в пробірки.

Гній з порожнин, ліквор відсмоктується шприцом в кількості 1-5 мл в стерильні пробірки. Поверхні секрети збираються на бактеріологічний тампон.

Матеріал, взятий від трупу хворого з гнійно-запальної патологією викликану умовно-патогенною мікрофлорою, доставляється в лабораторію протягом 1 години. В направленні додатково вказують дату і час смерті.

11. Дослідження кала.

Показаннями до бактеріологічного дослідження кала є:

1. Дисфункція кишкового - виявлення патогенних, умовно-патогенних мікробів і діагностика дисбактеріозу;
2. Гнійно-запальні процеси різноманітної локалізації і септичні стани, коли кишковик може бути первісним осередком локалізації збудника. В цих випадках також проводять діагностику кишкового дисбактеріозу, встановлюючи провідний вид мікрофлори;
3. Перед плановими складними операціями, особливо на органах травлення, або відразу ж після негайних операцій.

Кишковий мікробіоценоз оцінюють по якісній і кількісній характеристиці біфідобактерій, виявленню і кількісній характеристиці умовно-патогенної мікрофлори (стафілококи, кандиди, протей, клебсієли, цитобактер, синьогнійна паличка). Визначаються також лактозонегативні нерухливі кишков. палички.

При відборі проб кала необхідно дотримання всіх загальних правил забору, зберігання і пересилання матеріалу для мікробіологічного дослідження. Техніка взяття кала має свої особливості: судна, горшки і інші місткості для збору фекалій повинні бути ретельно вимиті і позбавлені слідів дезінфікуючих засобів.

Фекалії збирають відразу після дефекації з означених місткостей або з пелюшки у стерильний посуд за допомогою стерильної скляної палички або дротовою петлею. За наявності гною, слизи в калі їх слід включити в пробу, що відбирається. Фекалії можна отримати безпосередньо з прямої кишки з допомогою ректальних тампонів, ватних або ватно-марлевих, укріплених на металевій або дерев'яній паличці.

Фекалії, не поміщені в консервант, суспендують в фізіологічному розчині хлориду натрію в співвідношенні 1: 5 або 1: 10 і засівають не пізніше двох годин після взяття. При використанні консервантів (транспортних середовищ) матеріал придатний для дослідження ще протягом 12-24 годин при зберіганні при 4-6 С . В якості консерванту рекомендується використати в обсязі 1: 3 гліцериновий фосфатно-буферний розчин (рН=8). Для кількісного дослідження на кишковий дисбактеріоз зручно відбирати по 0.5-1.0 г кала в заздалегідь зважені на вагах стерильні флакончики. Після повторного зважування визначають істинну вагу проби і додають таку кількість 2% пептонної води, щоб отримати розведення 1: 10, що використовується як вхідне в подальшій роботі.

12. Дослідження гнійно-запальних уражень, викликаних неспоровими анаеробними бактеріями. В лікувальних установах, де застосовують сучасні засоби діагностики анаеробних інфекцій при гнійно-запальних процесах, аспорогенні анаеробні бактерії виділяються в 60-70% випадків з матеріалів, підданих дослідженню, часто в асоціації з анаеробними або факультативно-анаеробними мікроорганізмами. Найчастіше (43% - це представники бактероїдів, 24% - пептококи (анаеробні стафіло - і стрептококи), рідше - актиноміцети. Пропіонобактерії, еубактерії, грамнегативні коки (вейлонели). Спороутворюючі анаероби з роду клостридій при гнійно-запальних процесах виділяються приблизно в 10% випадках.

Дослідженню на наявність анаеробів підлягають: кров, ліквор, плевральна, суглобна рідини; ексудати і гній. Дослідження виділень з свищів, глибоких ран може проводитися за умови ретельної обробки вихідного отвору. Досліджуються також і тканини, видалені при оперативних втручаннях, біопсії або аутопсії. Більш прийнятною методикою забору матеріалу є пункція ураженого органу або безпосереднє вилучення ураженої тканини. Вміст дихальних шляхів і сеча мають діагностичне значення тільки в випадку, якщо вони зібрані пункцією.

Для посіву треба брати 0.5-1.0 мл рідкого матеріалу або 1-2 г (1-2 шматочки) щільної тканини.

Рідкий матеріал зручно забирати і транспортувати за допомогою шприцу, з якого після взяття матеріалу видаляється повітря, а голка для герметизації вколюється в стерильну гумову пробку. При такій методиці матеріал найменш піддається впливу кисню повітря. Кусочки видаленої тканини поміщають в пробірки або флакони, або заздалегідь заповнені безкисневим газом (азот), або заповнені на 3/4 обсягу транспортним середовищем, залитою зверху вазеліновим маслом.

Найчастіше в якості таких середовищ використовуються тіогліколеве середовище та середовище Тароцци.

Якщо для забору матеріалу використовується тампон (найменш вдала форма, але вона дасть результат при виділенні нестрогих анаеробів), то він негайно занурюється в транспортне середовище під маслом.

Паралельно зі збором матеріалу для посіву з нього необхідно приготувати препарати для забарвлення за Грамом.

Матеріал слід доставляти в лабораторію в максимально короткий термін (1-2 години).

13. До діагностики госпітальних інфекцій.

Мікробіологічні дослідження при госпітальних інфекціях вирішують такі задачі:

1. Виділення мікроорганізмів з клінічного матеріалу, об'єктів зовнішнього середовища, від персоналу і їхня ідентифікація;
2. Встановлення їх етіологічної ролі;
3. Визначення чутливості виділених бактерій до антибіотиків і дезінфектантів;
4. Встановлення шляхів розповсюдження збудників.

В відповіді бактеріологічного дослідження при захворюваннях, що викликаються умовно-патогенною мікрофлорою, вказується їхня кількість. В зв'язку з цим проводиться методика кількісного врахування мікроорганізмів в досліджуваному матеріалі.

Кількісний облік бактерій в матеріалі, що досліджується.

Визначення ступеня бактеріального забруднення досліджуваного матеріалу

| Кількість бактерій в 1 мл рідкого матеріалу або веденої суспензії | Кількість колоній на секторах | | | |
|---|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | A | I | II | III |
| Менш 10^3 | 1-6 | Росту немає | Росту немає | Росту немає |
| 10^3 | 8-20 | Росту немає | Росту немає | Росту немає |
| 5×10^3 | 21-30 | Росту немає | Росту немає | Росту немає |
| 10^4 | 31-60 | Росту немає | Росту немає | Росту немає |
| 5×10^4 | 70-80 | Одиничні | Росту немає | Росту немає |
| 10^5 | Дуже велике | 5-10 | Росту немає | Росту немає |
| 5×10^5 | - ' - | 20-30 | Росту немає | Росту немає |
| 10^6 | - ' - | 40-60 | Одиничні | Росту немає |
| 5×10^6 | - ' - | 100-140 | 10-20 | Росту немає |
| 10^7 | - ' - | Дуже велике | 30-40 | Росту немає |
| 5×10^7 | - ' - | - ' - | 41-60 | Одиничні |
| 10^8 | - ' - | - ' - | 61-100 | 10-20 |
| 5×10^8 | - ' - | - ' - | Дуже велике | 21-40 |
| 10^9 | - ' - | - ' - | - ' - | 41-100 |

З метою точного врахування кількості бактерій може бути використаний засіб серійних розведень. Однак, для орієнтовної кількісної оцінки мікрофлори широко застосовується засіб секторних посівів. Посів матеріалу, що досліджується проводять петлею діаметром 3 мм (0.005 мл) на сектори щільного середовища в чашках Петрі. В секторі А роблять 30-40 штрихів. Після обпалювання петлі роблять 4 штрихоподібних посівів з сектора А в сектор 1 і

аналогічно, з обпалюванням петлі, - з сектора 1 в сектор 2, а з нього - в сектор 3. Після інкубації підраховують колонії, що вирости в секторах і визначають ступінь забрудненості за таблицею.

В таблиці вказана кількість бактерій в 1 мл рідині (суспензії), з якої зроблено посів. Якщо матеріал розведений (1: 2, 1: 10 або більш), для перерахунку на 1 г (мл) нативного матеріалу, означена кількість бактерій множать на кратність розведення. За допомогою стандартної петлі в малих об'ємах можна готувати також розведення матеріалу (суспензії) з розрахунку, що дві петлі містять 0.01 мл рідини, що зручно для наступного висіву на щільні поживні середовища і кількісного врахування мікроорганізмів.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.15

ТЕМА: САНІТАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Актуальність теми. Концентрація населення у великих містах, розвиток промисловості і зростання промислових об'єктів призводить до наростання біологічного забруднення навколишнього середовища, стічних вод, відкритих водоймищ, ґрунту, а, також, в дещо меншому ступені, підземних вододжерел і атмосферного повітря. Тим самим створюються умови для циркуляції вірусів в об'єктах навколишнього середовища. Оскільки збереження життєздатності вірусів у воді, ґрунті, повітрі, харчових продуктах є одним з основних чинників, сприяючих розповсюдженню інфекції в сприйнятливих колективах, виникла необхідність вивчення патогенних для людини вірусів в об'єктах зовнішнього середовища. Цим займається санітарна вірусологія. Вивченням бактерій в зовнішньому середовищі здатних негативно впливати на здоров'я людини, займається санітарна мікробіологія.

