

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра загальної і клінічної епідеміології та біобезпеки
з курсом мікробіології та вірусології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи

Едуард БУРЯЧКІВСЬКИЙ

«01» вересня 2024 р.

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА
ДО ПРАКТИЧНИХ З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ 1.
ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ.

Факультет, курс Медичний, 2 курс

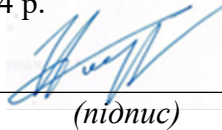
Навчальна дисципліна «Мікробіологія, вірусологія та імунологія»

Затверджено:

Засіданням кафедри загальної і клінічної епідеміології та біобезпеки
з курсом мікробіології та вірусології
Одеського національного медичного університету

Протокол № 1 від “26” серпня 2024 р.

Завідувач кафедри _____



(підпис)

Микола ГОЛУБЯТНИКОВ

Розробники:

Голубятников М.І., зав. кафедри, д.мед.н., професор, Грузевський О.А., д.мед.н., професор, Головатюк О.Л., к.мед.н., доцентка; Кольцова І.Г., к.мед.н., доцентка, Куртова М.М., к.мед.н., доцентка, Шевчук Г.Ю., к.б.н., доцентка, Дениско Т.В., асистентка, Дубіна А.В., асистентка, Кагляк М.Д., асистентка, Кобильник С.Н., асистентка, Табуліна А.М., асистентка, Тарасов Є.В., асистент.

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ

Практичне заняття

Тема: Предмет і задачі медичної мікробіології. Обладнання та устаткування мікробіологічної лабораторії. Мікроскопічний метод вивчення мікроорганізмів. Техніка мікроскопії. Методи мікроскопічного вивчення мікроорганізмів. Основні форми бактерій. Прості і складні методи фарбування. Фарбування за Грамом.

Мета: Ознайомити студентів з організаційною структурою вивчення курсу мікробіології, вірусології й імунології, дати уявлення про предмет медичної мікробіології, обладнання та устаткування мікробіологічної лабораторії, надати можливість оволодіти мікроскопічним методом вивчення мікроорганізмів. Ознайомити студентів з принципами класифікації мікроорганізмів, навчити методиці приготування мазка з культури бактерій, вирощених в рідкому поживному середовищі, фарбування за Грамом, диференціювання бактерій за морфологією та відношенням до фарбування за Грамом. Дати уявлення про основних представників світу мікроорганізмів.

Основні поняття: Загальне збільшення мікроскопа. Корисне збільшення мікроскопа. Збільшення об'єктива. Збільшення окуляра. Числова апертура об'єктива. Роздільна здатність. Межа роздільної здатності оптичних приладів. Нативні препарати. Фіксовані препарати. Імерсійна система. Світлова мікроскопія. Метод темного поля. Фазово-контрастна мікроскопія. Флуоресцентна мікроскопія. Інтерференційна мікроскопія. Поляризаційна мікроскопія. Конфокальна мікроскопія. Електронна мікроскопія. Прості методи фарбування препаратів. Бактеріальна культура. Прокаріоти. Систематика. Класифікація. Таксономія. Поняття “вид” у мікробіології. Морфовари. Біовари. Хемовари. Серовари. Форми бактерій. Розташування бактерій у мазку. Тинкторіальні властивості. Прості і складні методи фарбування. Негативне фарбування. Основний і додатковий (контрастуючий) барвник. Диференціююча речовина. Протрава. Фарбування за Грамом.

Обладнання: Структурно-логічні схеми, таблиці, відеоматеріали, результати лабораторних, ситуаційні задачі. Пробірки з посівами досліджуваних мікроорганізмів, стерильна вода в пробірках, папір з генціановим фіолетовим, розчин Люголю, 96% етиловий спирт, водний фуксин, метиленовий синій, 0,5% HCl, 5% H₂SO₄, карболовий фуксин Циля, фільтрувальний папір, предметні скельця, штативи, спиртівки, бактеріологічні петлі, імерсійне масло, мікроскопи, демонстраційні препарати.

План:

1. Організаційні заходи (привітання, перевірка присутніх, повідомлення теми, мети заняття, мотивація здобувачів вищої освіти щодо вивчення теми):

Мікробіологія, особливо медична, розвивається дуже бурхливо, акумулюючи найсучасніші методи та підходи. Вона має не тільки важливе теоретичне, але й величезне практичне значення: використовується для санітарної оцінки довкілля, екологічного благополуччя, діагностики і лікування інфекційних захворювань, а також як один із принципів моментів доказової медицини.

Останніми роками ми стаємо свідками появи все нових збудників інфекційних захворювань. До того ж, все більшої актуальності набувають інфекції, пов'язані із наданням

медичної допомоги (ІПМД). Важливою проблемою є поширення антибіотикорезистентних штамів мікробів.

Окремого значення набувають досягнення сучасної синтетичної біології, біотехнології, генно-інженерні дослідження, широке використання генетично змінених мікроорганізмів як продуцентів потрібних людині матеріалів, а також векторів для адресної доставки терапевтичних препаратів в організм людини.

Революційно розвивається імунологія – наука про стійкість організму до інфекційних та інших чужорідних агентів. Сфера вивчення мікробіологічних та імунологічних процесів перейшла на молекулярно-біохімічний рівні.

Тема даного заняття є необхідним елементом у засвоєнні мікробіологічної техніки, оскільки без знань та навичок приготування мазків, їх фарбування, мікроскопії, без виявлення морфологічних і тинкторіальних властивостей бактерій, неможливе подальше вивчення мікробіології.

Тема знайомить студентів із різноманіттям мікроорганізмів, дозволяє наочно пересвідчитись у матеріальності живих істот, які неможливо побачити неозброєним оком, розширити уявлення про біологічну форму руху матерії. Тема дає студентам можливість зрозуміти причинну зумовленість явищ у мікробіології, зв'язок структури й функції, детермінованість властивостей мікроорганізмів. Студенти набувають також навичок та вмінь роботи з бактеріальними культурами.

Тема формує у майбутніх лікарів клінічне мислення. При вивченні загальної та спеціальної мікробіології студенти практично на кожному занятті користуються мікроскопічним методом, який їм доведеться застосовувати у своїй майбутній діяльності для діагностики захворювань. Вивчення основних форм бактерій є необхідним для використання мікроскопічного методу в діагностичних дослідженнях. Поняття про основних представників світу мікроорганізмів є необхідним студентам для формування загального уявлення про світ мікробів, про місце тих бактерій, що вивчаються, у біогеоценозі.

2. Контроль опорного рівня знань (письмова робота, письмове тестування, фронтальне опитування тощо) (у разі необхідності).

Вимоги до теоретичної готовності студентів до виконання практичних занять:

– вимоги до знань:

1. Знати зміст і значення курсу медичної мікробіології, вірусології й імунології в системі навчання лікаря.
2. Описати організацію мікробіологічної лабораторії, техніку безпеки і правила роботи в ній.
3. Перерахувати, класифікувати та описати види мікроскопії. Пояснити принцип дії різних видів мікроскопів.
4. Описати будову мікроскопа МБД-1
5. Описати принцип та техніку мікроскопії з імерсійною системою, приготування мазка, фарбування його простими методами.
6. Дати визначення поняття бактеріальна культура.
7. Знати правила санітарно-гігієнічного і протиепідемічного режиму і техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії.
8. Знати правила асептики при роботі з мікроорганізмами.
9. Описати техніку приготувати мазка з культури мікроорганізмів, вирощених на щільному поживному середовищі.
10. Навести приклади простих і складних методів фарбування препаратів, знати

принципову відмінність між простими і складними методами фарбування.

11. Описати способи знезараження відпрацьованого інфікованого матеріалу.

12. Знати техніку мікроскопування препаратів-мазків за допомогою світлового мікроскопу з імерсійним об'єктивом.

– перелік дидактичних одиниць:

1. Предмет і задачі медичної мікробіології, її роль в підготовці лікаря.

2. Організація мікробіологічної лабораторії.

3. Світлова мікроскопія. Пристрій МБД-1.

4. Техніка роботи з імерсійним об'єктивом.

5. Поняття про бактеріальну культуру.

6. Техніка приготування мазка з культури мікроорганізмів, вирощених на щільному поживному середовищі.

7. Принципи класифікації мікроорганізмів.

8. Поняття про вид мікроорганізмів.

9. Основні форми бактерій.

10. Прості і складні методи фарбування.

11. Фарбування за Грамом.

12. Ставлення бактерій до фарбування за Грамом.

13. Техніка приготування мазка з культури бактерій, вирощених на щільному поживному середовищі.

– питання (тестові завдання, задачі, клінічні ситуації) для перевірки базових знань за темою заняття.

Теоретичні питання:

1. Визначення мікробіології як науки. Медична мікробіологія - предмет і задачі. Розділи медичної мікробіології. Принципові риси сучасної медичної мікробіології та тенденції її розвитку.
2. Принципи організації мікробіологічної служби, заклади мікробіологічного профілю.
3. Мікроби як основний об'єкт вивчення мікробіології. Доклітинні і клітинні форми мікробів (пріони, віроїди, віруси, бактерії, гриби, найпростіші).
4. Поняття про прокаріотів та еукаріотів. Патогенні представники.
5. Мікробіологічна лабораторія - задачі, основні приміщення, документація. Режим роботи в бактеріологічній лабораторії.
6. Методи мікробіологічного дослідження: мікроскопія, фарбування, культивування, виділення чистих культур, імунологічні методи, моделювання на тваринах, вірусологічні методи, біотехнологічні та генно-інженерні.
7. Мікроскопічний метод вивчення мікроорганізмів. Техніка мікроскопії.
8. Види мікроскопії (перерахувати). Імерсійна система: методи створення, види, принцип і призначення.
9. Основні частини світлового мікроскопа (перерахувати). Схематично зобразити хід променів у світловому мікроскопі.
10. Роздільна здатність мікроскопа - визначення, вказати граничні значення роздільної здатності для світлового і електронного мікроскопа.

11. Чому у світловий мікроскоп неможливо побачити об'єкт, менший за 0.2 мкм?
12. Що входить до складу механічної системи світлового мікроскопа?
13. Що входить до складу оптичної системи світлового мікроскопа?
14. Темнопольна мікроскопія. Принцип методу, види темнопольних конденсорів, схематичний хід променів в них. Призначення, переваги і недоліки методу.
15. Техніка приготування мазка з культури мікроорганізмів, вирощених на щільному поживному середовищі.
16. Фазово - контрастна мікроскопія. Принцип методу, призначення, переваги і недоліки.
17. Методи мікроскопічного дослідження живих мікроорганізмів (перерахувати).
18. Значення робіт Л. Пастера для мікробіології. Перерахувати основні наукові досягнення.
19. Види об'єктивів мікроскопа. Основні характеристики об'єктивів. Поняття про сферичну і хроматичну аберацию і усунення їх.
20. Техніка приготування мазка з культури мікроорганізмів, вирощених на рідкому поживному середовищі.
21. Люмінесцентна мікроскопія. Принцип, призначення, переваги і недоліки методу. Що собою являє первинна і вторинна люмінесценція?
22. Техніка роботи із світловим мікроскопом.
23. Електронна мікроскопія. Принцип методу, переваги і недоліки. Види (перерахувати).
24. Фіксація мазків - призначення, способи (перерахувати).
25. Роль конденсора в світловій мікроскопії. Призначення і правила користування дзеркалами мікроскопа.
26. Види і призначення мікробіологічних лабораторій. Місця створення.
27. Методи діагностики інфекційних захворювань, що застосовуються в мікробіологічній лабораторії. Перерахувати і стисло охарактеризувати.
28. Види фарбників, що застосовуються в мікробіології. Перерахувати.
29. Основні етапи розвитку мікробіології (перерахувати).
30. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії.
31. Техніка приготування мазка крові та мазка із густого гною.
32. Значення робіт І. І. Мечникова для біології і медицини.
33. Методи вивчення мікроорганізмів в живому стані. Техніка приготування препарату «висяча» і «роздавлена» крапля.
34. Техніка приготування мазка з мокроти, рідкого гною, мазка-відбитка з органів.
35. Основні частини світлового мікроскопа (перерахувати). Схематично зобразити хід променів у світловому мікроскопі.
36. Відношення протопластів, сферопластів, L- форм бактерій до фарбування за Грамом. Причини.
37. Значення генціанвіолету і фуксину у фарбуванні за Грамом.
38. Значення спирту етилового при фарбуванні за Грамом.
39. Значення розчину Люголя при фарбуванні за методом Грама.
40. Можливі невдачі і помилки при фарбуванні за методом Грама, шляхи їх запобігання і контролю.
41. Техніка фарбування за Грамом-Синьовим.

42. Механізм фарбування за методом Грама з точки зору будови та складу бактерій.
43. Відношення різних форм мікроорганізмів до фарбування за Грамом.
44. Метод Грама відноситься до простих чи складних методів забарвлення? Чому?
45. Які барвники використовують для методики фарбування за Грамом?
46. Якого кольору набувають грампозитивні бактерії?
47. На якому етапі відбувається диференціація бактерій на грампозитивні та грамнегативні бактерії.?

Тестові завдання: * - вірна відповідь

1. Для фарбування мазка з мокроти хворого з підозрою на крупозну пневмонію були застосовані наступні барвники і реактиви : розчин генціанвіолета, розчин Люголя, 96% спирт, водний фуксин. Який спосіб фарбування застосований в даному випадку?
А – за Грамом *
В – за Нейссером
С – за Романовським
D – за Цилем-Нільсеном
Е – за Леффлером
2. Які препарати вивчають в темнопольному мікроскопі?
А – нативні*
В – зафарбовані
С – фіксовані
D – оброблені флюорохромом
Е – висушені
3. При роботі з люмінесцентним мікроскопом необхідно використовувати певне джерело світла. Яке саме?
А – сонячне
В – електричне
С – ультрафіолетове*
D – денне
Е – інфрачервоне
4. В основу вивчення морфології мікроорганізмів покладено мікроскопічний метод. Який з видів мікроскопії не відноситься до світлової?
А – імерсійна
В – фазово-контрастна
С – темнопольна
D – аноптральна
Е – електронна*
5. Біологічний мікроскоп складається з двох основних систем: оптичної та механічної. Назвіть, що не відноситься до оптичної системи?
А – дзеркало
В – предметний столик*
С – конденсор
D – діафрагма

Е – окуляр

6. Електронна мікроскопія в сучасній мікробіології використовується для:

- А – виявлення хімічного складу збудника
- В – вивчення ультраструктури збудника*
- С – встановлення виду збудника
- Д – встановлення таксономічного положення збудника
- Е – виявлення біохімічних властивостей збудника

7. При перевірці світлового мікроскопа важливим є встановлення справності його механічної частини. Які саме деталі не входять до цієї системи?

- А – штатив
- В – тубус
- С – предметний столик
- Д – окуляр*
- Е – гвинтовий механізм

8. З метою мікроскопічного підтвердження діагнозу "первинний сифіліс" у хворого здійснено забір виділень з виразки. Який вид мікроскопії використовується для виявлення та вивчення рухомості збудника?

- А – темнопольна*
- В – твітлова
- С – люмінесцентна
- Д – електронна
- Е – аноптральна

9. До бактеріологічної лабораторії доставлено блювотні маси хворого з підозрою на холеру. З матеріалу приготований препарат "висяча крапля". Який метод мікроскопії буде використаний для виявлення збудника по його рухливості?

- А – фазово-контрастна *
- В – імерсійна
- С – електронна
- Д – імунна електронна
- Е – люмінесцентна

10. При складних методах фарбування виявляють особливості хімічного складу бактеріальної клітини або наявність певних структур. Який з перерахованих методів фарбування є основним та найчастіше вживаним?

- А – Грама*
- В – Романовського-Гімзи
- С – Циля-Нільсена
- Д – Ожешко
- Е – Леффлера

11. На практичному занятті з мікробіології студентам запропоновано пофарбувати суміш бактерій за методикою Грама та пояснити механізм фарбування. Які морфологічні структури бактерій зумовлюють грамнегативне та грампозитивне фарбування бактерій?

- A – клітинна стінка*
- B – ЦПМ
- C – капсула
- D – джгутики
- E – цитоплазма

12. В лабораторній діагностиці холери основним методом є бактеріологічний. При ідентифікації збудника враховують його морфологічні особливості. Збудник має форму зігнутої палички та один полярно розташований джгутик. До якої групи бактерій відноситься збудник холери за кількістю і локалізацією джгутиків?

- A – монотрих*
- B – лототрих
- C – перитрих
- D – амфітрих

13. При мікроскопічному дослідженні мазка із зіву у хворого на фарингіт виявлені бактерії сферичної форми, що розташувались у вигляді скупчень, які нагадують гроно винограду. До якої морфологічної групи можна віднести даного збудника?