В глобальній проблемі охорони навколишнього середовища велике значення має охорона водних ресурсів. Серед різних видів біологічного забруднення води особливе місце займає мікробне обсіменіння, оскільки вода може бути чинником передачі і розповсюдження не тільки бактерійних, але і вірусних інфекцій. Мікробіологічні дослідження необхідні не тільки для безпечного використання відкритих водоймищ, а, також, охорони їх від забруднень, що потрапляють.

Серед чинників зовнішнього середовища, постійно впливаючих на людину, важливе місце займає і повітря, що має велике санітарно-епідеміологічне значення.

Останнім часом все гостріше встає проблема мікробіологічного зараження повітря, причиною якого є діяльність людини. Особливе значення привертає забруднення повітря підприємствами мікробіологічної промисловості, де необхідна для народного господарства продукція виходить шляхом використання життєдіяльності різноманітних мікроорганізмів. Проте через недостатню герметичність процесів має місце надходження життєздатних мікроорганізмів і продуктів їх життєдіяльності в повітря виробничих приміщень.

Велику небезпеку представляє повітря інфекційних і хірургічних лікарень, багатих патогенною і умовно-патогенною мікрофлорою. В цьому зв'язку при оцінці санітарного стану повітря різних закритих приміщень дуже часто доводиться вдаватися не тільки до визначення санітарно-показових мікроорганізмів, але і до безпосереднього виділення патогенних вірусів і бактерій. Особливо велике значення це має при розшифровці спалахів респіраторних інфекцій в дитячих установах і в стаціонарах лікувально-профілактичних установ.

Ціль (загальна): уміти давати гігієнічну оцінку якості води, ґрунту і повітря з погляду інфекційної безпеки для здоров'я людини.

Конкретні цілі: уміти

1. Трактувати властивості санітарно-показових мікроорганізмів.
2. Пояснювати роль води, ґрунту, повітря в розповсюдженні інфекційних захворювань.

3. Знаходити мікробне число і бактерії групи кишкових паличок (БГКП) в пробі питної води методом фільтрів мембран і бродильним методом.
4. Визначати мікробне число і кількість санітарно-показових мікроорганізмів повітря седиментацією і аспіраційним методами.
5. Використовувати бактеріофаги для індикації патогенних бактерій в об'єктах навколишнього середовища.

Початковий рівень знань – умінь:

1. Пояснювати межі стійкості вірусів і бактерій до дії різних чинників навколишнього середовища.
2. Пояснювати хімічний склад води (кафедра хімії).
3. Пояснювати будову апарату Кротова, принцип роботи приладу (кафедра медбіофізики).
4. Вміти приготувати кратні розведення води, вміти провести розрахунки в отриманих результатах. (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли зрозуміти, чи відповідає початковий рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Скільки відсотків в організмі людини складає вода і які функції вона виконує?

Завдання 2. Яким чином розрахувати вміст бактерій в 1 кубометрі повітря у апараті Кротова?

Завдання 3. Поясніть термін «седиментація». Перерахуйте недоліки методу седиментації.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти в наступних підручниках:

1. «Медична і біологічна фізика» за редакцією проф. О.В. Чалого. Київ, 2005.
2. А.С. Мороз, Д.Д. Луцевіч, Л.П. Яворська “Медична хімія”. Вінниця: Нова книга, 2006.
3. Е.Г. Гончарук “Комунальна гігієна”. Київ: “Здоров’я”, 2003.

Теоретичні питання, на підставі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Санітарна мікробіологія, предмет, завдання. Значення санітарної мікробіології в діяльності лікаря.
2. Санітарно показові мікроорганізми, вимоги до них, їх значення для характеристики об'єктів навколишнього середовища.
3. Санітарно бактеріологічний контроль за якістю питної води. Вимоги Державного стандарту до питної води. Санітарно показові мікроорганізми, які використовують при оцінці якості води.
4. Мікрофлора води. Чинники самоочищення води. Виживання патогенних мікроорганізмів у воді. Роль води в передачі інфекційних захворювань.
5. Методи санітарно бактеріологічного дослідження води і їх оцінка.
6. Мікрофлора ґрунту. Роль ґрунту в передачі інфекційних захворювань. Чинники, які впливають на той, що виживає патогенних мікроорганізмів в ґрунті. Санітарно-показові мікроорганізми, які використовують при оцінці забруднення ґрунту. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту.

7. Мікрофлора повітря, її характеристика. Роль повітря в передачі інфекційних захворювань.
8. Мікробне число і санітарно показові мікроорганізми повітря закритих приміщень, методи визначення, їх оцінка.
9. Санітарна вірусологія, предмет, завдання, значення санітарної вірусології в діяльності лікаря.
10. Роль води, ґрунту, повітря в передачі збудників вірусних інфекцій. Віруси, які частіше за все знаходять в об'єктах навколишнього середовища.
11. Санітарно-вірусологічне дослідження води. Відбір проб, методи концентрації. Віруси, бактеріофаги в питних і стічних водах. Методи виявлення.
12. Роль повітряного середовища в розповсюдженні збудників респіраторних вірусних інфекцій. Методи відбору проб повітря і індикації респіраторних вірусів.

Література для засвоєння знань- умінь по даній темі:

1. О.К.Познеев Медична мікробіологія. М. ГЭОТАР-МЕД, 2002.
2. Л.Б.Борисов. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія М., МНА, 2005.-С. 131-136.
3. Букринская А.Г. Вирусология.- М.: Медицина,1986.
4. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С.63-66.
5. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова. – М.: Медицина, 1984.-С.81-95.
6. Кочемасова Н., Ефремова С.А., Рыбакова А.М. Санитарная микробиология и вирусология.- М.: Медицина, 1987.
7. Справочник по санитарной микробиологии / Под ред. проф. М.З.Григорьевой – Кишинев: Картя Молдовенясько, 1981.
8. Санітарно-бактеріологічне і вірусологічне дослідження води (Під ред. Канд. Мед.наук В.Н. Гиріна, проф. М.З.Грігор'євої - Київ: Здоров'я, 1984.
9. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження об'єктів навколишнього середовища (Під рук. акад. АМН СРСР проф.Г.І.Сидоренко – Москва: Медицина, 1978.
10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С.83-84, 87-88, 93-95,100-102.
11. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 481-495.

Таблиця 1

Патогенні для людини віруси, що знаходяться у воді

| Сімейства | Роди | Представники | Захворювання, що викликають |
|---------------|------------------------|-----------------------|---|
| Пікорнавіруси | Ентеровіруси | Поліовіруси ЕСНО | Лихоманка, паралічі респіраторні захворювання, |
| | | Коксаки А, В | діарея, менінгіт респіраторні |
| Рєовіруси | Ротавіруси | Вірус гепатиту А | захворювання, менінгіт, Інфекційний гепатит, |
| | Рєовіруси | | Гострий гастроентерит, |
| Аденовіруси | Аденовіруси ссавців | Аденовіруси людини | Респіраторні захворювання, кон'юнктивіт |

Таблиця 2

Віруси, що знаходяться в повітрі, і їх стійкість при різній сприйнятливості при різній вологості

| Віруси | Стійкість при вологості | | |
|--------------|-------------------------|-----------|---------|
| | низкою | середньою | високою |
| Грипу | + | - | - |
| Парагриппу | + | - | - |
| Кору | + | - | +/_ |
| Аденовіруси | - | +/_ | + |
| Поліомієліту | - | +/_ | + |

Позначення: (+)- стійкі, (+/_)-малостійкі, (-)-не стійкі.

Матеріали та обладнання: проба питної води, флакони та пробірки з ГПС, чашки Петрі з середовищем ЖСА, МПА, апарат Кротова.

Орієнтована основа дій при виконанні практичної роботи

1. Визначення загальної кількості бактерій (мікробне число), в пробі питної води методом титрів мембран. Етапи дослідження води методом фільтрів мембран вивчаються на демонстраційному матеріалі: викладач демонструє фільтр Зейтца, фільтри мембран, чашку Петрі із засіваючими фільтрами. Студенти підраховують кількість колоній, що вирости. Для доказу приналежності мікроорганізмів, що вирости, до БГКП (бактерії групи кишкової палички) викладач демонструє готовий забарвлений по Граму мазок і проводить визначення оксидазної активності, демонструє напіврідке середовище з

глюкозою, засіваючу культурою з безбарвних оксидаzoneгативних колоній. Студенти роблять висновок про загальне мікробне забруднення введення і її відповідності санітарним нормам.

2. Визначення бактерій групи кишкових паличок (колі - індекс, колі - титр) бродильним методом. Дослідження проводиться по типу рішення задачі. Студенти діляться на групи по 3 людини, кожна група одержує зашифровану пробу питної води, оснащення, необхідне для визначення мікробного числа і колі - індексу бродильним методом. Для визначення мікробного числа студенти самостійно готують розведення проби води і роблять посів. Самостійно кожна група проводить засів необхідних об'ємів води у флакони і пробірки з ГПС (глюкозо-пептоним середовищем). Для кращого уловлювання газоутворення у флакони замість поплавців поміщені шматочки вати, яка спливає у разі утворення газу при розщеплюванні глюкози. Зроблені посіви студенти поміщають в шафу. В протоколі наголошується виконаний етап роботи.

Кожна група студентів одержує теку з методичними і законодавчими документами, з якими знайомиться у міру необхідності.

Викладач акцентує увагу студентів на необхідності вивчення Гостів, СанПінів, інших матеріалів по воді: ГОСТ18963-73»Вода питна. Методи санітарно-бактеріологічного аналізу»; ГОСТ2874-82»Вода питна. Гігієнічні вимоги і контроль за якістю»; СанПін №4630-888»санітарні правила і норми охорони поверхневих вод від забруднення».

Студенти визначають колі- індекс і колі- титр, заповнюють протокол і роблять висновок (по таблиці 3) про санітарний стан води, можливості її використовувати як питна.

3. Визначення загальної мікробної контамінації (мікробне число) і санітарно-показових мікроорганізмів методом седіментації.

Група студентів одержує 2 чашки з МПА, 2 чашки з ЖСА і 2 чашки з кров'яним агаром. Покласти чашки Петрі з живильними середовищами на рівні дихання на горизонтальну поверхню і відкрити на 20 хв. (для визначення загальної мікробної контамінації) і на 40 хв. (для обліку кокової мікрофлори). Чашки помістити в шафу до наступного заняття. Розглянути засіяні раніше аналогічним способом чашки з середовищами, підрахувати кількість колоній, що вирости, дані занести в протокол.

4. Визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів аспіраційним методом. Дослідження проводиться паралельно з виконанням завдання 1. Студенти одержують 2 чашки з МПА, 2 чашки з ЖСА і 2 чашки з кров'яним агаром. Чашки послідовно поміщають в апарат Кротова і пропускають 100 л. повітря для визначення мікробного числа (швидкість 25 л /хв.) і 250 л - для визначення санітарно-показових мікроорганізмів. Чашки помістити в шафу до наступного заняття.

Облічити результати посівів, зроблених раніше. Розрахувати мікробне число за формулою:

$$X = \frac{a \times 1000}{y}$$

a - кількість виростих на чашці колоній;

у - обсяг пропущеного через прилад повітря;

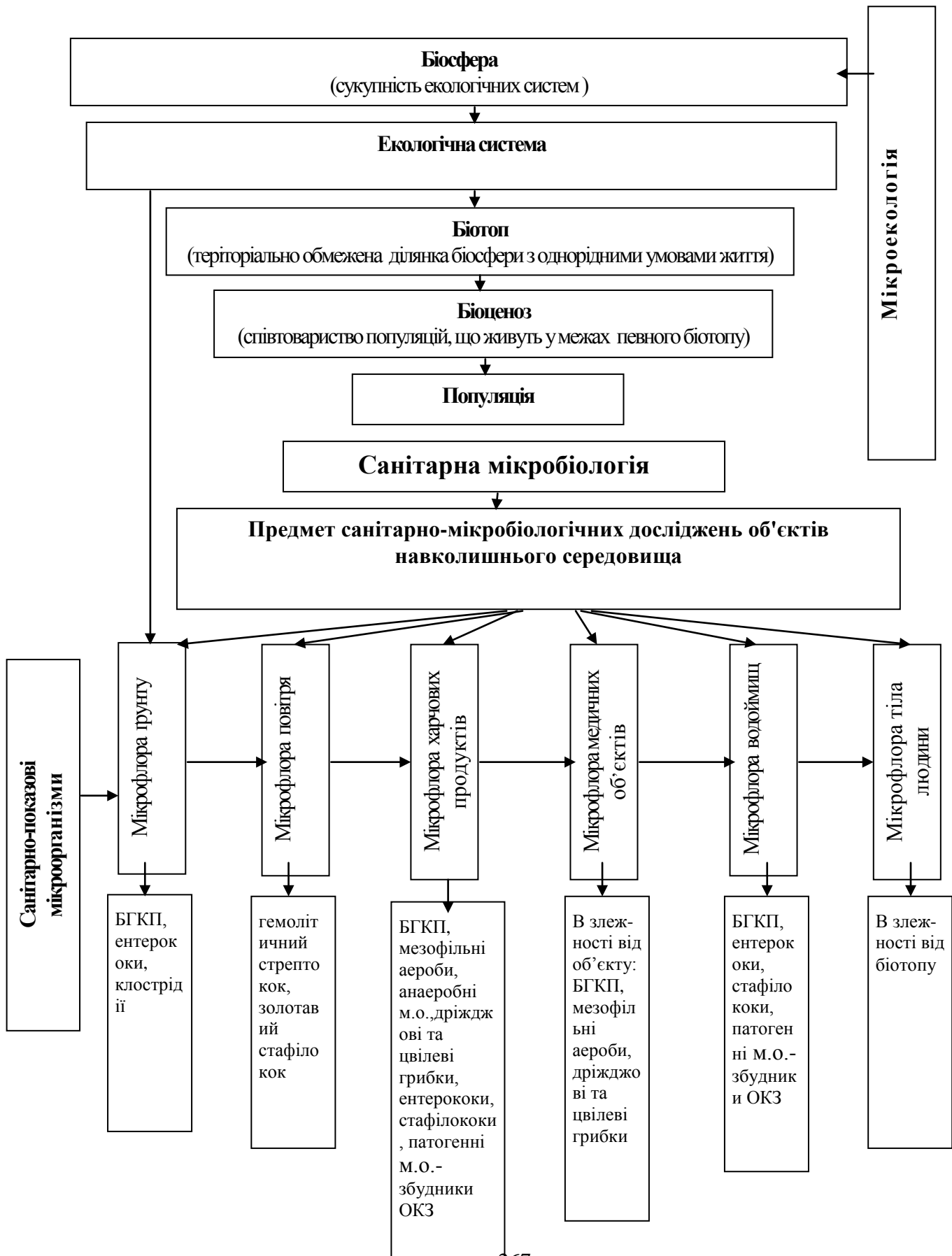
1000 - шуканий об'єм повітря в л.

Дані занести до протоколу.

Використовуючи таблицю № 4 зробити висновок про ступінь мікробного обсіменіння повітря.

Графологічна структура теми:

“Санітарна вірусологія і бактеріологія”



Таблиця.3.

**Розрахунок числа БГКП в 1л при дослідженні питної води
централізованого водопостачання**

| Число позитивних результатів з 3 об'ємів | | | Колі- індекс | Колі- титр | Число позитивних результатів з 3 об'ємів | | | Колі- індекс | Колі- Титр |
|---|----------|---------|-----------------|---------------|---|----------|---------|-----------------|---------------|
| по 100 мл | по 10 мл | по 1 мл | | | по 100 мл | по 10 мл | по 1 мл | | |
| 0 | 0 | 0 | <3 | >333 | 3 | 0 | 0 | 23 | 43 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 333 | 3 | 0 | 1 | 39 | 26 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 333 | 3 | 0 | 2 | 64 | 16 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 250 | 3 | 1 | 0 | 43 | 23 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 143 | 3 | 1 | 1 | 75 | 13 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 143 | 3 | 1 | 2 | 120 | 8 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 91 | 3 | 2 | 0 | 93 | 11 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 91 | 3 | 2 | 1 | 150 | 12 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 111 | 3 | 2 | 2 | 210 | 5 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 72 | 3 | 3 | 0 | 240 | 4 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 67 | 3 | 3 | 1 | 460 | 2 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 50 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 09 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 48 | 3 | 3 | 3 | >1100 | <09 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 86 | | | | | |

Таблиця.4.

Критерії оцінки повітря житлових приміщень.

| Оцінка повітря | Мікробне число | Вміст бактерій у м ³ | |
|----------------|-------------------|---------------------------------|----------|
| | | гемолітичний стрептокок | S.aureus |
| Літо | | | |
| Чистий | До 1500 | Одиничні | |
| Брудний | 2500 | 16-36 | |
| Зима | До 4500 | Одиничні | |
| Чистий | 7000 | 36-124 | |
| Брудний | | | |

**Зразок протоколу
до практичного заняття № 2.15**

Санітарна вірусологія і бактеріологія

Завдання 1. Визначення загальної кількості бактерій (мікробне число) в пробі питної води

Мікробне число _____

Висновок _____

Завдання 2. Визначення колі-титру, колі-індексу, проби питної води бродильним методом

Колі-титр _____

Колі-індекс _____

Висновок _____

Завдання 3. Визначення загальної кількості бактерій в повітрі навчальної лабораторії
седиментаційним методом

Мікробне число _____

Висновок _____

Завдання 4. Визначення загальної кількості бактерій та санітарно-показових в повітрі
навчальної лабораторії аспіраційним методом

Кількість колоній ікроорганізмів, що вирости на:

МПА _____

ЖСА _____

КА _____

Висновок _____

Дата _____

Підпис викладача _____

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.16
ТЕМА: НОРМАЛЬНА МІКРОФЛОРА ОРГАНІЗМУ
ЛЮДИНИ. ДИСБАКТЕРІОЗ. ПРОБІОТИКИ.

Актуальність теми. Організм людини колонізований більш 500 видами мікроорганізмами, що складають його нормальну мікрофлору. Вони знаходяться у стані рівноваги (еубіоз) між собою та з організмом людини. Порушення цієї рівноваги небезпечно для нашого організму тому, що нормальна мікрофлора виконує ряд найважливіших функцій, які забезпечують стабільність внутрішнього середовища організму. Тому знання ролі нормофлори людини є важливим питанням сучасної медицини.