- A – диплококи
- B – стрептококи
- C – стафілококи*
- D – монококи
- E – сарцини

14. До лікаря-уролога звернувся чоловік зі скаргами на печіння в уретрі та гнійні виділення при сечовипусканні. При мікроскопічному дослідженні мазка з виділень були виявлені бактерії бобовидної форми, розташовані попарно, ввігнутими площинами клітини обернуті одна до одної. Хворому поставлено діагноз гостра гонорея. До якої морфологічної групи належить збудник?

- A – мікрококи
- B – диплококи*
- C – стрептококи
- D – тетракоки
- E – сарцини

15. При мікроскопічному дослідженні вмісту лакун мигдаликів у хворої на лакунарну ангіну було виявлено бактерії сферичної форми, розташовані ланцюжком. До якої морфологічної групи вони належать?

- A – диплококи
- B – сарцини
- C – тетракоки

D – стрептококи*

E – стафілококи

16. В зафарбованих препаратах студенти виявили стрептококи. Чим можна пояснити розташування клітин цієї морфологічної групи?

A – поділом в одній площині*

B – поділом в двох площинах

C – поділом в трьох площинах

D – поділом в чотирьох площинах

E – поділом в багатьох площинах

17. Студент отримав завдання пофарбувати мазок за Грамом. На якому етапі фарбування передбачена диференціація бактерій на Гр+ та Гр-?

A – нанесення генціанвіолету

B – нанесення розчину Люголя

C – нанесення 96% спирту*

D – нанесення води

E – нанесення розчину фуксину

18. На занятті по мікробіології студенти ознайомились з мікроскопічним методом діагностики. Які властивості бактерій вивчають цим методом?

A – морфологічні, тинкторіальні *

B – культуральні

C – антигенні

D – токсигенні

E – Біохімічні

19. При мікроскопії мазка з виділень з рани, були виявлені грампозитивні, шаровидні клітини, які розташовуються у вигляді "грон винограду". До якого виду можуть бути віднесені виявлені мікроорганізми?

A – стафілококи*

B – клостридії

C – стрептококи

D – мікоплазми

E – гонококи

3. Формування професійних вмінь, навичок (оволодіння навичками, проведення курації, визначення схеми лікування, проведення лабораторного дослідження тощо):

Зміст завдань:

1. Налаштування освітлення мікроскопа та розрахунок його корисного збільшення та роздільної здатності.
2. Вибір барвників та світлофільтрів для спеціальних мікроскопічних методів.
3. Виготовлення та аналіз різних типів препаратів для мікроскопічного вивчення.
4. Фарбування мазка простими методами.
5. Приготування мазка з культури стафілокока на скошеному м'ясо-пептонному агарі, фарбування метиленовою синькою, вивчення під мікроскопом, замальовування.
6. Отримання якісного зображення об'єктів, що досліджуються.
7. Мікроскопування з імерсійною системою.
8. Приготування мазка із змішаної культури бактерій, фарбування за Грамом, мікроскопування, замальовування.
9. Дослідження морфології клітин у демонстраційних препаратах.

Рекомендації (інструкції) щодо виконання завдань:

Предметом вивчення медичної мікробіології є патогенні (хвороботворні, здатні спричинювати захворювання) для людини мікроорганізми, а також умовно-патогенні мікроорганізми, здатні спричинювати захворювання людини лише за певних умов, при зниженні захисних сил макроорганізму. Медична мікробіологія вивчає також непатогенні мікроорганізми — нормальну мікрофлору організму, що відіграє важливу роль в життєдіяльності макроорганізму. Ці мікроорганізми часто зустрічаються в досліджуваних матеріалах при діагностиці захворювань, вони значною мірою подібні до патогенних мікроорганізмів, тому необхідно диференціювати ці мікроорганізми від патогенних мікроорганізмів-збудників. Медична мікробіологія вивчає біологічні властивості мікроорганізмів, їх систематику, екологію, взаємовідносини з іншими організмами, в першу чергу — патогенез (механізм розвитку) захворювань, що спричиняються мікроорганізмами. Медична мікробіологія розробляє методи мікробіологічної діагностики, специфічної профілактики та етіотропної терапії (тобто спрямованої на причину захворювання, мікроорганізм-збудник).

Власне, медична мікробіологія — це пропедевтика інфекційних захворювань та епідеміології. На кафедрі мікробіології, вірусології та імунології можна одержати повні дані з етіології та початкові — з питань патогенезу, клініки, діагностики, лікування і профілактики інфекційних захворювань. Під терміном «інфекційні хвороби» розуміють захворювання, спричинені мікроорганізмами, для яких характерна заразливість, здатність передаватись від хворих або носіїв до здорових людей. Інфекційних хворих відокремлюють від хворих на інші захворювання, їх лікують у спеціальних інфекційних лікарнях.

Медична мікробіологія вивчає ще й етіологію хвороб, у патогенезі яких беруть участь мікроорганізми, але які не належать до інфекційних хвороб, а діагностику і лікування яких проводять у терапевтичних, хірургічних, гінекологічних, офтальмологічних, дермато-венерологічних та інших клініках.

Медична мікробіологія — самостійна медична наука, а лікар-мікробіолог — самостійна лікарська професія. Основне завдання лікаря-мікробіолога — визначення мікробіологічного діагнозу, а його практична робота пов'язана з лабораторною діагностикою. Кожен лікар має знати можливості та обмеження мікробіологічної діагностики, вміти взяти досліджуваний матеріал для мікробіологічного аналізу, прочитати результати досліджень і використати їх у діагностиці, виборі лікування і контролі за ним. Тільки злагоджена спільна робота лікаря-клініциста і лікаря-мікробіолога дає можливість ефективної діагностики і лікування багатьох, у тому числі й неінфекційних захворювань.

Організація мікробіологічної лабораторії

Бактеріологічна лабораторія - це комплекс приміщень, обладнання і приладів, що дозволяють використовувати різноманітні методи дослідження мікроорганізмів. Лабораторія включає кімнати для мікробіологічних досліджень та підсобні приміщення: а) кімнати для мікробіологічних досліджень (робочі кімнати) - світлі, просторі, стіни покриті кахельною плиткою, підлога - лінолеумом або плиткою; лабораторні столи добре освітлені і обладнані газовою горілкою або спиртівкою, а також штативом для пробірок і інших приналежностей, необхідних для проведення конкретної роботи. б) підсобні приміщення – автоклава (стерилізаційна), мийна, кімната для готування поживних середовищ, матеріальна (для зберігання реактивів, посуду, апаратури та інвентарю), віварій для піддослідних тварин.

Інструктаж з техніки безпеки:

1. У навчальній лабораторії необхідно бути в білому халаті та шапочці;
2. Перед початком заняття виділяються два чергові, що приносять з лабораторії навчального процесу кафедри оснащення заняття (таблиці, культури і т. д.);
3. У навчальній лабораторії не можна приймати їжу, під час виконання самостійної роботи на столі не повинно бути сторонніх предметів;
4. Після виконання роботи кожен студент прибирає своє робоче місце й відносить усе обладнання до лабораторії навчального процесу кафедри;
5. Після виконання роботи потрібно вимити руки милом і обробити дезінфікуючим розчином для рук;
6. У навчальному залі кафедри упродовж заняття і після його закінчення повинні підтримуватися порядок і чистота;
7. При випадковому потрапленні інфікованого матеріалу на стіл, підлогу та інші поверхні це місце необхідно ретельно обробити дезінфікуючим розчином.

Методи мікробіологічної діагностики

Для мікробіологічної діагностики бактеріальних інфекцій використовують різноманітні методи:

бактеріоскопічні, засновані на вивченні морфологічних ознак збудника; вони спрямовані на виявлення мікроорганізмів у нативних або забарвлених препаратах;

бактеріологічні, засновані на вивченні культуральних та інших фізіологічних властивостей збудника; вони передбачають культивування, виділення чистих культур, ідентифікацію та типування збудників;

біологічні, засновані на вивченні особливостей взаємодії мікроба з організмом експериментальних тварин у модельних дослідах;

серологічні, засновані на вивченні антигенних властивостей збудника та реакцій макроорганізму на ці антигени (серологічна та алергологічна діагностика інфекційного захворювання; антигенна ідентифікація мікроорганізмів або їх компонентів);

молекулярно-генетичні - виявлення фрагментів геному збудника в біологічному матеріалі за допомогою молекулярної гібридизації ДНК або РНК, а також ПЛР.

Бактеріоскопічне дослідження

Методи мікроскопічного дослідження

Метод бактеріоскопічного дослідження набуває особливого значення, якщо мікроб має морфологічні та тинкторіальні особливості або особливу локалізацію в тканинах, клітинах організму. Тільки при деяких інфекціях для встановлення діагнозу достатньо морфологічного дослідження. Для діагностики більшості інфекцій мікроскопія, як перший етап мікробіологічного дослідження, має лише допоміжне, орієнтовне значення.

У мікробіологічних лабораторіях застосовуються не тільки звичайні методи оптичної мікроскопії в прохідному світлі, але й спеціальні: у темному полі зору, фазово-контрастний, люмінесцентний та електронний.

Будова світлового мікроскопа

Мікроскоп складається з двох основних частин: а) до механічної частини входять штатив, тубусотримач, тубус, предметний столик, револьвер, макро- і мікрометричні гвинти; б) до оптичної системи входять об'єктиви й окуляри, конденсор, дзеркало.

Основні формули мікроскопії

Збільшення. Загальне збільшення мікроскопа. Корисне збільшення мікроскопа. Збільшення об'єктиву. Збільшення окуляра. Числова апертура об'єктива. Вплив числової апертури на якість зображення. Роздільна здатність. Межа роздільної здатності оптичних приладів.

Світлова мікроскопія

Світловий мікроскоп має сухий та імерсійний об'єктиви. Сухий об'єктив із відносно великою фокусною відстанню та слабким збільшенням зазвичай застосовують для вивчення достатньо великих біологічних та гістологічних об'єктів. При вивченні мікроорганізмів використовують головним чином імерсійний («занурювальний») об'єктив з невеликою фокусною відстанню і більш високою роздільною здатністю (збільшення 60x-100x). При імерсійній мікроскопії об'єктив занурюють у масло (кедрове, персикове, «імерсіол» та ін.), показник заломлення якого близький до показника заломлення скла. У цьому випадку промені світла, пройшовши через предметне скло, не змінюють свого напрямку і не розсіюються, а потрапляють до об'єктиву. Роздільна здатність імерсійного об'єктива близько 0,2 мкм. Максимальне збільшення сучасних оптичних мікроскопів досягає 2000x- 3000x.

Спеціальні методи світлової мікроскопії

Метод темного поля. Фазово-контрастна мікроскопія. Флуоресцентна мікроскопія. Інтерференційна мікроскопія. Поляризаційна мікроскопія. Конфокальна мікроскопія.

Типи препаратів для світлової мікроскопії.

Нативні препарати: висяча крапля, крапля роздавлена, товста крапля, відбиток, агаризована плівка.

Фіксовані препарати: тонкий мазок, відбиток мазок, фіксований мазок.

Прості методи фарбування

Прості методи фарбування дозволяють визначити наявність бактерій у препараті, їх форму, розміри та взаєморозташування клітин. Для фарбування цими методами використовують, як правило, один барвник.

Поняття про бактеріальну культуру

Бактерії - домен прокаріотичних мікроорганізмів. Бактерії (еубактерії, справжні, або істинні, бактерії) - мікроорганізми з прокаріотичним типом будови клітини.

Культура бактерій - сукупність бактерій, що розмножилися на поживному середовищі в лабораторних умовах.

Чиста культура - культура мікроорганізмів одного виду.

Техніка приготування мазка з культури мікроорганізмів, вирощених на щільному поживному середовищі

Етапи приготування мазка з культури бактерій:

1. Приготування мазка: на чистому знежиреному в полум'ї пальника предметному склі окреслюють склографом місце розташування мазка, перевертають скло і кладуть на рейки лотка. На предметне скло бактеріологічною петлею наносять краплю води чи ізотонічного розчину хлориду натрію. Досліджуваний матеріал беруть із пробірки бактеріологічною петлею. Пробірку з бактеріальною культурою беруть у ліву руку, петлю за петлеутримувач - у праву. Петлю пропалюють у полум'ї пальника до почервоніння. Обертальним рухом виймають із пробірки ватяну пробку, притискаючи її 4-м і 5-м пальцями правої руки до долоні, і обпалюють край пробірки, обережно вводять петлю в пробірку, охолоджуючи дотиком до внутрішньої поверхні скла, після чого легким ковзним рухом беруть матеріал, виймають петлю з пробірки, знову обпалюють її край і закривають пробкою. Вносять досліджуваний матеріал у краплю води і розподіляють його таким чином, щоб одержати тонкий і рівномірний мазок. Після приготування препарату петлю пропалюють (стерилізують) у полум'ї.
2. Висушування мазка: висушують мазок у струмені теплого повітря над полум'ям пальника, не даючи краплі закипати.
3. Фіксація мазка: предметне скло (мазком нагору) проводять 3 рази через полум'я пальника. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюючись до поверхні скла.
4. Фарбування мазка метиленовим синім: наносять метиленовий синій на 3 - 5 хвилин, потім промивають мазок водою, висушують і мікроскопують з імерсійним об'єктивом.
5. Висушування мазка: мазок кладуть між листами фільтрувального паперу і обережно (не зрушуючи) проводять пальцями руки по поверхні. Змінюють положення мазка між листами фільтрувального паперу і знову проглажують. Виймають мазок великим і вказівним пальцями руки і досушують, здійснюючи мазком рухи у повітрі вверх-вниз.
6. Мікроскопія: мікроскопують з імерсійною системою.

7. Оформлення малюнків мікроорганізмів: під малюнком необхідно написати назву мікроорганізму латинською мовою, метод фарбування та збільшення мікроскопа.

Систематика описує види організмів, з'ясовує ступінь спорідненості між ними та поєднує їх у класифікаційні одиниці (таксони). Останнє входить у завдання складової частини систематики — класифікації.

Таксономія - наука про принципи та методи класифікації організмів.

Центральне поняття в систематиці та номенклатурі організмів - вид (*species*), хоч досі немає визначення виду, яке б приймалося всіма беззастережно. У мікробіології поняття виду дещо відрізняється від вже відомого вам з курсу загальної мікробіології.

Вид - еволюційно сформована сукупність популяцій з подібним генотипом, який за стандартних умов проявляється подібними морфологічними, фізіологічними, біологічними та іншими ознаками.

Генотип виду забезпечує лише відносну стабільність ознак, тому в самому вигляді розрізняють ще й варіанти мікроорганізмів: морфологічні (морфовари), біологічні (біовари), біохімічні (хемовари або ферментовари), антигенні (серовари) та інші. Наприклад, варіанти, резистентні до антибіотиків, тепер називають резистенсварами.

Види, споріднені генетично, об'єднуються у рід, роди – у сімейства, сімейства – у порядок. Далі йдуть класи, відділи, підцарства та царства.

Прості методи фарбування дозволяють визначити наявність бактерій у препараті, їх форму, розміри та взаєморозташування клітин. Для фарбування цими методами використовують, як правило, один барвник, що дозволяє відрізнити частинки від фарбованого фону. Фіксований препарат поміщають мазком вгору на підставку. На всю поверхню мазка піпеткою наносять розчин фарбника. Фуксином Пфейффера забарвлюють 1—2 хв, лужним розчином метиленового синього Леффлера або водно-спиртовим розчином метиленового синього — 3 — 5 хв. Після фарбування барвник зливають, препарат промивають водою, висушують між листками фільтрувального паперу і мікроскопують з використанням імерсійного об'єктива.

Бактерії поділяють за формою на кулясті бактерії (коки, диплококи, тетради, сарцини, стрептококи, стафілококи), звивисті (вібріони, спірили, спірохети) та паличкоподібні. Останні об'єднують бактерії, що не утворюють ендоспори (власне бактерії), та спороутворюючі бактерії (бацили).

Складні методи фарбування припускають використання кількох барвників і дозволяють диференціювати одні мікроби від інших, і навіть вивчати особливості будови мікробних клітин. До них відносять фарбування за Грамом, Цилем — Нільсеном, Нейссером, Романовським — Гімзе та ін.

Диференціюючий метод забарвлення, запропонований Хансом Християном Йоахімом Грамом в 1884 р., не втратив практичного значення до теперішнього часу.