Мета (загальна): уміти оцінювати стан порушень в мікробіоценозах організму людини, вміти корегувати ці порушення за допомогою антибіотиків та пробіотиків.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати роль нормальної мікрофлори організму людини у захисті організму від агресивних агентів зовнішнього та внутрішнього середовища.
2. Описувати мікрофлору різних біотопів організму людини у нормі та при патологічних процесах.
3. Характеризувати методи діагностики та корекції порушень у мікробіоценозах організму людини.
4. Пояснювати механізми дії та сферу застосування пробіотиків.

Базовий рівень:

1. Визначати стерильні та нестерильні порожнини організму людини (кафедра анатомії).
2. Трактувати антагонізм як біологічне явище (кафедра медичної біології).
3. Пояснювати роль ферментів у процесі травлення (кафедра біохімії).
4. Оцінювати роль вітамінів як регуляторів у метаболізмі (кафедра біохімії).

Для того, щоб Ви могли уявити, чи відповідає базовий рівень Ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань.

Завдання 1. Назвіть порожнини людини, де мікробіоценоз представляє наявність найрізноманітніших бактерій.

Завдання 2. На підставі чого роблять висновок, що даний мікроорганізм має найбільш антагоністичну властивість ніж інші?

Завдання 3. Як називаються ензими, які розщепляють жири?

Завдання 4. Стан організму при недостатній кількості вітамінів.

Інформацію для поповнення знань-умінь можна знайти у наступних підручниках:

1. Привес М.Г., Лисенко Н.И., Бушков В.И. Анатомия человека.-М.: Медицина.- 2001.
2. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.:Медицина.-2002.-725 с.
3. Березов Т.Т.,Коровкин В.Ф.Биологическая химия.-М.:Медицина.-2001.
4. Слюсарев А.А., Жукова С.В. Биология с общей генетикой. – М.Медицина. 1987.

Теоретичні питання, на основі яких можливе виконання цільових видів діяльності:

1. Поняття про нормальну мікрофлору: її роль та функції в організмі.
2. Поняття про біотоп, мікробіоценоз мікроекологічної системи організму людини.
3. З призвищами яких вчених пов'язане навчання про нормальну мікрофлору.
4. Гнотобіологія. Її значення в медичній мікробіології та імунології.
5. Поняття про біотехнологію.
6. Автохтонна та аллохтонна мікрофлора тіла людини.
7. Мікрофлора шкіри, дихальних шляхів, травної та сечостатевої систем.
8. Динаміка нормальної мікрофлори в онтогенезі людини.
9. Поняття про колонізаційну резистентність та її роль в інфекційній патології.
10. Дисбактеріоз (умови виникнення, наслідки розвитку, класифікація за збудником та локалізацією).
11. Методи діагностики, санації, корекції дисбактеріозів.
12. Еубіотики та пробіотики – препарати для відновлення нормальної мікрофлори організму людини. Механізм дії.
13. Наукова проблема кафедри мікробіології ДДМА.

Література для засвоєння знань-умінь за данною темою:

1. Медицинская микробиология , вирусология и иммунология/ Под ред.Л.Б. Борисова, М.: Медицина, 2005.-С.121-129, 136-148.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.67-70, 190.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Л.Б.Борисова, М.: Медицина, 1984.- С.79-81.
4. Матеріали лекції з теми "Нормальна мікрофлора організму людини".
5. Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Вальчук С.И. Роль микроэкологии организма человека и принципы ее коррекции.- Днепропетровск: Пороги.- 2003. – 230 с.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьева.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 88-93, 303.
7. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – Киев: ТОВ "Червона рута – Турс" – 2008. – С. 21-188.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми „Нормальна мікрофлора організму людини.” (додаток 1).

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з МПА, Ендо, Сабуро, суміш *S.aureus*, *Vibrio*, А-бактерін (ампули, флакони) та інші пробіотики.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Ознайомитися із морфологією мікроорганізмів, які складають нормальну мікрофлору нестерильних порожнин тіла людини:
 - а) вивчити пофарбовані мазки з морфології представників нормальної мікрофлори людини: лактобактерій, бифідумбактерій, кишкової палички. Визначити морфологічні ознаки цих мікроорганізмів. Малюнки занести у протокол.

б) приготувати та пофарбувати мазки з зубного нальоту за методом Грама. Замалювати мікроорганізми ротової порожнини. Звернути увагу на різноманітність бактерій. Порівняти отриманий мазок із тим, що зображений на таблиці "Мікрофлора зубного нальоту", визначити мікроорганізми, що спостерігаються.

в) приготувати та пофарбувати мазки з харкотіння за методом Грама. Замалювати мікроорганізми дихальних шляхів. За допомогою таблиці визначити, до якої морфологічної групи вони належать.

2. Розібрати методику дослідження мікробного пейзажу кишечника:

а) для виявлення патогенних ентеробактерій досліджуваний матеріал засівають на середовище Ендо, Плоскіррова, вісмут-сульфітний агар.

б) з розведення 10^{-3} 0,1 мл засівають на середовище Сабуро, для виявлення мікроорганізмів р.Candida та на ЖСА для виявлення стафілококів.

в) з розведення 10^{-5} 0,1 мл засівають на середовище Ендо і на 5% кров'яний агар для виділення і кількісного обліку умовно-патогенних ентеробактерій, кокової групи, гемолітичних форм.

г) з розведення 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} по 0,1 мл засівають на середовище Блоурока, гідролізатно-молочне середовище чи інші подібного складу середовища для виявлення біфідобактерій.

д) для кількісного визначення лактобактерій по 1 мл з цих же розведень засівають на середовище МРС-3.

Критерії оцінки дисбактеріозу кишечника:

- 1) Виявлення біфідобактерій у розведеннях нижче ніж 10^{-8} ступеню чи повна їх відсутність.
- 2) Теж саме у відношенні лактобактерій.
- 3) Збільшення кількості лактозонегативних і повільнозбражуючих ешеріхій – більш 10% від загальної їхньої кількості.
- 4) Поява гемолітичної флори, яка відсутня у здорової людини.
- 5) Виявлення умовно-патогенних ентеробактерій понад 10^{-4} на 1г фекалій (протей, клебсієла, цитробактер та ін.).
- 6) Виявлення золотистого стафілококу.
- 7) Виявлення грибів р.Candida більш ніж 10^{-3} на 1г фекалій.
- 8) Зниження чи різке підвищення кількості кишкової палички на 1г фекалій.

Для дисбактеріозу характерно сполучення декількох показників зміни мікрофлори і виникнення нових їх асоціацій в динаміці захворювання.

Розглянути запропоновані результати аналізів на дисбактеріоз кишечника. Визначити у протоколі ступень дисбактеріозу для кожного випадку.

Таблиця 1.

Ступені дисбактеріозу.

| Ступінь дисбакте-ріозу | Вміст облигатних анаеробів (<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i>) | Вміст факультатив. анаеробів та аеробів <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia</i> | Клінічні прояви |
|------------------------|--|---|--|
| 1 | без зміни у нормі (10^{-8} та вище на 1г фекалій) | незначне підвищення або зниження | норма |
| 2 | незначне зниження (до 10^{-7} та нижче) | зниження <i>Lactobacillus</i> (10^{-5} та нижче) | незначна диспепсія |
| 3 | - значне зменшення анаеробів (10^{-6}); - значне підвищення атипичних <i>E.coli</i> (гемолітичні та лактозонегативні); - колонізація біотопа одним з умовно-патогенних мікробів (<i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>Clostridium</i>) | | Понос, погане травлення та засвоєння їжі |
| 4 | - зниження захисної анаеробної та аеробної мікрофлори (нижче 10^{-4}), - колонізація біотопа кількома видами умовно-патогенною мікрофлорою, - поява у кишечнику патогенних бактерій, - транслокація кишкової мікрофлори за межі біотопу. | | Зниження імунітету, діарея, різке зниження ваги тіла, інфекції |

3. Pozнайомитися з науковою проблемою кафедри, де створений новий пробіотик А-бактерін, що є препаратом подвійного призначення (застосовується зовнішньо та перорально). До складу його входять мікроби антагоністи з роду *Aerococcus*, виділені з грудного молока (штам №167) з вираженою антагоністичною активністю за рахунок адгезії та продукції різних біологічно активних речовин. Стимулюють імунітет.

Області застосування:

профілактика і лікування гнійно-запальних процесів шкіри та слизових оболонок;

корекція дисбактеріозів;

профілактика кишкових інфекцій та бактеріоносійства.

Вивчити антагоністичну активність виробничих штамів двох еубіотиків (Колібактеріну та А-бактеріну) шляхом посіву методом „штриха” на добові культури *S.aureus* та *Vibrio*-р 6078 на ПМА. Врахувати готові результати та занести їх до протоколу.

4. Розглянути запропоновані зразки біопрепаратів: „Колібактеріну”, „Біфіколу”, „Біфідумбактеріну”, „Лактобактеріну”, „Біоспоріну”, „А-бактеріну”. Заповнити таблицю, вказати, які мікроорганізми входять до складу пробіотиків.

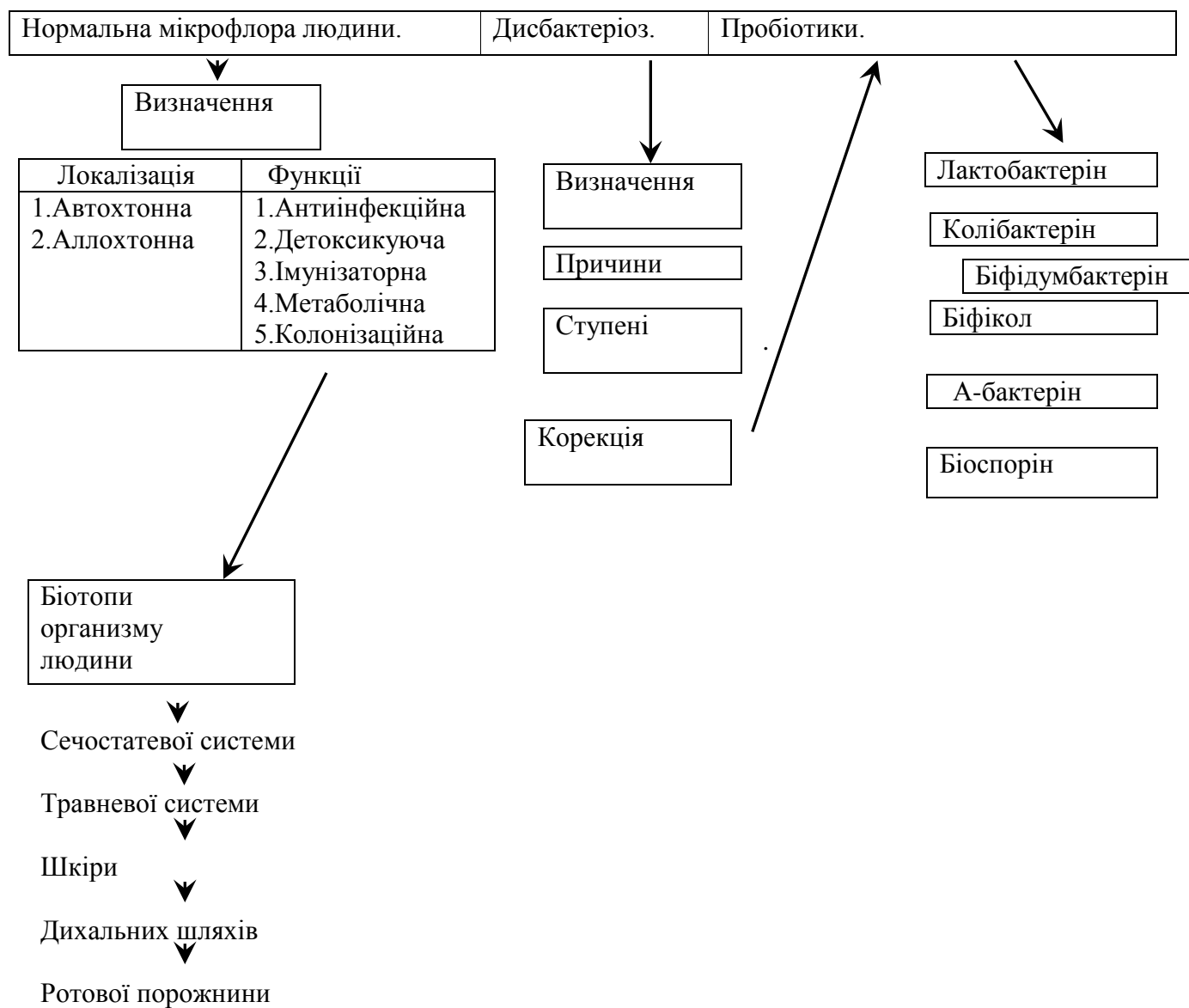
Ознайомитися з інструкціями щодо застосування їх у практиці.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

1. До лікаря- педіатра на прийом звернулася матір дитини 1,5 роік з скаргами на те, що її дитина погано набирає вагу, дратівлива та страждає на періодичні проноси. Враховуючи, що місяць тому дитина пройшла курс антибіотикотерапії з приводу ангіни, лікар запідозрив дисбактеріоз. Які лабораторні дослідження необхідно призначити лікарю для встановлення діагнозу?
2. Після лабораторного обстеження фекалій у пацієнта виявлено значне зниження лакто- та біфідум бактерій. Які висновки можна зробити на підставі отриманих результатів? Оцініть статус хворого?
3. Із фекалій дворічної дитини висівається клебсієла у кількості 10^5 на 1 г фекалій. Лікар призначив замісну терапію пробіотиками. Який пробіотик доцільно застосувати у даному випадку, якщо антагонізм „Лактобактеріна” по відношенню до клебсієли складає – 7 мм затримки росту, „Колибактеріну” – 5 мм, „А-бактеріну” – 14 мм?
4. На протязі тривалої антибіотикотерапії пацієнту було призначено застосовувати „Біоспорин”, а після „Лактобактерін”. Обґрунтуйте призначення пробіотиків у даному випадку.

Графологічна структура теми:

“Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробиотики”



Зразок протоколу до практичного заняття № 2.16

Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробіотики.

Завдання 1. Нормальна мікрофлора тіла людини.

а) морфології представників нормальної мікрофлори кишечника:

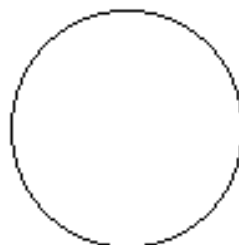
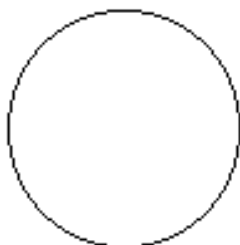
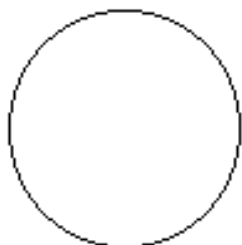


Рис.1 Лактобактерії

Рис.2 Біфідумбактерії

Рис.3 Кишкова паличка

б) морфології представників нормальної мікрофлори ротової порожнини та дихальних шляхів.

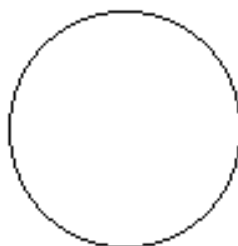
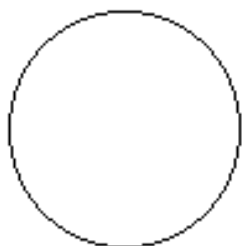


Рис.4 Мікрофлора зубного нальоту

Рис.5 Мікрофлора дихальних шляхів

Завдання 2. Досліджували кишковий мікробіоценоз (демонстрація)

| № | Мікрофлора на 1г фекалій | Норма | П А Ц І Є Н Т И | | | | |
|----|--|---|--------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Патогенні ентеробактерії | 0 | 0 | 0 | 0 | S.sonnei 10 ⁻³ | 0 |
| 2 | Біфідумбактерії | 10 ⁻⁸ – 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁷ | 0 | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁹ |
| 3 | Лактобактерії | 10 ⁻⁸ – 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁶ | 0 | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁵ |
| 4 | Загальна кількість кишкової палички | 2.10 ⁻⁸ | 1.10 ⁻⁸ | 1.10 ⁻⁸ | 2.10 ⁻⁵ | 5.10 ⁻⁷ | 4.10 ⁻⁷ |
| 5 | Кишкова паличка з слаб. ферм. властивостями | До 10% | 2% | 50% | 40% | 20% | 10% |
| 6 | Гемолітична паличка | 0 | 0 | 30% | 80% | 0 | 0 |
| 7 | УПЕ (протей, клебсієла, цитробактер, псевдомона- ди) | До 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | Клебсієла 10 ⁻⁵ | Протей 10 ⁻⁵ | Цитробак- тер 10 ⁻⁵ |
| 8 | Стафілокок сапрофітний, епідермальний | До 10 ⁻⁴ | 10 ⁻³ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | Стафілокок золотистий | 0 | 0 | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | 0 | 10 ⁻⁴ |
| 10 | Гриби р.Candida | До 10 ⁻³ | 0 | 0 | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁴ | 0 |

Висновок: _____

Завдання 3. Познайомилися з науковою проблемою кафедри мікробіології, співробітники якої створили новий еубіотик А-бактерін.

Виробничий штам А-бактеріну _____

Його властивості _____

Області застосування _____

Завдання 4. Познайомилися з іншими пробіотичними препаратами. Вивчили антагоністичну активність *E.coli* M-17 (основа колібактеріну), *A.viridans* №167 (основа А-бактеріну).

| Назви антагоністів | Затримки росту тест культур | |
|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | <i>S.aureus</i> | <i>Vibrio p-6078</i> |
| <i>E.coli</i> M-17 | | |
| <i>A.viridans</i> №167 | | |

Висновок: Більш вираженою антагоністичною активністю по відношенню *S. aureus*, *Vibrio p-6078* є _____.