Забарвлення методом Грама

При фарбуванні цим методом всі бактерії поділяються на грампозитивні та грамнегативні, що полегшує проведення диференціальної діагностики інфекційних захворювань та вибір засобів антимікробної терапії. Грампозитивні бактерії та дріжджі після фарбування кристалвіолетом і зв'язування з йодом не знебарвлюються в органічних розчинниках, залишаючись синьо-фіолетового кольору; грамнегативні - знебарвлюються (можливо, за рахунок високого вмісту ліпідів та відсутності тейхоевих кислот у клітинній стінці), стаючи червоними після дофарбування сафраніном або фуксином.

Техніка фарбування за Грамом-Синьовим:

1. На фіксований мазок покласти папірець Синьова (фільтрувальний папір, просочений розчином генціанвіолету і висушений), налити 2-3 краплі води, фарбувати 2 хв.
2. Петлею видалити папірець Синьова в лоток, злити надлишок фарби і нанести 2-3 краплі розчину Люголя на 1 хв.
3. Злити надлишок фарби, нанести етиловий спирт–ректифікат на 30 сек. для знебарвлення Гр – бактерій. Промити водою.
4. Додатково пофарбувати препарат фуксином Пфейффера протягом 2 хв., промити водою і висушити.

Фарбування за Грамом дозволяє диференціювати збудників інфекційних захворювань. Так, наприклад, відомо, що всі хвороботворні коки, крім гонокока і менінгокока, є грампозитивними; вібріони, трепонеми, кампілобактери, хелікобактери та ентеробактерії – грамнегативними, всі патогенні бацили та клостридії – грампозитивними.

Вимоги до результатів роботи, в т.ч. до оформлення:

Опрацювання результатів

- Результати спостережень необхідно занести до протоколу лабораторної роботи.
- Малюнки занести до протоколу, чітко відтворюючи кольори.
- Підписати малюнок: назву виду мікроорганізму на латині, вказати збільшення, метод фарбування, морфологічну форму, тип розташування у мазку.

Матеріали контролю для заключного етапу заняття: задачі, завдання, тести тощо (у разі необхідності):

1. Вивчити пристрій МБР-1 і освоїти техніку роботи з імерсійним об'єктивом.
2. Налаштувати освітлення мікроскопа та розрахувати його корисне збільшення та роздільну здатність.
3. Виготовити та проаналізувати різні типи препаратів для мікроскопічного вивчення.
4. Фарбувати мазки простими методами.
5. Приготувати мазки з культури стафілокока на скошеному м'ясо-пептонному агарі, фарбувати метиленою синькою, вивчити під мікроскопом, замалювати.
6. Отримати якісне зображення об'єктів, що досліджуються.
7. Мікроскопіювати з імерсійною системою.
8. Приготувати мазок із культури бактерій, вирощених на щільному поживному середовищі, фарбувати простими методами, мікроскопувати з імерсійною системою, оцінити форму бактерій, розташування у мазку.
9. Приготувати мазок із змішаної культури бактерій, пофарбувати за Грамом, мікроскопувати, оцінити тинкторіальні властивості бактерій, зробити висновки, замалювати.
10. Розглянути препарати різних форм бактерій. Класифікувати бактерії за формою та розташуванням у мазку.

4. Підведення підсумків:

Поточний контроль: усне опитування, тестування, оцінювання виконання практичних навичок, розв'язання ситуаційних завдань, вміння аналізувати і інтерпретувати результати досліджень і правильно зробити обґрунтовані висновки, оцінювання активності на занятті.

Оцінювання поточної навчальної діяльності на практичному занятті:

1. Оцінювання теоретичних знань з теми заняття:

- методи: індивідуальне опитування, виконання тестових завдань, перевірка ведення протоколу досліджень;
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

2. Оцінка практичних навичок з теми заняття:

- методи: оцінювання правильності виконання практичних робіт (досліджень)
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

Оцінка за одне практичне заняття є середньоарифметичною за всіма складовими і може мати лише цілу величину (5, 4, 3, 2), яка округлюється за методом статистики.

Критерії поточного оцінювання на практичному занятті

Оцінка	Критерії оцінювання
«5»	Здобувач бере активну участь у практичному занятті, демонструє глибокі знання, дає повні та детальні відповіді на запитання. Бере активну участь у обговоренні проблемних ситуацій, демонструє гарні навички та вміння при виконанні практичного завдання, правильно оцінює отримані результати. Тестові завдання виконані в повному обсязі.
«4»	Здобувач бере участь у практичному занятті; добре володіє матеріалом. Демонструє необхідні знання, але дає відповіді на запитання з деякими помилками; бере участь у обговоренні проблемних ситуацій. Тестові завдання виконані в повному обсязі, не менш ніж 70% відповідей на запитання є правильними.
«3»	Здобувач іноді бере участь в практичному занятті; частково виступає і задає питання; допускає помилки під час відповідей на запитання; показує пасивну роботу на практичних заняттях. Демонструє навички та вміння при виконанні практичного завдання, однак оцінює отримані результати недостатньо повно і точно. Тестування виконано в повному обсязі, не менш ніж 50% відповідей є правильними, відповіді на відкриті питання - не логічні, з явними суттєвими помилками у визначеннях.
«2»	Здобувач не бере участь у практичному занятті, є лише спостерігачем; ніколи не виступає і не задає питання, незацікавлений у вивченні матеріалу; дає неправильні відповіді на запитання, демонструє недостатні навички та вміння, не може впоратися з практичною роботою і оцінкою отриманих результатів.. Тестування не виконано.

3. Список рекомендованої літератури:

Основна:

1. Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман & Шив Піллай. Основи імунології: функції та розлади імунної системи: 6-е видання. Київ: Медицина, 2020, 328 с.
2. Майкл Р Барер, Вілл Ірвінг, Ендрю Свонн & Нелюн Перера. Медична мікробіологія, Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль: 19-е видання: у двох томах. Київ: Медицина, 2021, 434 с.
3. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» - 3-тє видання., оновлено та доповнено // Широбоков В.П за ред. – Вінниця: «Нова книга», 2021. 920 с.

Додаткова:

1. Review of Medical Microbiology and Immunology, 12 edition/ Warren E. Levinson. McGraw-Hill Prof Med.-Tech., 2012. 688 p.
2. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition, 2012, English. 880 p.
3. Anantharyan R. Jayaram Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 12-th Edition.- Orient Longman, 2022.
4. Burrell, C. J., Howard, C. R. & Murphy, F. A. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition (Elsevier Inc., 2016).
5. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-01081-7.
6. Louten, J. & Reynolds, N. Essential Human Virology. (2016).
7. Rich, R. R. & Fleisher, T. A. Clinical Immunology (Fifth Edition) Principles and Practice. Clinical Immunology (2018).
8. Abbas, A., Litchman, A. H. & Pillai, S. Basic Immunology - 6th Edition. (Elsevier Ltd, 2019).
9. Male, D., Peebles, S. & Male, V. Immunology. (2020).
10. Ream, Walt. Molecular microbiology laboratory : a writing-intensive course. (Academic Press, 2013).
11. Nath, S. K. & Revankar, S. G. Problem-based microbiology. (Saunders, 2006).
12. Sandle, T. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-00532-1.
13. Marsh D, P., Lewis A O, M., Rogers, H., Williams W, D. & Wilson, M. Marsh and Martin's Oral Microbiology. (Elsevier Limited, 2016).
14. Wilson, J. (Nurse) & Stucke, V. A. Clinical microbiology : an introduction for healthcare professionals. (Baillière Tindall, 2000).
15. Barer, M. & Irving, W. L. Medical Microbiology 19th Edition A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control. vol. 19 (2018).

Електронні інформаційні ресурси

1. <http://moz.gov.ua> – Міністерство охорони здоров'я України
2. <http://www.microbiologybook.org> - Microbiology and immunology on-line
3. <http://www.microbiologyinfo.com> - On-line microbiology note
4. www.cdc.gov - Centers for diseases control and prevention
5. www.ama-assn.org – Американська медична асоціація / American Medical Association

6. www.who.int – Всесвітня організація охорони здоров'я
7. www.dec.gov.ua/mtd/home/ - Державний експертний центр МОЗ України

Практичне заняття

Тема: Структура бактеріальної клітини. Морфологія та структура бактерій, грибів та найпростіших. Фізіологія бактерій. Поживні середовища. Методи стерилізації. Дезінфекція.

Мета: Вивчити структуру бактеріальної клітини, хімічний склад і функціональне значення різних структур прокаріотів та еукаріотів, цитоморфологічні особливості клітини грибів та найпростіших. Ознайомити студентів з основними методами вивчення будови бактеріальної клітини, рухливості, кислотостійкості, споруутворюючих властивостей, капсулоутворення для придбання навичок диференціації мікроорганізмів за морфологічними і тинкторіальними властивостями. Оволодіти методами фарбування за Грамом, Цилям-Нільсеном, Романовським-Гімзою, виявлення включень, спор, капсул, оцінки результатів мікробіологічного дослідження. Ознайомити студентів з потребами певних груп бактерій у поживних речовинах, поживними середовищами, принципами культивування бактерій, апаратурою для культивування бактерій, з метою створення навичок і умінь проведення дезінфекції, культивування мікроорганізмів, що є необхідним для подальшого вивчення курсу мікробіології і подальшої практичної роботи.

Основні поняття: прокаріоти, еукаріоти, грампозитивні бактерії, грамнегативні бактерії, клітинна стінка, пептидоглікан (муреїн), тейхоеві кислоти, зовнішня мембрана, ліпополісахарид, периплазматичний простір, ліпід А, О-антиген, нуклеоїд, бактеріальна хромосома, плазміда, рибосоми 70S, полірибосоми (полісоми), мезосома, мікрокапсула, макрокапсула, слизовий шар, мікроворсинки (фімбрії), F-пілі, джгутиковий апарат бактерій, монотрихи, лофотрихи, амфітрихи, перитрихи, тинкторіальні властивості, кислотостійкість, включення, волютин, метахроматичність, ендоспори, екзоспоріум, кортекс, спороплазма, L-форми, сферопласти, протопласти, талом, міцелій, хітин, ергостероли, гіфальні гриби, дріжджові гриби, дріжджеподібні гриби, диморфізм грибів, псевдоміцелій, анаморфи, телеморфи, ендогенні спори (спорангіоспори), конідії, артроконідії (талоконідії), бластоконідії, хламідоконідії, мікроконідії, макроконідії, зигоміцети, аскоміцети, базидіоміцети, дейтеромицети, мітоспорові гриби, найпростіші, пелікула, джгутики, війки, псевдоподії, блефаробласт, травні вакуолі, скоротливі вакуолі, множинний поділ (шизогонія), спорогонія, цисти, саркодові, джгутиконосці, споровики, війчасті, мікроспоридії, апікальний комплекс, коноїд, мікронеми, роптрії. аутотрофи, гетеротрофи, сапрофіти, паразити, прототрофи, ауксотрофи, фактори росту, елективні середовища, селективні середовища, диференційно-діагностичні середовища, спеціальні середовища, облігатні аероби, мікроаерофіли, капнофіли, факультативні анаероби, облігатні анаероби, аеротолерантні анаероби, періодична культура мікроорганізмів, енергетичний метаболізм (біологічне окислення), окислювальне фосфорилування, дихання, субстратне фосфорилування, бродіння, конструктивний метаболізм, чиста культура, колонія мікроорганізмів, штам, клон, асептика, антисептика, дезінфекція, стерилізація.

Обладнання: Структурно-логічні схеми, таблиці, відеоматеріали, результати лабораторних, ситуаційні задачі. Пробірки з посівами досліджуваних мікроорганізмів, стерильна вода в пробірках, папір з генціановим фіолетовим, розчин Люголю, 96% етиловий спирт, водний фуксин, метиленовий синій, 0,5% HCl, 5% H₂SO₄, карболовий фуксин Циля, фільтрувальний папір, предметні скельця, штативи, спиртівки, бактеріологічні петлі, імерсійне масло, мікроскопи, демонстраційні препарати. Пальники, терези, шпателі для відбору реактивів, скальпелі, стакани з термостійкого скла, мірні циліндри, лійки, вата, марля, фільтрувальний

папір, скляні палички для перемішування, стерильний посуд для розливу середовищ, індикаторний папір для визначення рН, агар-агар, сухий порошок МПА, пептон, дистильована вода, 30% розчин NaOH, 10% розчин HCl, NaCl, агар стерильний в колбах, пробірки зі зкошеним МПА, пробірки з МПБ, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки, олівці та маркери склогографи.

План:

1. Організаційні заходи (привітання, перевірка присутніх, повідомлення теми, мети заняття, мотивація здобувачів вищої освіти щодо вивчення теми):

Знання морфології і структури мікробів є важливим для наукових досліджень, а також при постановці мікробіологічного діагнозу. Для лікаря визначення виду мікроорганізму, його будови і властивостей дозволяє встановити діагноз захворювання і підходи до лікування з найбільшою ефективністю при найменших затратах.

Структура бактеріальних клітин має значення у визначенні ступеня патогенності для організму людини, та можливого симбіозу двох систем (макро- та мікроорганізмів). Структурні особливості визначають біологічні властивості мікроорганізмів, які в свою чергу впливають на макроорганізм. Тема є необхідним навчальним елементом у формуванні знань і умінь студентів при проведенні мікробіологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань. Тема є невіддільною від усіх наступних розділів мікробіології і сприяє формуванню умінь оцінювати результати мікробіологічного дослідження і вирішувати питання призначення відповідного виду досліджень при діагностиці.

Знання структури бактеріальної клітини важливе для лікаря, оскільки особливості перебігу та епідеміології деяких хвороб пов'язані зі структурою збудника. Наприклад, наявність капсули у чумного мікроба та у збудника сибірки сприяє їх швидкому поширенню в організмі; збудник ботулізму завдяки своїй здатності до спороутворення не гине під час кип'ятіння і тому зберігається в харчових продуктах. Крім того, при ідентифікації, тобто при визначенні виду мікроорганізму, обов'язково досліджується його структура – наявність капсул, спор, джгутиків, включень. У деяких випадках ці ознаки набувають великого значення для диференціації подібних за багатьма властивостями, але різних видів бактерій.

Одним з основних ознак живого є обмін речовин з навколишнім середовищем, а також здатність розмножуватися, забезпечуючи збереження видів у потомстві. Тому вивчення процесів харчування і розмноження бактерій дає фактичний матеріал для формування в студентів розуміння єдності організму і середовища його існування. Актуальність теми визначається важливістю культивування мікроорганізмів для їхньої ідентифікації, а також для вирішення народногосподарських проблем – одержання вакцин, біологічно активних препаратів та ін. Асептика, антисептика, стерилізація, дезінфекція – є найважливішими розділами у діяльності як провізора, так і лікаря, оскільки дозволяють попередити інфікування організму пацієнта патогенними мікроорганізмами, а також успішно боротися з ними.

Тема дає фактичний матеріал для переконання в необхідності особистої гігієни і допомагає у формуванні навичок її дотримання, необхідна для подальшого навчання на кафедрах хірургії, інфекційних хвороб, дитячих інфекцій, педіатрії та ін.; формує в майбутніх провізорів клінічне мислення.

2. Контроль опорного рівня знань (письмова робота, письмове тестування, фронтальне опитування тощо) (у разі необхідності).

Вимоги до теоретичної готовності студентів до виконання практичних занять:

– вимоги до знань:

1. Перерахувати та охарактеризувати відмінності у клітинній організації прокариот та еукаріот.
2. Описати структуру бактеріальної клітини.
3. Описати хімічний склад і функціональне значення різних структур прокариотів.
4. Описати будову клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій, метод фарбування за Грамом. Трактувати біологічну роль хімічних речовин, які входять до складу клітинної стінки.
5. Описати хімічний склад та ультраструктуру клітинної стінки кислотостійких бактерій. Трактувати біологічну роль хімічних речовин, які входять до складу клітинної стінки цього типу. Навести приклади патогенних представників з кислотостійким типом клітинної стінки. Описати техніку фарбування за Цилем-Нільсеном, охарактеризувати доцільність і значення кожного етапу фарбування.
6. Описати будову джгутикового апарату бактерій. Перерахувати та описати типи джгутикування бактерій, методи фарбування джгутиків.
7. Описати методи виявлення включень волютину. Дати визначення та пояснити явище метакромазії.
8. Описати будову та біологічну роль бактеріальної спори, а також особливості хімічного складу та біологічні особливості спор в порівнянні з вегетативною клітиною. Перерахувати та охарактеризувати стадії спороутворення у бактерій. Описати техніку фарбування за Ожешко, охарактеризувати доцільність і значення кожного етапу фарбування.
9. Зазначити відмінності між мікрокапсулою, капсулою та слизовим шаром у бактерій. Пояснити біологічні функції капсули. Пояснити значення принципу негативного контрастування фону для виявлення капсул у бактерій. Описати техніку фарбування за Бурі-Гінсом.
10. Описати морфологію, ультраструктуру та класифікацію грибів.
11. Описати морфологію, ультраструктуру та класифікацію найпростіших.
12. Описати хімічний склад бактеріальної клітини: вміст, локалізацію у клітинних структурах та біологічну роль води, білків, нуклеїнових кислот, ліпідів, вуглеводів та мінеральних речовин.
13. Охарактеризувати живлення бактерій. Перерахувати джерела азоту, вуглецю. Перерахувати фактори росту, дати визначення цьому поняттю. Класифікувати мікроорганізми за способом вуглецевого і азотного живлення.
14. Класифікувати ферменти бактерій за механізмом дії, за локалізацією, за субстратом. Описати механізм розщеплення речовин, способи надходження їх у клітину. Пояснити використання особливостей ферментативної активності для диференціації бактерій. Перерахувати та охарактеризувати ферменти патогенності.
15. Описати метаболізм мікроорганізмів: енергетичний та конструктивний. Охарактеризувати особливості обміну речовин бактерій.
16. Охарактеризувати енергетичний метаболізм (біологічне окислення) мікробної клітини (окислювальне фосфорилування, дихання).
17. Описати принцип субстратного фосфорилування: бродіння.