Завдання 5. Заповнити таблицю, вказати які мікроорганізми входять до складу пробіотиків

| Назва пробіотика | Склад | Застосування |
|------------------|-------|--------------|
| Колібактерін | | |
| Біфідумбактерін | | |
| Лактобактерін | | |
| А-бактерін | | |
| Біфікол | | |
| Біоспорін | | |

Дата _____

Підпис викладача _____

ЕТАЛОНИ ВІДПОВІДЕЙ ДО ЗАВДАНЬ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ І САМОКОНТРОЛЮ ВИХІДНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ-УМІНЬ

Практичне заняття №1.1

1. Роздільна здатність – це найменша відстань між двома точками, на якій вони ще не зливаються в одну, сприймаються як окремі об'єкти. Роздільна здатність людського ока становить приблизно 0,2 мм. Якщо мікроскоп дає збільшення, наприклад, у 100 разів, то його роздільна здатність буде $0,2/100=0,002$ мм.
2. Зображення буде збільшене та перевернуте. Тому, щоб при мікроскопії пересунути поле зору праворуч, препарат треба перемістити ліворуч.
3. Через різний коефіцієнт заломлення відбувається розсіювання світла. Щоб запобігти цьому та забезпечити потрібне освітлення препарату, при мікроскопії використовують імерсійну рідину, яка має коефіцієнт заломлення близький до скла.
4. Люмінесценція – здатність поглинати випромінювання з високою енергією та випромінювати з низькою. Мікроорганізми, що не мають власної здатності до люмінесценції, можна обробити спеціальними барвниками – флюорохромами.
5. У світловий мікроскоп не можливо побачити об'єкт, який за розмірами менший за довжину світлової хвилі у видимій частині спектру. У електронному мікроскопі використовується випромінювання з меншою довжиною хвилі.

Практичне заняття № 2.1

1.- а, б, г, д, з, к, м. 2.- До основних форм клітин відноситься кулевидна, багатокутова, призматична, веретеноподібна, зірковидна. Форма клітин залежить від взаємовідносин клітинних груп, які входять до складу даної тканини. Одиночні клітини частіше кулевидні. Але важливе значення має функціональний момент. Наприклад, зірковидна форма нервових клітин з відростками обумовлена функцією передачі нервового імпульсу з однієї частини організму в іншу, з однієї нервової клітини на сусідні. Теж саме можна сказати і за м'язові клітини, які мають видовжену, веретеноподібну форму. Їх функції – виконувати розслаблення та скорочення, а в зв'язку з цим зближення чи віддалення одне від одного в різних частинах тіла.

Практичне заняття № 3.1

1.- Джгутики, війки, псевдоподії. 2.- а) білки, б) вуглеводи, в) мінеральні речовини, г) вода, д) мікроелементи. 3.- а) окуляр, б) дзеркало, в) об'єктив, г) кондісор, д) тубус. 4. – За допомогою темнопольного мікроскопу розглядають препарати «висяча крапля» або «роздавлена крапля», що дозволяє спостерігати живі мікроорганізми. 5.- За допомогою хімічних речовин фіксують мазки-відбитки з органів та тканин, мазки крові, а також призначені для виявлення деяких структур бактеріальної клітини за допомогою складних методів фарбування.

Практичне заняття № 4.1

1.- а) наявність міцелію, б) стірольний компонент, в) хітін, г) спороутворення, д) розмноження спорами, міцелієм, наявність полового процесу. **2.-** Спороутворення є способом розмноження, а цисти утворюються у несприятливих умовах. **3.-** а) стеригми, б) конідії, в) склероції, г) аски, д) базидії. **4.-** Капсула. **5.-** Нагріти.

Практичне заняття № 5.1

1. А-3,6; Б-3,5; В-1,2,5; Г-4,7. **2.** Проміжні продукти, можуть включатися до процесів біосинтезу, або розкладатися з виділенням енергії. **3.** За джерелом енергії живі істоти діляться на фототрофи, що використовують для біосинтетичних реакцій енергію сонячного світла, і хемотрофи. Хемотрофи отримують енергію за рахунок окислення неорганічних речовин (нітрифікуючі бактерії та ін.) і органічних сполук (більшість бактерій, у тому числі і патогенного для людини виду). **4.** Фактори росту грають роль каталізаторів в біохімічних процесах клітини і є структурними одиницями при утворенні деяких ферментів. До чинників зростання відносяться різні вітаміни, деякі амінокислоти, пуринові і піримідинові основи та ін. **5.** Дихання (або біологічне окислення) — це складний процес, який супроводжується виділенням енергії, необхідної для синтезу різних органічних сполук. Бактерії, як і вищі тварини, для дихання використовують кисень. Проте Л. Пастером було доведено існування таких бактерій, для яких наявність вільного кисню є пагубним, енергію, необхідну для життєдіяльності вони отримують у процесі бродіння. **6.** Ферменти — біологічні каталізатори, високомолекулярні речовини білкової природи, що продукуються живою клітиною. Вони специфічні і грають найважливішу роль в обміні речовин мікроорганізмів. Специфічність їх пов'язана з активними центрами, що утворюються групою амінокислот, тобто кожен фермент реагує з певною хімічною сполукою та каталізує одну або декілька близьких хімічних реакцій. Наприклад: фермент лактаза розщеплює лактозу, мальтаза — мальтозу і т.д.

Практичне заняття № 6.1

1. Мітоз для соматичних клітин та мейоз для статевих. **2.** Неорганічні речовини, у складі яких є атоми, здатні змінювати ступінь окислення, наприклад сульфати або нітрати. **3.** Кислотна. **4.** 3г речовини та 97г розчину.

Практичне заняття № 7.1

1,2,3,4-відповідь Е.

Практичне заняття № 8.1

1- г. **2-** 3, 5, 6. **3-** від генотипу та умов зовнішнього середовища. **4-** ознаки спадкової мінливості передаються наступним поколінням. **5-** 1, 3.

Практичне заняття № 9.1

1. Треба взяти з попередньої пробірки 1 мл розчину у розведенні (1:10) перенести у другу і додати 9 мл фізіологічного розчину, отримаємо (1:100). **2.** Актиноміцети – проміневі гриби, що виглядають як ниткоподібні клітини, нагадують міцелій грибів, не утворюють повітряного міцелію. **3.** R-плазміда визначає стійкість бактерій до різноманітних лікарських препаратів, контролює синтез ферменту, який інактивує антибіотик. R-плазміда має складну молекулярну структуру. **4.** Відсутність мембран, за допомогою яких органели мікробної клітини відокремлені від цитоплазми. Відсутність ядра, є тільки нуклеоїд, не відокремлений від цитоплазми ядерною мембраною. Відсутність мітохондрій, хлоропластів, комплексу Гольджі. Відсутність мітозу. Відсутність клітинного центру.

Практичне заняття № 10.1

1-а) за рахунок відлучення верхнього шару відмерлих клітин епітелію; **б)** колаген, розташований, в основному, у самій шкірі і частково у підшкірній клітковині; **в)** потові залози та сальні залози. **2- а)** № 2 та 3, **б)** № 1, 2, 5. **3-а)** 1 та 9 мл; **б)** додати 1 мл слини у першу пробірку, переносити по 1 мл з попередньої пробірки у наступну, а з останньої відібрати 1 мл. **4-** моноцити крові, ретикулярні клітини лімфовузлів, ендотеліальні клітини судин, клітини нейроглії, купферівські клітини печінки.

Практичне заняття № 11.1

1- а) пласкі кістки та епіфізи трубчастих кісток; **б)** за грудиною; **в)** з лівого боку під ребрами; **г)** у тонкому кишечнику. **2-** у червоному кістковому мозку. **3-** навколо артерій. **4-** синім кольором. **5-** дрібні округлі клітини з крупним ядром. **6-** з глоткових кишень, активно функціонує у дитячому віці, у дорослих замінюється жировою тканиною. **7-** до глікопротеїдів.

Практичне заняття № 12.1

1- перейде у стан гелю; **2-** г ; **3-** 0,005; **4-а;** **5-** б, пов'язані всі.

Практичне заняття № 13.1

1- б, в, д, е. **2-** ультрафіолетове та рентгенівське випромінювання, окислювачі, аналоги азотистих основ, акрідинові барвники , **3-** генотипові зміни передаються у спадок і проявляються у наступних поколіннях, а фенотипові зникають при зміні умов середовища, **4-** г.

Практичне заняття № 14.1

1- з периферичної крові готують на предметному склі мазок „товста крапля”, фарбують його за Романовським-Гімзою, мікроскопують при збільшенні х 90 під імерсією, підраховуючи кількість клітин різного типу; **2-** г ; **3-** а, г .

Практичне заняття № 15.1

1. Клас, порядок, царство. **2.** ДНК забезпечує передачу та збереження генетичної інформації, РНК забезпечує синтез білків. **3.** Фосфоліпіди та білки. **4.** Певні речовини (рецептори) вірусу взаємодіють з рецепторами на поверхні клітини, мембрана інвагується і утворює внутрішньоклітинну вакуоль. **5.** Паразитизм. **6.** Рестриктаза «розрізає» молекулу ДНК, лігаза з'єднує її фрагменти.