18. Перерахувати групи мікробів за типом біологічного окислення. Назвати відмінності між аеробним та анаеробним типом (основні етапи, ферменти, участь вільного кисню, кінцевий акцептор водню, продукти окиснення).
 19. Описати поживні середовища, вимоги до них. Класифікувати поживні середовища за походженням, консистенцією, складом, призначенням. Назвати склад універсальних поживних середовищ.
 20. Перерахувати та описати методи культивування та виділення чистої культури аеробів та анаеробів.
 21. Методи виділення чистих культур бактерій - аеробів та анаеробів.
 22. Дати визначення поняттям «ріст» і «розмноження» бактерій. Описати механізм клітинного поділу.
 23. Описати поняття про періодичну культуру мікроорганізмів. Перерахувати та охарактеризувати фази росту (розвитку) бактеріальної культури (фази росту популяції мікроорганізмів) в рідкому поживному середовищі (в періодичній культурі). Дати визначення поняттям: культура бактерій, чиста культура, штам.
 24. Знати особливості культивування анаеробних бактерій, середовища, методи та прилади, що використовуються для їх культивування.
 25. Описати умови культивування бактерій. Перерахувати назви груп бактерій, які потребують певних умов культивування (температурних, рН середовища тощо).
 26. Дати визначення поняття про асептику, антисептику, дезінфекцію, стерилізацію.
 27. Класифікувати, перерахувати та описати методи стерилізації та дезінфекції.
 28. Класифікувати антисептичні засоби за хімічним походженням.
- перелік дидактичних одиниць:
1. Ультраструктура бактеріальної клітини. Особливості структури прокариот.
 2. Тинкторіальні властивості бактерій.
 3. Включення бактеріальної клітини.
 4. Кислотостійкі бактерії.
 5. Спори як спосіб збереження виду бактерій.
 6. Капсули бактерій. Значення капсул.
 7. Рухливість бактерій. Джгутики
 8. Прокаріоти, еукаріоти: основні відмінності між ними.
 9. Морфологія та ультраструктура грибів.
 10. Морфологія та ультраструктура найпростіших. Диференціальне фарбування для найпростіших.
 11. Живлення бактерій.
 12. Енергетичний метаболізм (дихання) бактерій.
 13. Розмноження бактерій.
 14. Умови культивування бактерій.
 15. Поживні середовища. Приготування простих поживних середовищ.
 16. Класифікація мікроорганізмів за температурним оптимумом.

17. Культивування анаеробів.

18. Асептика. Антисептика. Дезінфекція. Стерилізація.

– питання (тестові завдання, задачі, клінічні ситуації) для перевірки базових знань за темою заняття.

Теоретичні питання:

1. Відмінності у клітинній організації прокариот та еукариот.
2. Структура бактеріальної клітини: основні структури (органели) бактеріальної клітини. Хімічний склад і функціональне значення різних структур прокариотів.
3. Особливості будови клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій. Біологічна роль хімічних речовин, які входять до складу клітинної стінки.
4. Від чого залежить вибір барвника і методів фарбування мікроорганізмів?
5. Що таке прості методи фарбування?
6. Які методи фарбування називають складними? Чому їх називають диференційними?
7. На які групи поділяють бактерії залежно від характеру фарбування за Грамом?
8. Методика фарбування за Грамом. Головний та додатковий фарбники, диференціююча речовина. Яку функцію виконує розчин Люголю? Модифікація фарбування за Грамом - спосіб Синьова.
9. На якому етапі фарбування за Грамом відбувається диференціація бактерій на грампозитивні та грамнегативні?
10. Яка структура бактеріальної клітини обумовлює її властивість фарбування за Грамом?
11. Причини, теорії та гіпотези, що пояснюють різний характер фарбування за Грамом?
12. Протопласти, сферопласти, L-форми бактерій.
13. Хімічний склад та ультраструктура клітинної стінки кислотостійких бактерій. Біологічна роль хімічних речовин, які входять до складу клітинної стінки цього типу. Приклади патогенних представників з кислотостійким типом клітинної стінки.
14. Техніка фарбування за Цилем-Нільсеном. Основний та додатковий фарбники, диференціююча речовина. Доцільність і значення кожного етапу фарбування. Які особливі умови створюються для досягнення профарбовування клітинної стінки кислотостійких бактерій головним барвником на першому етапі?
15. Війки та джгутики бактерій, відмінності від відповідних структур еукариотів. Методи виявлення рухливості бактерій.
16. Будова джгутикового апарату бактерій. Типи джгутикування бактерій, методи фарбування джгутиків.
17. Які структурні елементи бактеріальної клітини належать до тимчасових?
18. Методи виявлення включень волютину. Явище метахромазії.
19. Техніка фарбування за Нейсером. Значення методу.
20. Техніка фарбування за Лефлером. Значення методу.
21. Будова та біологічна роль бактеріальної спори. Особливості хімічного складу та біологічні особливості спор в порівнянні з вегетативною клітиною. Стадії спороутворення у бактерій.
22. Техніка фарбування за Ожешко. Доцільність і значення кожного етапу фарбування. Які особливі умови створюються для досягнення профарбовування спори бактерій головним барвником?
23. Бациларний, кластридальний і плектридальний типи спороутворення (приклади бактерій). Центральне, субтермінальне, термінальне розташування спор у клітинах (приклади бактерій).

24. Якими чинниками обмовлена висока стійкість ендоспор до дії високої температури і до дії хімічних факторів та опромінення?
25. Відмінності між мікрокапсулою, капсулою та слизовим шаром у бактерій. Біологічні функції капсули. Значення принципу негативного контрастування фону для виявлення капсул у бактерій.
26. Техніка фарбування за Бурі-Гінсом. Значення методу.
27. Морфологія, ультраструктура та класифікація грибів. Роль у патології людини. Методи вивчення морфології грибів.
28. Життєвий цикл грибів. Анаморфа, телеоморфа. Плеоморфні гриби. Дейтеромицети (незавершені, мітоспорові, анаморфні гриби).
29. Морфологічні форми мікроскопічних грибів. Диморфізм грибів. Псевдомійелій.
30. Форми спороношення у цвільових грибів.
31. Конідії: артроконідії (талоконідії), бластоконідії, хламідоконідії.
32. Морфологія, ультраструктура та класифікація найпростіших. Роль у патології людини. Методи вивчення морфології найпростіших.
33. Типи живлення мікроорганізмів (аутотрофи, гетеротрофи, сапрофіти, паразити, фототрофи, хемотрофи).
34. Типи дихання мікроорганізмів: перерахувати, навести приклади.
35. Причини токсичної дії кисню на облігатних анаеробів.
36. Поняття про фактори росту мікроорганізмів (перерахувати).
37. Види транспорту речовин через клітинні мембрани (перерахувати, стисло описати механізм).
38. Поняття про ріст і розмноження мікроорганізмів.
39. Фази росту мікроорганізмів у періодичній культурі (перерахувати, стисло охарактеризувати).
40. Класифікація поживних середовищ за складом і за консистенцією.
41. Основні вимоги, що пред'являються до поживних середовищ (перерахувати).
42. Класифікація мікроорганізмів за температурним оптимумом.
43. Види середовищ за складом і за призначенням (перерахувати, стисло охарактеризувати).
44. Поняття про дезінфекцію, асептику, антисептику, стерилізацію.
45. Види дезінфекції, стерилізації (перерахувати).
46. Види антисептиків. Коротка характеристика.
47. Фізична стерилізація (перерахувати методи, охарактеризувати).
48. Поняття про пастеризацію, тиндалізацію (механізм, температурні режими).
49. Поняття про механічну стерилізацію (види, повнота).
50. Поняття про режими роботи автоклава і сухожарової шафи, режими стерилізації (перерахувати).
51. Методи контролю стерильності (перерахувати, вказати переваги і недоліки, навести приклади).
52. Техніка підготовки скляного посуду до стерилізації.

Тестові завдання:

1. У хворого, що надійшов до інфекційного відділення зі скаргами на судомне скорочення м'язів обличчя, з садна правої нижньої кінцівки були виділені бактерії з термінальним розташуванням спор, що надає їм вигляд "барабаних паличок". Яким бактеріям притаманні дані властивості?

- A –Clostridium botulinum
- B –Bacillus cereus
- C –Bacillus anthracis
- D –Clostridium perfringens
- E –*Clostridium tetani

2. В мазках із матеріалу, який взятий від хворого з підозрою на дифтерію виявлені жовті палички з синіми зернами на кінцях. Який спосіб фарбування використаний в даному випадку?

- A –Козловського
- B –Леффлера
- C –Циля- Нільсена
- D –*Нейссера
- E –Романовського

3. У препараті, зафарбованому за методом Ожешки, видно паличковидні мікроорганізми, зафарбовані в синій колір, в яких термінально розміщені елементи округлої форми, зафарбовані в червоний колір. Як називаються ці компоненти?

- A –Війки
- B –*Спори
- C –Джгутики
- D –Капсула
- E –Мезосоми

4. На занятті по мікробіології студенти ознайомились з мікроскопічним методом діагностики. Які властивості бактерій вивчають цим методом?

- A –Біохімічні
- B –Культуральні
- C –Антигенні
- D –Токсигенні
- E –*Морфологічні, тинкторіальні

5. У лабораторію поступило харкотиння хворого на туберкульоз. Який метод фарбування слід використати для виявлення збудників туберкульозу?

- A –Грама
- B –*Циля-Нільсена
- C –Гімзе-Романовського
- D –Буррі-Гінса
- E –Нейссера

6. У дитини 7 років з підозрою на дифтерію в мазках з зіву було виявлено мікроорганізми, які при фарбуванні за методом Нейссера мали вигляд жовтих паличок з темно-синіми потовщеннями на кінцях у вигляді розчепіrenих пальців руки. Який структурний компонент клітини коринєбактерій дифтерії при цьому було виявлено?

- A – *Зерна волютину
- B – Капсулу
- C – Спори
- D – Джгутики
- E – Ядра

7. При тривалому використанні пеніциліну бактерії трансформуються в L-форми. В чому полягає основна відмінність L-форм від звичайних клітин?

- A – Відсутність ЦПМ
- B – Відсутність оболонки
- C – *Відсутність клітинної стінки
- D – Відсутність включень
- E – Відсутність джгутиків

8. При мікроскопуванні мазку зі слизових оболонок мигдаликів хворого виявлена велика кількість крупних клітин овальної форми. Деякі з них брунькуються та утворюють псевдоміцелій. Які це можуть бути мікроорганізми?

- A – Стрептококи
- B – Стафілококи
- C – *Кандиди
- D – Сальмонели
- E – Спірохети

9. У дитини на слизовій оболонці щік та на язиці виявлені білуваті плями, які нагадують молоко, що скипілося. У виготовлених мазках-препаратах знайдені грампозитивні овальні дріжджоподібні клітини. Які це збудники?

- A – Дифтерійна паличка
- B – *Гриби роду Кандида
- C – Стафілококи
- D – Фузобактерії
- E – Актиноміцети

10. Збудник лепри наділений кислотостійкістю і тому його виявляють в мазках, пофарбованих за Цілем-Нільсеном. Якого кольору набувають бактерії в мазках?

- A – Синього
- B – Зеленого
- C – *Червоного
- D – Жовтого
- E – Фіолетового

11. Хворому з підозрою на озену провели мікроскопічне дослідження виділень з носа з метою виявлення збудника. Яким методом фарбування доцільно скористатись, якщо збуднику притаманне капсулоутворення?

- A – Грама

- В – Ціля-Нільсена
- С – *Буррі-Гінса
- D – Романовського-Гімзи
- Е – Нейссера

12. Хворий 34 років звернувся з приводу карбункула на обличчі. Під час мікроскопічного дослідження виявлені стрептобацили, здатні утворювати капсулу, що дозволило запідозрити сибіркову виразку. Який метод фарбування був використаний для виявлення капсули?

- A – Грама
- В – *Буррі-Гінса
- С – Нейссера
- D – Ожешко
- Е – Пешкова

13. З блювотних мас хворого виділено грамнегативні зігнуті палички, що нагадували вібріона холери. Для підтвердження приналежності збудника до родини вібріонів необхідно встановити його монотрихціальну рухливість. Вкажіть спосіб дослідження.

- A – Посів уколком в стовпчик МПА
- В – Посів у середовище Кітта-Тароцці
- С – *Мікроскопія препарату «висяча крапля»
- D – Посів у МПБ
- Е – Мікроскопія препарату, зафарбованого за Здродовським

14. У лабораторії особливо небезпечних інфекцій проводиться мікроскопічне дослідження патологічного матеріалу, забарвленого за Гінсом-Буррі, від хворого з підозрою на чуму. Яку властивість збудника дозволяє визначити даний метод?

- A – *Капсулоутворення
- В – Спороутворення
- С – Кислотостійкість
- D – Лугостійкість
- Е – Наявність зерен волютину

15. При виділенні чистої культури бактерій зі складної мікробної суміші краще робити первинний посів у такі поживні середовища:

- A. Елективне.
- В. Просте.
- С. Спеціальне.
- D. *Диференційно-діагностичне.
- Е. Консервуюче.

16. Через 7 днів після пластичної операції, яку виконував лікар-стоматолог, у пацієнта розвинувся правець. Виникла підозра, що причиною був контамінований збудником правця шовний матеріал, який був доставлений у бактеріальну лабораторію. Яке поживне середовище необхідно використати для первинного посіву?

- A. Ендо.
- В. Лефорлера.

- С. Левенштейна-Іенсена.
- Д. *Кітта-Тарцці.
- Е. Плоскірева.

17. При посіві випорожнень хворого черевним тифом на середовищі Ендо вирости колонії, які мають різне забарвлення і розміри: одні – великі червоні, інші – безбарвні середніх розмірів. До яких по призначенню середовищ відноситься вказане в умові поживне середовище?

- А. Елективне.
- В. Спеціальне.
- С. *Диференційно-діагностичне.
- Д. Вибіркове.
- Е. Збагачення.

18.3 досліджуваного матеріалу виділені бактерії, що отримують енергію в результаті окислювально-відновлювальних реакцій з використанням субстратів, які служать для них джерелом живлення. До якої групи мікроорганізмів належить виділена чиста культура?

- А. Метатрофи.
- В. Фототрофи.
- С. *Хемотрофи.
- Д. Органотрофи.
- Е. Аутоотрофи.

19. Які середовища слід застосовувати для виділення чистої культури збудника із матеріалу, що містить декілька видів бактерій?

- А. Елективні.
- В. Універсальні.
- С. *Диференційно-діагностичні.
- Д. Середовища на основі м'ясо-пептонного агару.
- Е. Середовища на основі м'ясо-пептонного бульйону.

20. ДНК-полімераза з *Thermus aquaticus* - важливий компонент полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Цей мікроорганізм здатний до росту при температурі вище 100 °C і є

- А *Термофілом
- В Мезофілом
- С Психрофілом
- Д Галофілом
- Е Хемолітотрофом

21. Виберіть метод стерилізації для більшості поживних середовищ:

- А. *Паром під тиском

- В. Тиндалізація
- С. Пастеризація
- Д. Ультрафіолетовим випромінюванням
- Е. У печі Пастера

22. Для стерилізації повітря приміщень використовують обробку:

- А. Паром під тиском
- В. Тиндалізацію
- С. Пастеризацію
- Д. * Ультрафіолетовим випромінюванням
- Е. Гамма-випромінюванням

23. Який із способів слід застосувати для стерилізації м'ясо-пептонного бульйону?