Практичне заняття № 16.1

1. Існування мікрорганізмів за рахунок хазяїна, яке супроводжується нанесенням урон у вигляді того чи іншого захворювання. **2.** Відсутність білоксинтезуючих систем та систем мобілізації енергії. **3.** Мутантні фібробласти, міобласти відрізняються від ракових клітин тим, що при спроможності розмножуватись безконтрольно (як ракові) можуть зростати без фіксації на твердій поверхні. До незародкових органів відносяться: амніон, жовточний міхур, алантоїс, хоріон. Алантоїс – орган, який забезпечує водне середовище для розвитку зародку. Жовточний міхур – орган, який депонує поживні речовини, необхідні для розвитку зародку. Алантоїс – производне жовточного міхура, яке відіграє важливу роль у забезпеченні дихання та живлення зародку. Хоріон – ворсинкова оболонка – орган регулювання обмінних процесів зародку. **5.** Використання поживних середовищ для клітинних культур, які відрізняються своїм змістом у залежності від мети використання : ростові- для вирощування клітинних культур до внесення вірусу (з великою кількістю сироватки крові), та підтримуючі- для утримання інфікованих вірусом клітин (з малою кількістю чи повною відсутністю сироватки крові).

Практичне заняття № 17.1

1. Репродукція вірусу у заражених клітинах, проявляється у змінах морфології клітин. **2.** Ig класу М першими з'являються в сироватці крові, тому їх титр більше при гострих інфекціях, а IgG при хронічних. **3.** Гемолітична система вміщує еритроцити барана, гемолітичну сироватку кролика та комплемент морської свинки – використовується для РЗК. Гемоліз еритроцитів вказує на відсутність антигена або антитіла. Хомогени, та флюорохроми змінюють колір при наявності антигена в патологічному матеріалі. **4.** Діагностикум вміщує антигени мікроорганізмів та використовується для виявлення антитіл. **5.** Антитоксичні сироватки, лабораторні тварини. **6.** Для виявлення вірусів за склеюванням еритроцитів.

Практичне заняття №18.1

1. а)
2. в)
3. а)
4. г)
5. б).

Практичне заняття №19.1

1. Відмінності вірусів від клітинних форм життя: ультрамікроскопічні розміри, містять один тип нуклеїнової кислоти, не здатні до росту та бінарного поділу, не містять власних білок синтезуючих систем, є абсолютними внутрішньоклітинними паразитами.
2. Спіральна, кубічна, бінарна.
3. Культури клітин, курячі ембріони.
4. Адсорбція, проникнення віріона в клітину, внутрішньоклітинне розмноження вірусу, вихід вірусу з клітини.
5. Позитивна РЗК - відсутність гемолізу. Позитивна РПГА – осад у вигляді «парасольки», негативна – у вигляді «гудзика».

Практичне заняття №20.1

1. Складні віруси мають суперкапсид.
2. Клітина гине.
3. За допомогою мікроскопу, без імерсії.
4. Живі віруси, антивірусна сироватка, культура клітин або лабораторні тварини.
5. Джерелом інфекції є тварини, інфекція передається від тварини людині, а від людини людині не передається.
6. Геном ентеровірусів представлений РНК «+», що може функціонувати як і-РНК; вона зв'язується з рибосомами клітини хазяїна та забезпечує утворення ферменту РНК-залежної РНК-полімерази. Геном рабдовірусів представлений РНК «-», яка не має властивостей і-РНК, а в клітині не має ферментів, здатних використовувати РНК у якості матриці, тому для транскрипції вірусного геному потрібна власна РНК-залежна РНК-полімераза.

Практичне заняття №21.1

1. Такий тип взаємодії називають інтегративним, нерідко він приводить до персистуючої інфекції або до онкогенної трансформації інфікованої клітини.
2. б).
3. Імунобіологічні препарати, що використовуються у названих реакціях для виявлення вірусних антигенів містять мічені антитіла: у разі РІА міткою виступають радіоактивні ізотопи, ІФА – ферменти, ІЕМ – сполуки важких металів.
4. д).
5. Клітина, інфікована вірусом, виділяє інтерферон у міжклітинний простір. Там інтерферон зв'язується з рецепторами незаражених клітин і стимулює у цих клітинах синтез ферментів, які здатні руйнувати вірусну РНК. Інтерферони, які застосовуються у медицині мають різне походження: лейкоцитарний отримують при культивуванні лейкоцитів людини, стимульованих вірусом, ізольованою РНК, або іншим індуктором інтерферону; рекомбінантний – при культивуванні мікроорганізмів, до геному яких інтегровано ген людини, що відповідає з синтез інтерферону.

Практичне заняття №22.1

1.Рибосома.

2. Сплайсінг- механізм вирізування ділянок інтронів (некодуючих послідовностей) з первинних РНК-транскриптів та зшивання екзонів з метою формування зрілої мРНК. Сплайсінг забезпечує підвищення інформаційної місткості геному

3. а)Одноланцюжкова нефрагментована позитивна РНК, одно ланцюжкова нефрагментована негативна РНК, одноланцюжкова фрагментована негативна РНК, дволанцюжкова фрагментована РНК з транскриптазою, двонитьова позитивна РНК зі зворотньою транскриптазою б) Одноланцюжкова лінійна позитивна ДНК, одноланцюжкова кільцева ДНК, дволанцюжкова кільцева ДНК

4.Допоміжники (активатори): індуктори Т-хелперів (CD 29), індуктори Т-супресорів(CD 45) Т-хелпери 1(CD 4, CD 44), Т- хелпери 2 (CD 4, CD 28), Ефектори: Т-кілери (CD 8), Регулятори Т-супресори (CD 11, CD 8), Т-контрсупресори.

5.Збудниками опортуністичних інфекцій є умовно-патогенні мікроорганізми, які можуть мешкати у організмі здорової людини та не завдавати шкоди. Але за несприятливих умов, наприклад при порушенні імунітету, вони викликають захворювання, навіть до тяжких генералізованих форм.

Еталони відповідей.

Практичне заняття №2.1

1. Відрізнити стафілококи від стрептококів можливо у пофарбованих мазках: стфілококи розташовані у вигляді скупчень, що нагадують “грона винограду”, а стрептококи - у вигляді “ланцюжка”.

2. Для виявлення гемолітичної активності використовується кров'яний агар (у живильне середовище додають еритроцити). Про наявність гемолізинів свідчить утворення прозорих або зеленуватих зон навколо колоній мікроорганізмів.

3. Для постановки реакції нейтралізації використовуються: 1) мікробний токсин, 2) сироватка (діагностична або досліджувана, у залежності від мети постановки реакції), 3) живий об'єкт, сприятливий до дії токсину (лабораторні тварини або клітинні культури). Реакція вважається позитивною, коли тварини, яким було введено суміш сироватки з токсином, вижили, тоді як контрольна група тварин загинула. У разі використання клітинних культур відсутність руйнування клітин означає позитивну реакцію, а наявність ЦПД – негативну.

4. Аутовакцина готується з мікроорганізмів, виділених від хворого і вводиться тому самому хворому. Призначається для активної імунізації хворих з млявим перебігом інфекційного захворювання, наприклад фурункульозу. Належить до вбитих вакцин.

Практичне заняття №2.2

1. Диплококи розташовані парами. Грампозитивні мають синьо-фіолетове забарвлення, грамнегативні – червоне або рожеве.
2. Для фарбування за Грамом використовуються: генціанвіолет, розчин Люголя, етиловий спирт 96 %, водний розчин фуксину.
3. д)
4. Ауксотрофи – це мікроорганізми, які втратили здатність синтезувати певні азот-вмісні речовини і повинні отримувати їх у готовому вигляді. Така необхідна для ауксотрофа речовина називається ауксин або фактор росту (якщо цієї речовини немає у поживному середовищі, то ауксотроф на ньому не росте). Середовища для ауксотрофів – б) та д).
5. При постановці РП у рідкому середовищі позитивна реакція враховується за утворенням кільця помутніння у місці контакту антигену з сироваткою (реакція кільцепреципітації).
6. Для постановки РЗК використовуються: антиген, сироватка (досліджувана або діагностична), комплімент, еритроцити, гемолітична сироватка. Утворення осаду еритроцитів враховується як позитивна реакція, гемоліз – як негативна.

Практичне заняття №3.2

1. Біохімічні властивості бактерій вивчаються при посіві на диференціально-діагностичні середовища, такі як середовища Гіса, Ендо, Ресселя та ін.
2. б).
3. Антитіла сироватки з'єднуються з антигенами бактерій і це викликає склеювання мікробних клітин. Якщо реакція позитивна, то утворюється осад у вигляді пластівців або зерен.
4. Пробіотики – це препарати з живих мікроорганізмів, як правило, представників нормальної мікрофлори людини. Вони є антагоністами патогенних бактерій, пригнічують їх розмноження за рахунок виділення коліцинів, перекисів, ферментів; забезпечують колонізаційну резистентність, здатні зв'язувати або руйнувати мікробні токсини. До пробіотиків належать колібактерин, біфідобактерин, біоспорин, А- бактерин, ентерол та ін.

Практичне заняття №4.2

1. б).
2. в), г).
3. Реакція аглютинації відбувається з крупними корпускулярними антигенами, такими антигенами можуть бути вбиті бактеріальних клітин.
4. в).
5. Черевнотифозний бактеріофаг проникає у клітини *Salmonella typhi*, розмножується там та викликає їх лізис.

Практичне заняття №5.2

1. Основні морфологічні групи бактерій: а) палички, б) коки, в) спіралевидні, г) ниткоподібні, д) спороутворюючі.
2. Джгутики розташовані по всій поверхні бактерії.