- А. * Автоклавування при 121 °С 30 хв.
- В. Кварцювання
- С. Кип'ятіння протягом 1 години
- Д. Сухий жар 160 °С 2 години
- Е. Фільтрування

24. Потрібно простерилізувати поживні середовища, що містять речовини, які змінюються при температурі вище 100 °С (сечовина, вуглеводи). Який спосіб стерилізації треба вибрати?

- А. * Текучою парою, дробово
- В. Паром під тиском в автоклаві
- С. Кип'ятіння
- Д. Пастеризацію
- Е. Тиндалізацію

- 3. Формування професійних вмінь, навичок (оволодіння навичками, проведення курації, визначення схеми лікування, проведення лабораторного дослідження тощо):

Зміст завдань:

1. Приготувати мазок з культури спороутворюючих паличок, фарбувати за Грамом. Мікроскопувати мазок-препарат, зробити висновок. Оформити протокол, замалювати результати.
2. Вивчити рухливість бактерій методом «висячої» та «роздавленої» краплі.
3. Розглянути і замалювати демонстраційні препарати капсульних бактерій, пофарбованих за Буррі-Гінсом.

4. Розглянути і замалювати демонстраційні препарати спороутворюючих бактерій, пофарбованих за Ожешко.
5. Мікроскопувати демонстраційні препарати палички дифтерії пофарбованих за Леффлером. Зробити висновок. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
6. Мікроскопувати демонстраційні мазки-препарати з мокроти пофарбованих за Цилям-Нільсеном. Зробити висновки. Оформити протокол, замалювати результати.
7. Мікроскопувати демонстраційні препарати дріжджоподібних грибів пофарбованих за Грамом. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
8. Мікроскопувати демонстраційні мазки-препарати малярійного плазмодія пофарбованих за Романовським-Гімзою. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
9. Мікроскопувати демонстраційні препарати лейшманій пофарбованих за Романовським-Гімзою. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
10. Мікроскопіювати демонстраційні мазки-препарати токсоплазм пофарбованих за Романовським-Гімзою. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
11. Мікроскопіювати демонстраційні мазки-препарати лямблій пофарбованих за Романовським-Гімзою. Замалювати мікроскопічну картину в протокол.
12. Ознайомитися з поживними середовищами для культивування бактерій.
13. Ознайомитися з термостатом і стерилізуючою апаратурою.
14. Ознайомитися з апаратурою і поживними середовищами для культивування анаеробів.
15. Ознайомитися з методами приготування поживних середовищ.
16. Приготувати середовище МПА та розлити у стерильні чашки Петрі та в пробірки для отримання скошеного агару.
17. Приготувати середовище Ендо та розлити його у стерильні чашки Петрі.
18. Ознайомитися з технікою підготовки посуду для стерилізації.
19. Зробити посів ґрунту на середовище КІТТ-ТАРОЦЦИ для виділення культури анаеробів.

Рекомендації (інструкції) щодо виконання завдань:

Фарбування кислотостійких бактерій

Кислотостійкі мікроорганізми (збудники туберкульозу, прокази, актиноміцети та ін.) містять велику кількість високомолекулярних ліпідів, восків і міколової кислоти. Вони важко фарбуються звичайними аніліновими барвниками. Але при забарвленні їх концентрованим феноловим фуксином Циля з підігріванням міцно утримують його і не знебарвлюються розчинами кислот, лугів і спиртів. Клітини тканин, лейкоцити, слиз, інші бактерії при такій обробці легко віддають барвник. У зв'язку з цим при додатковому забарвленні препаратів метиленою синькою всі ці елементи після знебарвлення мазків фарбуються в синій колір, а кислотостійкі бактерії залишаються червоними.

Метод Циля-Нільсена

Остаточний варіант методу автори запропонували в 1884 р. Техніка забарвлення включає декілька етапів:

1. На фіксований у полум'ї мазок із харкотиння хворого кладуть смужку фільтрувального паперу, наливають на нього фуксин Циля і забарвлюють, тричі підігріваючи до появи парів

(але не доводячи до кипіння), після чого препарат із фарбою залишають ще на 1-2 хв для охолодження; зливають барвник, знімають папірець, промивають водою.

2. Препарат знебарвлюють 5 % сірчаною або соляною кислотою до появи жовтуватого відтінку (10-30 с) і декілька разів промивають водою.

3. Додатково забарвлюють мазок метиленовою синькою Леффлера, промивають водою, висушують і досліджують під мікроскопом.

Мікроскопічна картина: на загальному синьому (голубому) фоні кислотостійкі бактерії виглядають рубіново-червоними.

Виявлення спор

Спори можна виявити в нативному препараті за допомогою фазово-контрастної мікроскопії (блискучі зерна), у фіксованому препараті (простий метод забарвлення, забарвлення за **Грамом**: спори видно як незабарвлені тільця на пофарбованому тлі тіла бактеріальної клітини). Забарвлення спори за **методом Ожешко** складається з двох етапів:

1. протруювання нефіксованого препарату 0,5% розчином соляної кислоти при підігріванні;
2. фарбування за Цилем - Нільсеном.

Спори бактерій фарбуються в червоний колір, вегетативні форми - в синій.

Фарбування за Романовським-Гімзою є одним із основних і найпоширеніших методів забарвлення мазків крові в гематології. За цим способом добре фарбуються різні структурні елементи паразитів крові – малярійних плазмодіїв, трипаносом, лейшманій. Його також часто застосовують для виявлення токсоплазм, спірохет, рикетсій, личинок нематод тощо.

Поліхромний барвник Гімзи складається з азура, еозину й метиленового синього. Краще вживати готовий його розчин фабричного виробництва. Безпосередньо перед вживанням стандартний розчин розводять дистильованою водою нейтральної або слабо лужної реакції (рН 7,0-7,2) із розрахунку 1-2 краплі барвника на 1 мл води. Препарати-мазки фіксують метанолом протягом 3-5 хв і висушують на повітрі. Приготований розчин наносять на мазок, а ще краще предметне скельце з мазком опускають у склянку з барвником. Забарвлення триває від 30 хв до двох і більше годин. Товсті краплі крові фарбують протягом 30 хв. Потім барвник зливають, препарати промивають водою і добре висушують на повітрі у вертикальному положенні. Мікроскопію проводять із використанням імерсійних об'єктивів. Будучи в розчині синьо-фіолетовим, поліхромний барвник Романовського-Гімзи фарбує цитоплазму в голубий колір, а ядра клітин, тіла бактерій, їх капсули, слиз – у червоно-фіолетовий. У дифтерійних паличок ядерні елементи забарвлюються в темний червоно-фіолетовий колір, а волютинові зерна – у вишнево-червоний; цитоплазма має рожевий колір.

Виявлення гранул волютину

Гранули волютину – внутрішньоцитоплазматичні гранули (включення), що складаються з неорганічних поліфосфатів. Включення є продуктами метаболізму бактерій, використовуються в якості запасних поживних речовин (включення глікогену, крохмалю та ін.).

У лабораторній практиці найбільше значення має виявлення волютинових зерен. Волютиновими їх назвали тому, що вперше ці включення відкриті у *Spirillum volutans*. Їх ще називають метахроматичними, оскільки вони дають явище метахромазії – здатність забарвлюватись у тон, що відрізняється від основного кольору поліхромного барвника. Наприклад, при фарбуванні метиленовим синім зерна набувають пурпурово-синього кольору через надзвичайно сильну спорідненість їх з азурами, які завжди присутні в метиленовому синьому барвнику. Поява пурпурового відтінку і обумовлена здатністю давати метахромазію. Ці включення називають також зернами Бабеша-Ернста за іменами авторів, які вперше описали їх. Розташовуються вони переважно на полюсах бактерій, рідше – по всій довжині клітини. Волютинові зерна є характерною диференціальною ознакою для збудника дифтерії – *Corynebacterium diphtheriae*. Для виявлення цих включень використовують методи Леффлера, Нейссера, П'ю, Мейера, Раскіної та ін.

Метод Леффлера. Фіксований мазок забарвлюють лужним спиртово-водним розчином метиленового синього протягом 4-5 хв, висушують і мікроскопують. При цьому волютинові зерна забарвлюються в темно-синій, а цитоплазма – в блідо-голубий колір.

Метод Нейссера належить до складних методів забарвлення. Він проводиться за таким алгоритмом:

1. На фіксований препарат наносять оцтово-кислу синьку Нейссера і фарбують протягом 1 хв, зливають барвник і промивають водою.
2. Діють на мазок розчином Люголя протягом 20-30 с.
3. Не промиваючи препарат водою, наносять розчин везувіну (або хризоїдину) і фарбують протягом 1-3 хв.
4. Забарвлений мазок промивають водою, висушують і досліджують під мікроскопом.

Мікроскопічна картина: цитоплазма бактеріальних клітин забарвлюється в світлий жовто-коричневий відтінок, метахроматичні зерна – в темно-синій, майже чорний колір.

Виявлення капсули

Зовні клітинної стінки всі бактерії оточені слизовим шаром, який захищає клітини від висихання. **Слизивий шар** має різну товщину і конфігурацію, його межі не чіткі. За допомогою фібрилярних полісахаридних структур слизу здійснюється зв'язок між сусідніми клітинами в колонії бактерій, а також прикріплення бактерій до різних субстратів. Якщо слизовий шар досить товстий, міцний і оформлений, його називають **капсулою**. Морфологічно розрізняють два типи капсул: **мікрокапсули** (товщина менше 0,2 мкм, виявляються тільки при електронній мікроскопії у вигляді шару мукополісахаридних фібрил) і **макрокапсули** (товщина більше 0,2 мкм, добре помітні при світловій мікроскопії). Більшість патогенних бактерій формують в організмі людини і тварин мікрокапсули, які захищають їх від чинників резистентності організму. Макрокапсули, або власне капсули, формують лише деякі бактерії. Для деяких патогенних бактерій характерне утворення капсул тільки в макроорганізмі (стрептококи пневмонії, збудники сибірки, чуми тощо). У деяких бактерій капсула формується і в організмі, і при зростанні на живильних середовищах (клебсієли пневмонії, озени, риносклероми). Більшість капсул складається зі складних полісахаридів, капсули деяких хвороботворних бактерій (збудника сибірки) — з полісахаридів і поліпептидів, що містять переважно L- і D-глутамінові кислоти. Оскільки D-амінокислоти стійкі до протеаз, така капсула краще захищає бактерії від фагоцитозу. Хімічний склад і антигенні властивості речовини капсул є специфічними для бактерій, що дозволяє ідентифікувати бактерії за родом, видом і сероваром. Капсула і слизовий шар не є життєво необхідними компонентами бактеріальної клітини. Однак

капсула оберігає клітину від механічних ушкоджень, висихання, створює додатковий осмотичний бар'єр, перешкоджає проникненню токсичних речовин і бактеріофагів всередину клітини. Капсула захищає патогенні бактерії від чинників резистентності макроорганізму — фагоцитозу, комплементу тощо. Капсула належить до зовнішніх (надоболонкових) структур клітини. При звичайних методах фарбування вона погано сприймає барвники. Лише у препаратах-відбитках з уражених тканин і органів, мазках із гною, харкотиння вони виявляються при будь-якому методі фарбування у вигляді незабарвлених зон (ореолів) між забарвленими тілами бактерій і субстратом.

Метод Буррі - Гінса

1. На чисте предметне скло наноситься невелика крапля чорної туші і крапля суспензії добової агарової культури капсульних бактерій. Суміш обережно перемішується петлею, після чого іншим предметним склом робиться мазок, подібно мазку крові.
2. Після підсушування на повітрі і фіксації в полум'ї спиртівки препарат дофарбовують протягом 2 - 3 хвилин карболовим фуксином Циля, розведеним дистильованою водою 1:1.
3. По закінченні препарат обережно промивається струменем холодної води. Його висушують і мікроскопують. На темному фоні туші будуть видимі пофарбовані червоні мікробні клітини оточені безбарвною капсулою.

Мікроскопічне дослідження живих мікробів. Виявлення рухливості бактерій

Для прижиттєвого вивчення мікроорганізмів використовують методи надавленої й висячої краплі та спеціальні камери для тривалого спостереження за їх ростом, розмноженням, дією різних хіміотерапевтичних препаратів тощо. Перевагою цих методів є можливість досліджувати бактерії в неушкодженому вигляді, тоді як обробка мазків при їх висушуванні, фіксації та забарвленні часто супроводжується зміною мікробних клітин. Значно легше, простіше і швидше можна виявити рухливість, що свідчить про наявність джгутиків. Цим широко користуються в практичних лабораторіях при диференціально-діагностичному визначенні видів збудників.

Виготовлення препарату «роздавлена крапля»: На середину предметного скла наносять краплю добової бульйонної культури мікроорганізмів. Краплю накривають покривним склом так, щоб не з'явилися пухирці повітря. Рідина повинна заповнювати весь простір і не виступати за краї скла.

Виготовлення препарату «висяча крапля»: Використовують спеціальні предметні скельця з поглибленням (лункою) в центрі. Невелику краплю досліджуваного матеріалу наносять на середину покривного скла. Предметне скло накладають на покривне так, щоб крапля знаходилася в центрі лунки. Потім його обережно перевертають і крапля звисає в центрі герметично закритої порожнини лунки.

Фізіологія бактерій вивчає фізичні, хімічні та біологічні процеси в бактеріальній клітині, а також фізичні, хімічні й біологічні перетворення, спричинені бактеріями у навколишньому середовищі.

Для здійснення процесів росту й розмноження бактерій, тобто життєдіяльності, необхідні поживні речовини з навколишнього середовища.

Таблиця 1. Типи метаболізму мікроорганізмів

Джерело енергії	Енергія хімічних реакцій (хемо)	Джерело електронів	Джерело вуглецю	
			Органічні речовини (гетеро)	Неорганічні речовини (авто)
Джерело енергії	Енергія хімічних реакцій (хемо)	Органічні речовини (органо)	Хемоорганогетеротрофи	Хемоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини (літо)	Хемолітогетеротрофи	Хемолітоавтотрофи
	Енергія світла (фото)	Органічні речовини (органо)	Фотоорганогетеротрофи	Фотоорганоавтотрофи
		Неорганічні речовини (літо)	Фотолітогетеротрофи	Фотолітоавтотрофи

Для вирощування бактерій у лабораторних умовах, дослідження їх різноманітних властивостей, тривалого зберігання використовують поживні середовища. Вони повинні відповідати певним стандартам, створюючи оптимальні умови для росту, розмноження й життєдіяльності мікроорганізмів.

Вимоги до поживних середовищ:

- поживність: мають містити всі необхідні джерела макроелементів, мікроелементів, а при необхідності вітамінів та факторів росту; всі сполуки, що входять до їх складу, повинні бути у певному збалансованому співвідношенні;
- вологість: містити необхідну кількість води у своєму складі;
- оптимальна в'язкість;
- оптимальні значення рН, окисно-відновного потенціалу;
- ізотонічність: мати осмотичний тиск як внутрішнє середовище мікробної клітини;
- нетоксичність (для досліджуваних мікроорганізмів);
- буферні властивості;
- стерильність;
- прозорість (бажано).

Середовища розрізняють: за консистенцією (рідкі, напіврідкі, щільні); за складом (прості та складні); за цільовим призначенням (основні, консервуючі, транспортні, накопичувальні, селективні, диференційно-діагностичні, спеціальні - збагачені, середовища для зберігання). Особливою групою є живильні середовища для культивування анаеробів. Крім того, для наукових досліджень, а також промислового культивування мікроорганізмів часто застосовують синтетичні середовища (середовища з точно відомим хімічним складом).

Таблиця 2. Класифікація поживних середовищ за призначенням

Вид поживного середовища	Призначення	Приклади
Прості (основні)	Для культивування невимогливих мікроорганізмів	МПБ, МПА
Спеціальні	Для культивування вимогливих мікроорганізмів	Глюкозний МПБ, сироватковий МПБ, кров'яний МПА, середовище КІТТ-ТАРОЦЦИ
Диференційно-діагностичні	Для диференціювання мікроорганізмів за біохімічними властивостями	Середовища Ендо, Левіна, Гісса
Електівні	Для переважного накопичення певних мікроорганізмів, тоді як зростання інших пригнічене	Лужна пептонна вода, Середовища Леффлера, Ру, Плоскірева, Мюллера
Консервуючі	Для збереження життєздатності мікроорганізмів під час транспортування в лабораторію	Гліцеринава суміш

Виготовлення поживних середовищ

До складу будь-яких середовищ входять переважно натуральні тваринні або рослинні продукти і компоненти – м'ясо, рибна мука, яйця, молоко, кров, дріжджовий екстракт, картопля тощо. З них готують спеціальні напівфабрикати у вигляді екстрактів, настоїв, ферментативних і кислотних гідролізатів (м'ясна вода, дріжджовий екстракт, триптичний гідролізат Хоттінгера, пептон та інші), які є основою для подальшого конструювання поживних середовищ. Крім цього, в живильні середовища додають різні неорганічні солі залежно від потреб мікробної клітини. Як правило, концентрація хлориду натрію складає 5,0 г/л, K_2HPO_4 – 0,2-0,5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, інші солі додаються із розрахунку 0,001 г/л. У необхідних випадках до складу вводять вуглеводи (цукри, багатоатомні спирти), амінокислоти в концентрації 0,5-1,0 %, а також вітаміни (до 0,001 мг/мл). Для забезпечення необхідної густини середовища використовують агар-агар, який одержують з морських водоростей. Він є зручним і необхідним компонентом середовищ, оскільки не споживається бактеріями як

ростовий субстрат. Утворюючи у воді гель, він плавиться при температурі біля 100 °С, а густіє при 40 °С. Джерелом желатину є багаті на колаген субстрати. Серед них хрящі, сухожилки, кістки тощо. Гель, який отримують внаслідок використання желатину, плавиться при температурі біля 32-34 °С і гусне при 28 °С. Проте численні мікроорганізми здатні розщеплювати желатин, тому використання останнього як наповнювача середовища вважається недоцільним. Найчастіше такі середовища з желатином застосовуються для визначення протеолітичних властивостей бактерій.

Виготовлення живильних середовищ є складним динамічним процесом, який потребує уваги бактеріолога. Цей процес складається з декількох основних етапів. Спочатку до дистильованої води згідно з прописом додають необхідні сухі компоненти середовища, ретельно перемішують, розчиняючи при нагріванні. Обов'язково встановлюють рН середовища, яке визначають або за допомогою іонометра, або індикаторними папірцями. При цьому слід звернути увагу, що після стерилізації реакція середовища падає на 0,2. Середовища, які містять агар, фільтрують через ватно-марлевий фільтр у гарячому стані, рідкі середовища – через паперові фільтри. Якщо є необхідність, їх освітляють осадженням або за допомогою білка курячого яйця чи сироватки. Середовища розливають у спеціальні матраци, колби, флакони і закривають ватно-марлевими пробками з паперовими ковпачками. Залежно від складу середовища використовують різні режими стерилізації. Так, середовища, які містять вуглеводи, желатин стерилізують в автоклаві 15 хв при температурі 112 °С або текучою парою при температурі 100 °С дробно. Середовища без вуглеводів можна стерилізувати в автоклаві при 115-120 °С протягом 20 хв. Якщо до складу середовищ входять нестійкі до температури компоненти, такі, як нативний білок, сироватка, сечовина, то вони стерилізуються або фільтруванням через бактеріальні фільтри, або їх додають готовим у стерильне середовище. Контроль стерильності середовищ здійснюють шляхом витримання їх у термостаті протягом декількох діб при температурі 37 °С.

Виготовлення щільного натурального загальноживаного середовища – м'ясо-пептонного агару (МПА)

Хід роботи:

Для приготування м'ясо-пептонного агару (МПА) використовують виготовлений промисловим способом сухий порошок, який містить всі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю і простотою приготування.

До його складу входять гідролізат м'яса або риби – 17,9 г/л, пептон – 10 г/л, NaCl – 5 г/л, агар-агар – 20 г/л.

1. Зважити вказану в інструкції кількість сухого порошку та розмішати у колбі з 1000 мл холодної дистильованої води.
2. Перевірити рН і при необхідності довести його значення до 7,2-7,4 розчином NaOH.
3. Потім, постійно перемішуючи, довести розчин до кипіння та повного розчинення агару.
4. Отримане середовище профільтрувати у гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр.
5. Розлити середовище в колби та пробірки і стерилізувати при 121°С (при 1 атм в автоклаві) протягом 15-20 хвилин.

Поняття про дезінфекцію, асептику, антисептику, стерилізацію

Асептика - комплекс заходів, спрямованих на попередження потрапляння мікробів на (в) який-небудь об'єкт: операційне поле, бактеріологічний бокс, певні виробничі приміщення, стерильний розчин або препарат (розчини для ін'єкцій, очні краплі). Робота мікробіологів, хірургів і багатьох працівників, пов'язаних з виготовленням і використанням лікарських засобів, передбачає застосування методів асептики. Створення асептичних умов передбачає дезінфекцію приміщень, стерилізацію інструментів і матеріалів.

Антисептика передбачає використання хімічних речовин (антисептик), спрямованих на знищення чи зниження чисельності популяцій облигатно- та умовно-патогенних мікроорганізмів, що знаходяться на шкірі і слизових оболонках макроорганізму.

Дезінфекція - знищення в (на) якому-небудь об'єкті або в навколишньому середовищі патогенних мікробів, що викликають інфекційні хвороби. Мета дезінфекції - перервати шляхи передачі і розповсюдження інфекційного захворювання.

Стерилізація - процес, спрямований на повне знищення в об'єкті всіх життєздатних мікроорганізмів і їхніх спор. Знання і уміле застосування методів стерилізації необхідні провізору, кожному працівнику медичної і мікробіологічної промисловості, фармацевту.

Методи стерилізації підрозділяють на три групи: фізичні, хімічні і фізико-хімічні. До фізичних методів стерилізації відносяться: стерилізація високою температурою, УФ-випромінюванням, іонізуючим випромінюванням, ультразвуком, фільтруванням через спеціальні бактерійні фільтри.

Стерилізацію сухим жаром або гарячим повітрям проводять в сухожарових стерилізаторах, які можуть бути використані для стерилізації скляних, металевих і порцелянових предметів, заздалегідь загорнутих в папір або за-критих ватно-марлевими пробками для збереження стерильності після стерилізації. Крім того, сухим жаром можна стерилізувати термостійкі порошко-подібні лікарські засоби (тальк, біла глина, окис цинку т ін.), мінеральні і рослинні мастила, жири, ланолін, вазелін, віск.

Стерилізація високою температурою є одним з найнадійніших і поширених методів стерилізації. Вона проводиться прожарюванням предметів на полум'ї пальника, кип'ятінням, сухим жаром, паром під тиском і текучим паром.

Прожарюванням у полум'ї стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети і деякі дрібні інструменти (голки, гачки, лопатки). Температура полум'я пальника досягає 900—1500 ° С. При прожарюванні відбувається згорання мікроорганізмів і їхніх спор.

Стерилізацію текучим паром застосовують в тих випадках, коли матеріал, що стерилізується, змінює свої властивості при температурі вище за 100° С. У такий спосіб стерилізують розчини, що містять вуглеводи, вітаміни, молоко та ін. Використовують автоклав з незакріпленою кришкою і відчиненим паро-випускним краном або спеціальний апарат Коха. Оскільки при 100° С багато спорових форм зберігають свою життєздатність, вдаються до дробової стерилізації, нагріваючи матеріал, що стерилізується, текучим паром при 100° С 30 хв 3 рази через кожні 24 год з витримкою об'єктів, що стерилізуються, між стерилізаціями при 18-37° С Із. За цей час спорові форми мікробів проростають і перетворюються на вегетативні, які гинуть при повторних прогріваннях.

Кип'ятіння - найпростіший спосіб стерилізації голок, шприців, хірургічних інструментів, гумових трубок. Для цього застосовують спеціальні стерилізатори для інструментів. Стерилізацію проводять протягом 20-30 хв. Для усунення жорсткості води і підвищення температури кипіння у воду корисно додавати 1-2% бікарбонату натрію. Проте потрібно пам'ятати, що спори де-яких бацил і вірусні частинки (збудник гепатиту) можуть витримувати кип'ятіння протягом декількох годин.

Тиндалізація - вид дробової стерилізації, який застосовують щодо об'єктів, що містять речовини, які розкладаються і денатуруються при 100° С (вітаміни, деякі очні краплі, певні поживні середовища). При цьому нагрівають об'єкт, що стерилізується, на водяних лазнях з терморегулятором при 60-65° С 5 разів або при 70-80° С 3 рази по 60 хв, з витримкою між стерилізаціями за температури 18-37° С. Недолік дробової стерилізації - можливість утворення спор вегетативними клітинами, що утворилися з пророслих спор.

Стерилізація паром під тиском - найнадійніший і часто вживаний спосіб. Він заснований на нагріванні матеріалу насиченим водяним паром при тиску вище атмосферного в спеціальних приладах-стерилізаторах водопарових (автоклавах). Сумісна дія високої температури і пару забезпечує високу ефективність даного способу. При цьому гинуть вегетативні клітини і спори мікроорганізмів. Скляні, металеві і порцелянові предмети стерилізують в автоклаві при 119-121° С (додатковий тиск 1 -1,1 атм) 20-40 хв; перев'язувальні матеріали (вата, лігнін, марля), лігатурний шовк, білизна, фільтрувальний папір, коркові і гумові пробки, пергамент, вироби з гуми, целюлоза, деревинву стерилізують при 119-121° С 20-30 хв; мінеральні, рослинні масла, жири стерилізують за тих самих умов 120 хв. в герметично закритих посудинах. Розчини для ін'єкцій, очні краплі, воду, що дистильовали, і воду для ін'єкцій - при 119-121° С або 110° С (додатковий тиск 0,5 атм) або текучим паром.

Стерилізацію фільтруванням застосовують в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання, зокрема розчини білків, сироватки, деякі вітаміни, летючі речовини. Для фільтрації використовують спеціальні фільтри, які затримують мікробні клітини як механічно, так і шляхом адсорбції клітин на фільтрувальному матеріалі.

Як правило, бактерійні фільтри пропускають віруси і бактеріофаги. Найбільш широко використовують мембранні фільтри і фільтри Зейтца. Перед вживанням фільтруючий пристрій повинен бути простерилізований. Мембранні фільтри стерилізують, помістивши їх у дистильовану воду, автоклавуванням або тривалим кип'ятінням. Утримувач стерилізують окремо, автоклавуючи. Прилад збирають в асептичних умовах безпосередньо перед роботою. Фільтри Зейтца автоклавують в зібраному вигляді, заздалегідь завернув в папір.

Стерилізація опромінюванням

УФ-промені лампи ультрафіолетового випромінювання (БУВ-15, БУВ-30) широко використовують для знезараження повітря лікувальних установ, цехів заводів, аптек, бактеріологічних боксів і лабораторій. УФ-промені можна використовувати для стерилізації прозорих розчинів термолабільних речовин (деяких білків, вітамінів, антибіотиків), поміщених в посудини з кварцового скла і налитих тонким шаром. При цьому посудини необхідно періодично струшувати, оскільки УФ-промені володіють порівняно малою проникаючою здатністю.

Променеву стерилізацію використовують в різних галузях медичної і мікробіологічної промисловості для стерилізації матеріалів, які не витримують термічні або хімічні способи обробки (деякі лікарські засоби, у тому числі антибіотики і гормони, біологічні тканини, вироби з пластмас одноразового користування, наприклад систем для переливання крові, шприців і т. п.). Вибір дози опромінювання залежить від об'єкта, що стерилізується, і його ініціальної контамінації. При виборі дози стерилізації необхідно керуватися двома вимогами: по-перше, опромінювання повинне спричинити на мікроорганізми бактерицидну дію; по-друге, стерилізація не повинна змінювати якість оброблюваних об'єктів. Необхідний контроль залишкової радіації виробів. Основні переваги променевої стерилізації: можливість обробки термолабільних матеріалів, стерилізації об'єктів в упакованому вигляді, включення стерилізації в безперервний виробничий процес.

Хімічна і фізико-хімічна стерилізація

Хімічну стерилізацію застосовують для обробки вакцин, сироваток і інших біопрепаратів, консервованих різними антисептиками (хлороформ, хінозол, мертіолят, фенол, трикрезол та ін.). До хімічної стерилізації відноситься і газо-ва стерилізація.

Газову стерилізацію проводять в герметичних посудинах, наприклад в автоклавах і спеціальних контейнерах. До стерилізуючих газів відносяться формальдегід, окис етилену, бромід метилу, надоцтова кислота. В даний час звичайно використовують окис етилену або її суміш з бромідом метилу. Газом стерилізують вироби медичної техніки (апарати для штучного кровообігу, катетери, зонди, хірургічні рукавички), упаковані в папір або полімерну плівку, через яку гази здатні дифундувати. Після стерилізації газ видаляють продуванням стерильного повітря. Далі слідує тривала (декілька діб) десорбція газу з матеріалу, що стерилізується. Залишкову концентрацію газу в матеріалі необхідно суворо контролювати, оскільки ці гази токсичні. Для деконтамінації повітря та поверхонь використовують метод аерозольної стерилізації. Застосовують водні розчини перекису водню; 3% розчин розрахований на знищення вегетативної флори при щоденному прибиранні виробничих приміщень; 6% розчин застосовують при генеральному прибиранні. Для стерилізації повітря в боксах, операційних використовують розчин, що містить 3% перекис водню і 0,5% молочної кислоти або 3-6% перекис водню і 0,5% сульфонолу. Розчини розпилюють за 40-50 хв до роботи, при цьому обсіменіння повітря знижується в 30-40 разів.

До фізико-хімічних методів відносять ті методи, в яких фізична і хімічна дія на мікроорганізми використовується спільно. Наприклад, для стерилізації деяких розчинів лікарських засобів до них добавляють 0,5% фенолу або 0,3% трикрезолу, а також насичені розчини хлорбутанолгідрату з подальшим нагріванням при 80° С 30 хв. Ін'єкційні розчини таким методом стерилізувати не можна.

Вимоги до результатів роботи, в т.ч. до оформлення:

Опрацювання результатів

- Результати спостережень необхідно занести до протоколу лабораторної роботи.
- Малюнки занести до протоколу, чітко відтворюючи кольори.
- Підписати малюнок: назву виду мікроорганізму на латині, вказати збільшення, метод фарбування, морфологічну форму, тип розташування у мазку.

- У протоколі відмітити основні вимоги до поживних середовищ та умови культивування, сприятливі для більшості патогенних мікроорганізмів.

Матеріали контролю для заключного етапу заняття: задачі, завдання, тести тощо (у разі необхідності):

- Методи виявлення спор – техніка й коротка характеристика.
- Методи виявлення капсул – механізм та техніка фарбування.
- Виявлення джгутиків - механізм та техніка фарбування.
- Поняття про метахромазію. Види включень, що мають таку властивість.
- Поняття про сферопласти, протопласти та L-форми бактерій.
- Методи мікроскопічного вивчення мікроорганізмів у живому стані.
- Поясніть особливості мікробного метаболізму.
- Класифікуйте мікроорганізми за типом дихання, за типом живлення.
- Опишіть найбільш вживані поживні середовища, їх склад та принципи приготування.
- Що таке стерилізація?
- Які існують види стерилізації?
- Які апарати використовують для стерилізації?
- Як проводять перевірку якості стерилізації?
- В якому разі і як проводять механічну стерилізацію?

1. Які із вегетативних спор у грибів виконують одночасно функцію розмноження та виживання в несприятливих умовах навколишнього середовища:

- A –* Хламідоспори;
- B – Бластоспори;
- C – Ендоспори;
- D – Артроспори;
- E – Екзоспори.

2. Для стерилізації бактеріологічних петель використовують:

- A. *фламбування;
- B. сухожаровий метод;
- C. тиндалізацію;
- D. кип'ятіння

5. Підведення підсумків:

Поточний контроль: усне опитування, тестування, оцінювання виконання практичних навичок, розв'язання ситуаційних завдань, вміння аналізувати і інтерпретувати результати досліджень і правильно зробити обґрунтовані висновки, оцінювання активності на занятті.

Оцінювання поточної навчальної діяльності на практичному занятті:

4. Оцінювання теоретичних знань з теми заняття:

- методи: індивідуальне опитування, виконання тестових завдань, перевірка ведення протоколу досліджень;
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

5. Оцінка практичних навичок з теми заняття:

- методи: оцінювання правильності виконання практичних робіт (досліджень)
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

Оцінка за одне практичне заняття є середньоарифметичною за всіма складовими і може мати лише цілу величину (5, 4, 3, 2), яка округлюється за методом статистики.