3. Пофарбувати за методом Ожешки: у кластрідій діаметр спори більший за діаметр клітини, тому клітина зі спорою нагадує веретено, тенісну ракетку, або барабанну паличку; у бацил діаметр спори не перевищує діаметру клітини і клітина зі спорою зберігає циліндричну форму.
4. Екзотоксини відрізняються від ендотоксинів за такими ознаками: а) виділення клітиною в зовнішнє середовище, б) стійкість в навколишньому середовищі, в) хімічний склад, г) механізм дії, д) специфічність. Екзотоксини можуть утворювати як Гр+ так і Гр - бактерії, а ендотоксин є тільки у Гр -.
5. Етапи бактеріологічного дослідження: а) посів на живильне середовище для накопичення культури, б) відсів ізольованих колоній на скошений агар, в) біохімічна ідентифікація, г) визначення антигенних властивостей, д) проба на токсигенність.
6. Пофарбувати за методом Бурі –Гінса.

Практичне заняття №6.2

1. Палички, більшість має джгутики, мають капсулу, скотобактерії, справжні бактерії.
2. Соматичний, капсульний, джгутиковий, Vi –антиген, екзотоксин.
3. Адгезини, penetрація, екзотоксини, інвазія, ЛПС.
4. Пептонна вода, лужний агар, середовище Ендо, строкатий ряд Гіса, 3-х цукрове середовище.
5. Фермент уреаз.
6. Спіралеподібна форма, джгутики.

Практичне заняття №7.2

1. а) антигенне, б) діагностичне, в) патогенне, д) захисне.
2. Vi антиген, О антиген, Н антиген, К антиген.
3. Токсигенність- генетично детермінована спроможність синтезувати екзотоксин, токсичність- наявність ендотоксину.
4. Генетична трансформація, трансдукція, кон'югація.
5. Лізогенними називаються культури бактерій, які у своєму геномі містять профаг. Фагові гени здатні контролювати прояв різних властивостей бактерії, в тому числі і токсиноутворення. Отже, ті штами дифтерійної палички, що містять профаг, синтезують екзотоксин; лише вони викликають захворювання людей на дифтерію.
6. R-форми утворюють шорсткі колонії, неправильної форми, щільної або крихкої консистенції. S-форми утворюють гладенькі округлі колонії м'якої вологої консистенції. Причиною дисоціації є генетична неоднорідність природних популяцій мікроорганізмів.
7. Екзотоксин є повноцінним антигеном, отже його наявність можна встановити за допомогою відповідних антитіл. Реактив, який містить такі антитіла – це антитоксична протидифтерійна сироватка.

Практичне заняття №8.2

1. Патогенне, антигенне, імуногенне, діагностичне.

2. Мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний, імунофлюоресцентний, алергологічний, серологічний, ДНКова діагностика.
3. Препарати ПАСК, ізоніазиди, стрептоміцини, а також ріфампіцини, циклосерин.
4. Ожешко, Ціля-Нільсена, Нейсера, Гінс-Бурі, Лефлера, Морозова.

Практичне заняття №9.2

1. Утворення спор спрямовано на захист мікроорганізму в оточуючому середовищі. Стійкість спор пов'язана з їх структурою (товста багат шарова оболонка), хімічним складом (наявність діпіколінату кальцію, висока концентрація білків, низький вміст води), відсутністю активних метаболічних процесів.
2. Облігатні анаероби здатні рости тільки у відсутності кисню. Якщо у середовище, де знаходилися анаероби, потрапляє O_2 , то через відсутність ферментів каталази або пероксидази, у їхніх клітинах накопичується перекис водню, що призводить до загибелі вегетативних клітин. Анаеробні бактерії розрізняються за своєю чутливістю до кисню, так клостридії утворюють спори, на які O_2 не впливає, тобто вони є аеротолерантними.
3. Для культивування анаеробів використовують анаеростати, метод Веньяль-Війона, Фортнера, Перетца, середовище Кітта- Тароцци.
4. а), б), е).
5. Штучний активний антитоксичний імунітет створюють за допомогою вакцин– анатоксинів, пасивний - за допомогою антитоксичних сироваток або специфічних імуноглобулінів.

Практичне заняття №10.2

1. Звивисті форми бактерій відрізняються за видом та кількістю завитків: вібріони мають 1/4 завитка спіралі (вигляд коми), спірили- вигини з 1 або 2-3 обертами спіралі, спірохети - спіралью звиті у вигляді вигнутого довгого гвинта.
2. За спроможністю до руху бактерії поділяються на нерухомі, плазуючі (ковзні) та плаваючі.
3. Рух плаваючих бактерій забезпечується екстрацелюлярними та інтрацелюлярними (периплазматичними) джгутиками.
4. Для постановки реакції зв'язування комплексу необхідні: 1 система – діагностична (досліджувана інактивована сироватка, антиген та стандартний комплекс), 2 система – індикаторна гемолітична система (еритроцити барана та гемолітична кроляча сироватка).

Практичне заняття №11.2

1. Це грамнегативні бактерії, внутріклітинні паразити, здатні розмножуватись лише у живих клітинах.
2. е .

3. Процес склеювання корпускулярного антигена з антитілом за наявності електролітів, який закінчується утворенням видимого неозброєним оком осаду – аглютинату.
4. Забарвлення за методом Романовського-Гімзи.
5. Перехресно реагуючі або гетерогенні антигени.

Практичне заняття №12.2

1. Капсула на 90% чи більше складається з води, тому вона не забарвлюється при фарбуванні бактерій (методи Брі-Гінса, Романовського-Гімзи) і у пофарбованих мазках виглядає як прозорий ареол навколо клітини.
2. б.
3. РА (реакція аглютинації), РГА – (реакція гемаглютинації), РНГА – (реакція непрямой гемаглютинації), РЗК – (реакція зв'язування комплементу), ІФА – імуноферментний аналіз.
4. Мікробний алерген вводиться внутрішньо шкірно. У разі позитивної реакції через 48-72 год спостерігається почервоніння та припухлість, що свідчить про інфікованість людини відповідним збудником. Це прояв інфекційної алергії, яка належить до гіперчутливості уповільненого типу (IV тип алергії).
5. У даному випадку живі вакцини є профілактичними препаратами, а вбиті використовуються як лікувальні при хронічних формах захворювання, вони активують клітинний та гуморальний імунітет.

Практичне заняття №13.2

1. а, д.
2. Мікроміцети мають міцелій субстратний та повітряний, великі колонії з радіальною смужкою, колонії ростуть до 20 днів, утворюють пігменти, краплі ексудату, краї колоній відрізняються.
3. За хімічним складом та побудовою клітини актиноміцети є типовими прокаріотами, але ріст на поживних середовищах у вигляді міцелію та розмноження за допомогою спор наближає їх до грибів
4. Пеніцилін блокує синтез пептидоглікану – основного компоненту клітинної стінки прокаріотів, у грибів клітинна стінка не містить цієї речовини тому пеніцилін на них не діє. Тетрациклін блокує синтез білка на рибосомах прокаріотів (70 S), а гриби є еукаріотами і мають рибосоми 80 S.
5. Деякі речовини здатні поглинати короткохвильові промені, а потім давати випромінювання з більшою довжиною хвилі (наприклад гриб мікроспорум може поглинати енергію ультрафіолетових променів та випромінювати її у видимій частині спектру – жовтій або зеленій).

Практичне заняття №14.2

1. а), г), е).
2. Стафілококи здатні синтезувати фермент β-лактамазу, який руйнує молекулу пеніциліну. Ген, що відповідає за утворення цього ферменту, міститься у R-плазміді, яка є кон'югативною.

3. Факторами патогенності мікроорганізмів виступають: токсини (екзо- і ендо-), різноманітні ферменти агресії, інвазії, фактори адгезії та колонізації, наявність капсули та особливості хімічного складу і структури бактеріальної клітини збудника.

4. Зробити розсів патологічного матеріалу на щільне поживне середовище для утворення ізольованих колоній.

5. У клітинах утворюється H_2O_2 , але немає ферментів, які її розщеплюють.

6. Анаеробні умови для культивування бактерій можуть бути створені за допомогою фізичних чинників: заміна повітря інертним газом або CO_2 , використання адсорбентів кисню; хімічних чинників: видалення O_2 за рахунок горіння, додавання речовин, що знижують окислювальний потенціал середовища; біологічних чинників: поглинання кисню аеробами.

Практичне заняття № 15.2

1. Організм людини, в середньому, на 65% складається з води. Вода бере участь у біохімічних, фізіологічних та фізико-хімічних процесах обміну речовин та енергії: травлення, дихання, синтез білків, жирів, вуглеводів.

2. Вміст бактерій в 1 м³ повітря розраховується за формулою:

$$C = \frac{a \times 1000}{b},$$

де С – кількість бактерій в 1 м³;

а – вміст бактерій в дослідженому об'ємі повітря;

б – кількість дослідженого повітря.

3. Седиментація – здатність (у тому числі і мікроорганізмів) осідати на поверхні (в тому числі і поживного середовища) через силу тяжіння.

А) На поверхні середовища осідають тільки грубодисперсні фракції аерозолі.

Б) На застосовуваних поживних середовищах росте тільки частина повітряної мікрофлори.

В) Метод зовсім непригодний для дослідження бактеріальної забрудненості атмосферного повітря.

Практичне заняття № 16.2

1. Ротова порожнина, кишечник. 2. По найбільшій зоні затримки росту тест-мікроба. 3. Ліпаза. 4. Авітаміноз.