Критерії поточного оцінювання на практичному занятті

Оцінка	Критерії оцінювання
«5»	Здобувач бере активну участь у практичному занятті, демонструє глибокі знання, дає повні та детальні відповіді на запитання. Бере активну участь у обговоренні проблемних ситуацій, демонструє гарні навички та вміння при виконанні практичного завдання, правильно оцінює отримані результати. Тестові завдання виконані в повному обсязі.
«4»	Здобувач бере участь у практичному занятті; добре володіє матеріалом. Демонструє необхідні знання, але дає відповіді на запитання з деякими помилками; бере участь у обговоренні проблемних ситуацій. Тестові завдання виконані в повному обсязі, не менш ніж 70% відповідей на запитання є правильними.
«3»	Здобувач іноді бере участь в практичному занятті; частково виступає і задає питання; допускає помилки під час відповідей на запитання; показує пасивну роботу на практичних заняттях. Демонструє навички та вміння при виконанні практичного завдання, однак оцінює отримані результати недостатньо повно і точно. Тестування виконано в повному обсязі, не менш ніж 50% відповідей є правильними, відповіді на відкриті питання - не логічні, з явними суттєвими помилками у визначеннях.
«2»	Здобувач не бере участь у практичному занятті, є лише спостерігачем; ніколи не виступає і не задає питання, незацікавлений у вивченні матеріалу; дає неправильні відповіді на запитання, демонструє недостатні навички та вміння, не може впоратися з практичною роботою і оцінкою отриманих результатів.. Тестування не виконано.

6. Список рекомендованої літератури:

Основна:

1. Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман & Шив Піллай. Основи імунології: функції та розлади імунної системи: 6-е видання. Київ: Медицина, 2020, 328 с.
4. Майкл Р Барер, Вілл Ірвінг, Ендрю Свонн & Нелюн Перера. Медична мікробіологія, Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль: 19-е видання: у двох томах. Київ: Медицина, 2021, 434 с.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» - 3-тє видання., оновлено та доповнено // Широбоков В.П за ред. – Вінниця: «Нова книга», 2021. 920 с.

Додаткова:

1. Review of Medical Microbiology and Immunology, 12 edition/ Warren E. Levinson. McGraw-Hill Prof Med.-Tech., 2012. 688 p.
2. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition, 2012, English. 880 p.
3. Anantharyan R. Jayaram Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 12-th Edition.- Orient Longman, 2022.
4. Burrell, C. J., Howard, C. R. & Murphy, F. A. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition (Elsevier Inc., 2016).
5. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-01081-7.
6. Louten, J. & Reynolds, N. Essential Human Virology. (2016).
7. Rich, R. R. & Fleisher, T. A. Clinical Immunology (Fifth Edition) Principles and Practice. Clinical Immunology (2018).
8. Abbas, A., Litchman, A. H. & Pillai, S. Basic Immunology - 6th Edition. (Elsevier Ltd, 2019).
9. Male, D., Peebles, S. & Male, V. Immunology. (2020).
10. Ream, Walt. Molecular microbiology laboratory : a writing-intensive course. (Academic Press, 2013).
11. Nath, S. K. & Revankar, S. G. Problem-based microbiology. (Saunders, 2006).
12. Sandle, T. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-00532-1.
13. Marsh D, P., Lewis A O, M., Rogers, H., Williams W, D. & Wilson, M. Marsh and Martin's Oral Microbiology. (Elsevier Limited, 2016).
14. Wilson, J. (Nurse) & Stucke, V. A. Clinical microbiology : an introduction for healthcare professionals. (Baillière Tindall, 2000).
15. Barer, M. & Irving, W. L. Medical Microbiology 19th Edition A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control. vol. 19 (2018).

Електронні інформаційні ресурси

1. <http://moz.gov.ua> – Міністерство охорони здоров'я України
2. <http://www.microbiologybook.org> - Microbiology and immunology on-line
3. <http://www.microbiologyinfo.com> - On-line microbiology note
4. www.cdc.gov - Centers for diseases control and prevention
5. www.ama-assn.org – Американська медична асоціація / American Medical Association

6. www.who.int – Всесвітня організація охорони здоров'я
7. www.dec.gov.ua/mtd/home/ - Державний експертний центр МОЗ України

Практичне заняття

Тема: Бактеріологічний метод вивчення. Методи виділення чистих культур аеробів і анаеробів. Культуральні та біохімічні властивості мікроорганізмів. Ідентифікація чистих культур бактерій.

Мета: Вивчити загальні правила та методи виділення чистих культур аеробів та анаеробів. Навчитись диференціювати їх за культуральними властивостями. Ознайомитись з методами ідентифікації чистих культур бактерій за морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями.

Основні поняття: бактеріологічний метод, культура мікроорганізмів, чиста культура, колонія мікроорганізмів, ізольована колонія, підозріла колонія, клон, штам, гліколітичні властивості, протеолітичні властивості, ліполітичні властивості, редуруючі властивості.

Обладнання: спиртівки, сірники, агар стерильний в колбах (МПА), стерильні чашки Петрі, чашки Петрі з поживним агаром, пробірки з поживним бульйоном, стерильні піпетки, бактеріологічні петлі, скляні шпатель Дригальського, стаканчики зі спиртом, штативи, склогографи, чашки Петрі з культурами, стерильна вазелінова олія пробірки з посівами, пінцети, предметні та покривні стекла, стерильна вода у пробірках, набір барвників для забарвлення за Грамом, мікроскопи, імерсійне масло, пробірки зі зкошеним МПА, предметні стекла, фільтрувальний папір, лінійка, посуд з дезрозчином для відпрацьованих піпеток. Чашки і пробірки з демонстраційними посівами. Сухі та виготовлені поживні середовища: поживний бульйон, Ендо, Левіна, Гісса, виготовлене середовище ЖСА, кольоровий ряд Гісса, МПБ з індикаторними паперовими смужками, середовище Кітта-Тароцци. Визначник бактерій Бергі (спрощені ідентифікаційні схеми/ключі), диференційні таблиці тест-систем (*Стафітест*, *Ентеротест*).

План:

1. Організаційні заходи (привітання, перевірка присутніх, повідомлення теми, мети заняття, мотивація здобувачів вищої освіти щодо вивчення теми):

Бактеріологічний метод дослідження є найважливішим у практичній діяльності будь-якої мікробіологічної лабораторії. Ідентифікація чистих культур є кінцевою метою бактеріологічного методу діагностики інфекційних захворювань. Його суть полягає у визначенні виду збудника інфекції, і на підставі результатів бактеріологічного методу можна поставити остаточний етіологічний діагноз. Від правильного його виконання залежить визначення етіологічного чинника, що викликав захворювання, і, відповідно, вибір тактики лікування інфекційного хворого. Важливість цього методу ще пояснюється тим, що в багатьох випадках лікарі мають справу з мікробними асоціаціями, тоді необхідно встановлювати роль кожного з мікробів у виникненні хвороби.

2. Контроль опорного рівня знань (письмова робота, письмове тестування, фронтальне опитування тощо) (у разі необхідності).

Вимоги до теоретичної готовності студентів до виконання практичних занять:

– вимоги до знань:

1. Дати визначення понять: «бактеріальна культура», «чиста культура», «мішана культура», «колонія», «ізольована колонія», «підозріла колонія».

2. Класифікувати, перерахувати та описати принципи та методи виділення чистих культур аеробних та анаеробних бактерій.
3. Перерахувати етапи виділення чистих культур бактерій шляхом посіву на щільні поживні середовища. Охарактеризувати кожний етап.
4. Охарактеризувати культуральні властивості мікроорганізмів – тип живлення, дихання, температурний оптимум, морфологія росту на щільних та рідких поживних середовищах, пігментоутворення.
5. Надати класифікацію ферментів бактерій.
6. Перерахувати та описати методи вивчення ферментативної активності бактерій та використання їх для ідентифікації бактерій.
7. Навести приклади сучасних методів прискореної ідентифікації бактерій за допомогою автоматизованих індикаторів ферментативної активності.

– перелік дидактичних одиниць:

1. Виділення чистої культури і її ідентифікація - основа бактеріологічного методу діагностики.
2. Визначення понять: “колонія”, “ізолювана колонія”, “підозріла колонія”.
3. Схема виділення чистої культури аеробів.
4. Схема виділення чистої культури анаеробів.
5. Техніка посівів і пересівань при виділенні чистих культур бактерій.
6. Культуральні властивості бактерій.
7. Пігменти мікробів.
8. Методи вивчення морфології та мікроскопічного складу колоній.
9. Техніка приготування мазка з колонії та пересівання її на МПА.
10. Методика ідентифікації бактеріальної культури.
11. Ферменти бактерій, їх біологічна роль.
12. Методи визначення гліколітичних (цукролітичних) властивостей.
13. Методи визначення протеолітичних властивостей.
14. Методи визначення ліполітичних, нуклеазних, редукуючих властивостей бактерій.
15. Поняття: вид, підвид, інфрапідвид, штаб (варіант), клон.

- питання (тестові завдання, задачі, клінічні ситуації) для перевірки базових знань за темою заняття.

Теоретичні питання:

1. Бактеріологічний метод дослідження.
2. Визначення понять: “колонія”, “ізолювана колонія”, “підозріла колонія”.
3. Схема виділення чистої культури аеробів.
4. Схема виділення чистої культури анаеробів.
5. Принципи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів.
6. Етапи виділення чистих культур мікроорганізмів та їх ідентифікація
7. Методи виділення чистих культур, засновані на механічному принципі: метод послідовних розведень, метод Коха (метод пластинчастих розведень), метод Дригальського, метод штрихових посівів.
8. Методи виділення чистих культур, засновані на біологічному принципі: за типом дихання за спороутворенням і т.д.
9. Техніка посіву патологічного матеріалу на поживні середовища бактеріологічною петлею, тампоном, шпателем.

10. Методи створення анаеробних умов: фізичні методи, хімічні методи, біологічні методи.
11. Середовища, методи та прилади, що використовуються для культивування анаеробних бактерій.
12. Середовище Кітта-Тароцци: на чому базується його дія, що входить до його складу, що роблять із середовищем перед посівом і для чого?
13. Поняття про культуральні властивості мікробів.
14. Культуральні властивості бактерій: характер росту даного виду бактерій на рідких та щільних поживних середовищах (категорії).
15. Особливості бактеріологічного методу виділення чистих культур анаеробних мікроорганізмів: від взяття і транспортування матеріалу до ідентифікації культури.
16. Пігменти мікробів, їх характеристика.
17. Ферменти бактерій, їх класифікація. Конститутивні та індуктивні ферменти, генетична регуляція. Специфічність дії ферментів. Екзо- та ендоферменти.
18. Використовування мікробів і їх ферментів в біотехнології.
19. Методи вивчення ферментативної активності бактерій і використання їх для ідентифікації бактерій.
20. Сучасні методи швидкої ідентифікації бактерій за допомогою автоматизованих індикаторів ферментативної активності.
21. Диференційно-діагностичні поживні середовища. Загальний принцип їх використання. Приклади середовищ. Приклади індикаторів.
22. Визначення протеолітичних властивостей: лакмусове молоко та середовище з желатиною. Принципи обліку результатів.
23. Визначення пептолітичних властивостей на МПБ та пептонній воді за принципом визначення утворення кінцевих продуктів – аміаку, сірководню та індолу. Назвати індикатори та принцип їх дії.
24. Методи визначення гліколітичних (цукролітичних) властивостей бактерій.
25. Середовища Ендо, Левіна, Плоскірева, Гісса, Кліглера, Рессела, Олькеницького. Принцип дії, індикатори, облік результатів.
26. Як визначають ліполітичні властивості мікроорганізмів? Приклади середовищ. Облік результатів.
27. Методи виявлення редуруючих властивостей мікроорганізмів.

Тестові завдання:

1. При виділенні чистої культури бактерій зі складної мікробної суміші краще робити первинний посів у такі поживні середовища:

- А. Елективне.
- В. Просте.
- С. Спеціальне.
- Д. *Диференційно-діагностичне.
- Е. Консервуюче.

2. Через 7 днів після пластичної операції, яку виконував лікар-стоматолог, у пацієнта розвинувся правець. Виникла підозра, що причиною був контамінований збудником правця шовний матеріал, який був доставлений у бактеріальну лабораторію. Яке поживне середовище необхідно використати для первинного посіву?

- A. Ендо.
- B. Лефорлера.
- C. Левенштейна-Іенсена.
- D. *Кітта-Тарцці.
- E. Плоскірева.

3. При посіві випорожнень хворого черевним тифом на середовищі Ендо вирости колонії, які мають різне забарвлення і розміри: одні – великі червоні, інші – безбарвні середніх розмірів. До яких по призначенню середовищ відноситься вказане в умові поживне середовище?

- A. Елективне.
- B. Спеціальне.
- C. *Диференційно-діагностичне.
- D. Вибіркове.
- E. Збагачення.

4. Внаслідок несвоєчасного лікування пульпіту в пацієнта розвинувся остеомієліт нижньої щелепи. Яке дослідження дозволяє виявити збудника та підібрати ефективний препарат для лікування хворого?

- A. Виявлення антигенів збудника.
- B. Виявлення специфічних антитіл.
- C. Мікроскопічне дослідження пунктату.
- D. *Виділення чистої культури.
- E. Комплексні серологічні дослідження.

5. Для дослідження виділеної чистої культури стрептококів лаборант використав кров'яний агар. Це середовище:

- A. Є диференційно-діагностичним середовищем.
- B. Дуже рідко використовується в лабораторній діагностиці.
- C. *Виявляє гемолітичну активність бактерій.
- D. Пригнічує ріст бактерій.
- E. Є синтетичним поживним середовищем.

6. Ідентифікацію аеробних бактерій на першому етапі виділення чистих культур проводять за:

- A. *Морфологічними та тінкторіальними властивостями.

- В. Біологічними властивостями.
- С. Антигенною структурою.
- Д. Ферментативними властивостями.
- Е. Культуральними властивостями.

7. Які середовища слід застосовувати для виділення чистої культури збудника із матеріалу, що містить декілька видів бактерій?

- А. Елективні.
- В. Універсальні.
- С. *Диференційно-діагностичні.
- Д. Середовища на основі м'ясо-пептонного агару.
- Е. Середовища на основі м'ясо-пептонного бульйону.

8. Для лабораторної діагностики багатьох інфекційних захворювань використовують бактеріологічний метод. Яка мета 1-го етапу цього методу?

- А. *Одержання ізолюваних колоній
- В. Посів досліджуваного матеріалу
- С. Мікроскопія досліджуваного матеріалу
- Д. Виділення та накопичення чистої культури
- Е. Ідентифікація досліджуваної культури

9. Кожен вид мікроорганізмів продукує постійний для нього набір ферментів, що використовується в лабораторній діагностиці інфекцій для ідентифікації збудника. Для вивчення цукролітичних властивостей мікроорганізмів досліджувані культури мікробів засівають на:

- А. *Середовище Левіна.
- В. М'ясо – пептонний желатин.
- С. Середовище Леффлера.
- Д. Середовище Кітга – Тароцці.
- Е. Молочно – сольовий агар.

10. На третьому етапі виділення чистих культур аеробів ідентифікацію бактерій проводять за:

- А. Культуральними властивостями на рідкому поживному середовищі.
- В. Морфологічними властивостями.
- С. Тінкторіальними властивостями.
- Д. *Ферментативними властивостями.
- Е. Культуральними властивостями на щільному поживному середовищі.

11. При бактеріологічному дослідженні випорожнень хворого на дизентерію на середовищі Ендо виявлено ріст безбарвних колоній. Які ферменти при цьому були визначені?

- А. Які розщеплюють білки.
- В. *Які розщеплюють вуглеводи.

- C. Розщеплення ліпідів.
- D. Розщеплюють пестициди.
- E. Розщеплюють антибіотики.

12. У хворого була виділена культура бактерій, що не росте в присутності кисню. Як забезпечити умови росту для цієї культури?

- A. Використанням апарата Кротова.
- B. Використанням сироваткового середовища.
- C. Використанням печі Пастера.
- D. *Використанням анаеростату.
- E. Середовищами з окисним редокс - потенціалом.

13. Після інкубації в анаеростаті посіву гомогената некротизованої тканини на кров'яному агарі Цейслера через 48 годин виростили шорсткі великі плоскі колонії, що мають тенденцію до повзучого росту. На які властивості виділених мікроорганізмів вказується в умові тестового завдання?

- A. *Культуральні
- B. Морфологічні
- C. Тінкторіальні
- D. Протеолітичні
- E. Гемолітичні

14. На практичному занятті з мікробіології студенти виділяли чисту бактеріальну культуру. Бактеріальну суспензію засівали на тверде поживне середовище для одержання окремих видимих колоній, в результаті чого утворювались колонії типу R і S, вирощені в термостаті після одного дня інкубації. Які властивості мікроорганізму описали студенти?

- A. *Культуральні
- B. Тінкторальні
- C. Біохімічні
- D. Морфологічні
- E. Антигенні

15. Патогенні мікроорганізми виробляють різні ферменти, щоб проникати в тканини тіла і поширюватися там. Вкажіть ці ферменти серед названих нижче.

- A. *Гіалуронідаза, лецитінази
- B. Ліаза, лігаза
- C. Трансфераза, нуклеаза
- D. Оксидаза, каталаза
- E. Естераза, протеаза

16. У хворого з гострим циститом при дослідженні сечі виявили лейкоцити і багато грамнегативних паличок. При посіві виростили колонії слизового характеру, які утворювали зелений розчинний пігмент. Який мікроорганізм, найбільш ймовірно, є причиною захворювання?

- A. *Escherichia coli*
- B. *Salmonella enteritidis*
- C. *Klebsiella pneumoniae*

D. *Proteus mirabilis*
E. **Pseudomonas aeruginosa*

4. Формування професійних вмінь, навичок (оволодіння навичками, проведення курації, визначення схеми лікування, проведення лабораторного дослідження тощо):

Зміст завдань:

1. Ознайомитись з типами поживних середовищ (демонстрація) та апаратурою для культивування мікроорганізмів.
2. Зробити посів досліджуваного матеріалу (суміш культур бактерій) на щільне поживне середовище в чашку Петрі різними методами механічного роз'єднання з метою отримання ізольованих колоній.
3. За демонстраційним зразком розглянути особливості росту мікроорганізмів, посіяних бактеріологічною петлею, тампоном, шпателем.
4. Вивчити культуральні властивості мікроорганізмів у демонстраційних посівах. На запропонованих чашках Петрі з посівами охарактеризувати різні типи колоній, визначити їх розмір, колір, форму, прозорість, консистенцію, характер краю. Всі ознаки відмітити у таблицях протоколу.
5. З матеріалу частини колоній приготувати мазок, фарбувати за Грамом, мікроскопувати, замальовати, зробити висновок про чистоту отриманої культури.
6. Колонії, що вивчаються субкультивувати (пересіяти) бактеріологічною петлею на скошений поживний агар (МПА) для накопичення чистої культури, поставити у термостат.
7. Здійснити ідентифікацію чистої культури за основними видовими ознаками. Вивчити морфологію чистої культури. Здійснити посів чистої культури на диференційно-діагностичні середовища та тест-системи (ентеротест, стафітест) для визначення біохімічних властивостей.
8. Розглянути демонстраційні посіви на диференційно-діагностичних середовищах, в мікротест-системах. Оцінити (охарактеризувати) біохімічні властивості зі зміною кольору індикаторів, за таблицями тест-систем. Результати занести у протокол.
9. На демонстраційних матеріалах вивчити етапи виділення чистої культури анаеробних бактерій. Ознайомитись з комерційними системами та апаратурою для культивування анаеробів.
10. Зробити пересів виділеної чистої культури аеробів на середовища Гісса, молоко, МПБ (помістити індикаторні папірці на індол і сірководень).
11. Вивчити по демонстрації методику обліку біохімічних властивостей бактерій на середовищах Гісса, Ендо, молоці, МПБ.
12. Приготувати мазок з культури, що виросла на середовищі Кітт-тароцці, фарб. за грамом, мікроскопувати, замальовати.
13. Приготувати мазок з 2-х основних видів колоній (безбарвної та білої), забарвити за Грамом, мікроскопувати, замальовати.

Рекомендації (інструкції) щодо виконання завдань:

КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ

Культура мікроорганізмів — це мікроорганізми, розмножені на живильному середовищі в лабораторних умовах. Культури мікроорганізмів мають штучний, лабораторний характер.

Популяція мікроорганізмів — це сукупність живих мікроорганізмів, незалежно від того, отримана вона в лабораторії чи розвилася в природних умовах в організмі хазяїна чи поза організмом.

Чиста культура — культура одного виду мікроорганізмів. Якщо культура складається з кількох видів мікроорганізмів, вона є змішаною.

Клон — мікробна популяція, отримана шляхом вегетативного розмноження однієї клітини. За визначенням, клонова культура складається з бактерій, ідентичних за генотипом і фенотиповими ознаками.

Штам — культура мікроорганізмів, виділена з певного джерела. Штами бактерій, отримані з різних джерел, практично можуть не відрізнятися, але деякі штами можуть мати суттєві відмінності. Цих відмінностей недостатньо, щоб вважати штами належними до різних видів чи варіантів. Але деякі штами, які мають корисні властивості, є об'єктами патентування.

Для росту й розмноження бактерій необхідно створити спеціальні умови, визначені для кожного виду бактерій:

1. Відповідне поживне середовище.
2. Визначені умови аерації.
3. Визначена температура.
4. Відсутність шкідливих впливів.

Культуральні властивості бактерій

Кожний вид бактерій відрізняється особливостями морфології росту на рідких та щільних поживних середовищах, пристосуванням до умов культивування — це культуральні властивості бактерій. Вони визначають вибагливість до живильних середовищ, тип дихання, температурний оптимум, морфологію росту бактерій на рідкому та щільному поживних середовищах. На рідкому поживному середовищі більшість бактерій дають дифузне помутніння з наступним утворенням осаду. Стрептококи дають придонний та пристінний кришкоподібний ріст, паличка сибірки — осад у вигляді жмутка вати. Ріст чумного мікроба

порівнюють із сталактитовою печерою: утворюється плівка, від якої, як сталактити, спускаються нитки. Назустріч росте осад у вигляді сталагмітів. Паличка дифтерії дає ріст на зсілій сироватці у вигляді «шагреневої шкіри» — окремі опуклі дрібні колонії кремового відтінку, не злиті між собою. На пластинчастому агарі з окремих мікробних клітин виростають колонії.

Колонія — це результат розмноження однієї бактеріальної клітини на щільному поживному середовищі. Колонією називають обмежений ріст бактерій тільки на щільному середовищі. На рідкому поживному середовищі внаслідок конвекційних потоків рідини, броунівського руху, рухливості бактерій відбувається безперервне перемішування бактерій, тому навіть одна мікробна клітина іншого виду спричинює отримання змішаної культури бактерій. Принципова відмінність щільних поживних середовищ, введених у біологічну практику Робертом Кохом, у тому, що мікробні клітини, засіяні в різних ділянках середовища, дають незлитий ізольований ріст культур. Це й забезпечує отримання чистих культур за рахунок механічного розділення, розсіювання суміші мікроорганізмів на поверхні або в товщі щільного поживного середовища. Наведене визначення колонії є не зовсім точним. Колонія не обов'язково утворюється в результаті розмноження однієї мікробної клітини — це може бути диплокок, ланцюжок бактерій або скупчення бактерій, засіяне в одному місці. Тому інколи колонії виявляються змішаними, тобто складаються з кількох видів бактерій. Головним при визначенні поняття колонії є те, що вона утворюється з одного зародка й може дати змогу отримати чисту культуру бактерій. Принцип виділення чистої культури — це отримання ізольованих колоній мікроорганізмів на щільних поживних середовищах, вибір визначеної (підозрілої) колонії за морфологічними ознаками та мікроскопічним складом з наступним пересівом її для розмноження й збереження культури в чистому вигляді. Морфологія колоній — важлива диференційна ознака бактерій. Бактеріолог повинен вміти вибрати підозрілу колонію за її морфологією і мікроскопічним складом. При цьому звертають увагу на розміри, форму, характер країв, поверхні, структуру, колір, консистенцію колоній.

Продукти життєдіяльності бактерій

При рості й розмноженні бактерій утворюються різноманітні продукти, необхідні бактеріям для їхньої життєдіяльності. Одні з них є екзоферментами для забезпечення надходження поживних речовин у попередньо обробленому вигляді, інші — вітамінами й ростовими факторами для бактерій. Деякі з них є факторами вірулентності бактерій чи антибіотиками. Біосинтетичну активність мікроорганізмів використовують у промисловості, сільському господарстві, біології й медицині. Існують штами мікроорганізмів, які є продуцентами амінокислот, вітамінів, антибіотиків, інших лікарських речовин. Сьогодні біотехнологія значною мірою базується на спеціально відібраних або штучно отриманих штаммах мікроорганізмів з корисними властивостями.

Одними з продуктів життєдіяльності бактерій є **пігменти** (біологічні барвники). Утворення пігментів у мікробних клітин відбувається на світлі при достатньому доступі кисню та певному складі поживного середовища. Пігменти класифікують за хімічною

будовою та розчинністю. Пігментоутворення має певне фізіологічне значення. Пігменти захищають мікробну клітину від природного УФ, радіації, беруть активну участь в процесах дихання, мають антибіотичну дію (продігіозан). За хімічною природою пігменти поділяють на каротиноїдні, хінонові, меланінові, піролові, феназинові.

Бактеріологічне дослідження

Методи виділення чистих культур, засновані на механічному принципі

Метод послідовних розведень, запропонований Л. Пастером, був одним із найперших, який застосовувався для механічного роз'єднання мікроорганізмів.

Він полягає в проведенні послідовних серійних розведень матеріалу, який містить мікроби, в стерильному рідкому поживному середовищі. Цей прийом достатньо кропіткий і недосконалий у роботі, оскільки не дозволяє контролювати кількість мікробних клітин, які попадають у пробірки при розведеннях.

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

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

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

Для одержання ізольованих колоній можна використати посів тампоном, яким проводили забір досліджуваного матеріалу. Дещо привідкривають чашку Петрі із поживним середовищем, вносять туди тампон і обережними рухами втирають матеріал у поверхню чашки, повертаючи поступово тампон і чашку.

Таким чином, істотна перевага методів пластинчастих розведень Коха, Дригальського і штрихових посівів полягає в тому, що вони створюють ізольовані колонії мікроорганізмів, які при інокуляції на інше живильне середовище перетворюються в чисту культуру.

Біохімічна ідентифікація

Біохімічні властивості бактерій досить різноманітні. Найчастіше досліджують цукролітичні, протеолітичні, пептолітичні, гемолітичні властивості, утворення ферментів

декарбоксилаз, оксидази, каталази, плазмокоагулази, ДНК-ази, фібринолізину, перетворення нітратів у нітрити тощо. Для цього існують спеціальні поживні середовища, які засівають мікроорганізмами (строкатий ряд Гісса, МПБ, згорнута сироватка, молоко та ін.). Визначення виду збудника за його біохімічними властивостями називається біохімічною ідентифікацією.

Для дослідження здатності бактерій розщеплювати білки (протеолітичні властивості) використовують молоко або середовище з желатином. Протеоліз у молоці виражається розчиненням згустку казеїну, який утворено бактеріями, що згортають молоко.

Середовища із желатином готують на м'ясній воді, додаючи 1 % пептону, 0,5 % хлориду натрію та 10-20 % желатину. Посів роблять уколом. Протеоліз проявляється розрідженням стовпчика середовища. Оскільки деякі види бактерій відрізняються за особливостями розрідження желатину, цю ознаку можна враховувати при їх ідентифікації.

Пептолітичні властивості (здатність розщеплювати пептони – продукти неповного гідролізу білка) виявляють за допомогою МПБ і пептонної води. Їх засівають мікроорганізмами, а потім визначають утворення кінцевих продуктів – аміаку, сірководню та індолу. Для знаходження аміаку в пробірку вставляють та притискають пробкою червоний лакмусовий папірець. В атмосфері аміаку він набуває синього забарвлення. Індикатором на сірководень є розчин ацетату свинцю, який за аналогічних умов визначення забарвлює фільтрувальний папір, змочений індикатором, у чорний колір за рахунок утворення сульфідів свинцю.

Індол можна виявити за допомогою смужки фільтрувального паперу, змоченого 12 % розчином щавелевої кислоти. За наявності індолу папірець набуває рожевого кольору. Більш чутливим є метод Ерліха. Згідно із загальноприйнятим методом пробкою пробірки притискають папірець, просякнений спеціальним індикатором (спиртовий розчин парадиметиламідобензальдегіду). При наявності індолу колір його змінюється на бузково-рожевий або малиновий. В іншому варіанті визначення індолу до 48-годинної бульйонної культури бактерій додають 1-2 мл сірчаного ефіру, а потім – реактив Ерліха. У нижній частині шару ефіру за 1-2 хв з'являється яскраве малинове кільце.

У мікробіологічній практиці широко використовуються диференційно-діагностичні середовища Ендо, Левіна, Плоскирева, які дозволяють виявити розкладання лактози бактеріями. Вони дозволяють проводити первинну диференціацію бактерій кишкового тракту, що надзвичайно важливо для швидкого виділення чистих культур з їх наступною ідентифікацією. Ці середовища є елективними для багатьох представників родини кишкових бактерій. Випускаються вони у сухому вигляді, тому їх приготування в лабораторіях не потребує багато часу.

За останні роки в практиці мікробіологічних лабораторій почали використовувати спеціальні тест-системи для визначення різноманітних властивостей бактерій: "Roche", "API", "Enterotest", пластини та диски індикаторні біохімічні. Вони зручні для користування, надійні, дозволяють визначати 12-20 і більше різноманітних ознак, значно полегшити ідентифікацію мікробів.

Щоб виявити ліполітичні властивості мікробів, до складу поживних середовищ вводять ліпіди або жироподібні субстанції – твіни. Бактерії за таких умов утворюють райдужні вінчики навколо колоній при розщепленні ліпідів.

Редуруючі властивості вивчають, додаючи до складу середовищ барвники (метиленовий синій, наприклад), які здатні відновлюватись. Фіксуючи час зміни кольору індикатора, можна судити про ступінь вираження редуруючої активності.

На підставі вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних, антигенних, біологічних та інших властивостей мікробів роблять остаточний висновок про ідентифікацію.

Наприклад: “Виділено *Escherichia coli*” або “Виділений збудник належить до виду *Staphylococcus epidermidis*”.

Виділення чистої культури анаеробних бактерій

У лабораторній практиці часто доводиться працювати з анаеробними мікроорганізмами. Вони більш вибагливі до живильних середовищ, ніж аероби, частіше потребують спеціальних ростових добавок, вимагають припинення доступу кисню при їх культивуванні, тривалість росту їх довші. Тому робота з ними складніша, вимагає значної уваги бактеріологів і лаборантів.

Важливим є захист матеріалу, що містить анаеробні збудники від токсичного впливу атмосферного кисню. Тому матеріал із вогнищ гнійної інфекції рекомендується забирати під час їх пункції за допомогою шприца, час між взяттям матеріалу та посівом його на живильне середовище повинен бути максимально коротким.

Методи створення анаеробних умов. Враховуючи, що вільний молекулярний кисень є токсичним для облигатно-анаеробних бактерій, обов'язковою умовою культивування таких мікроорганізмів є обмеження його доступу. Існує ряд методів (механічних, фізичних, біологічних), які дозволяють це забезпечити.

Вимоги до результатів роботи, в т.ч. до оформлення:

Результати вивчення культуральних, біохімічних властивостей досліджуваних культур внести у таблиці протоколу.

Матеріали контролю для заключного етапу заняття: задачі, завдання, тести тощо (у разі необхідності):

Ситуаційні задачі:

1. У поживне середовище з молоком та лакмусовим індикатором висіяли культуру мікроорганізмів. Через деякий час середовище стало рожевим, а потім набуло соломяного кольору з каламуттю. Що стало причиною зміни вигляду середовища?

Обговорення ситуаційної задачі:

Молоко є чудовим середовищем для росту мікроорганізмів, оскільки воно містить молочний білок казеїн, цукор лактозу, вітаміни, мінерали та воду. Лакмусове молоко – це середовище на основі молока, яке використовується для розрізнення різних видів бактерій. Лактоза (молочний цукор), лакмус (індикатор рН) і казеїн (молочний білок), що містяться в середовищі, можуть метаболізуватися різними типами бактерій. Тест диференціює мікроорганізми на основі різних метаболічних реакцій у лакмусовому молоці, включаючи відновлення, бродіння, утворення згустків (згортання), та утворення газу.

Основними субстратами молока, здатними до трансформації, є молочний цукор лактоза та молочні білки казеїн, лактальбумін і лактоглобулін. Щоб розрізнити метаболічні зміни, що відбуваються в молоці, у середовище включено індикатор рН, індикатор окислення-відновлення лакмус. Тоді лакмусове молоко утворює відмінне диференційне середовище, в якому мікроорганізми можуть метаболізувати молочні субстрати залежно від їх ферментативного статусу. В результаті відбуваються різні біохімічні зміни.

Ферментація лактози демонструється, коли лакмус стає рожевим у результаті утворення кислоти. Якщо утворюється достатня кількість кислоти, казеїн у молоці згортається, згортаючи молоко. У деяких організмів згусток зморщується, і на поверхні утворюється

сироватка. Деякі бактерії гідролізують казеїн, в результаті чого молоко стає солом'яного кольору і нагадує каламутну сироватку. Крім того, деякі організми відновлюють лакмус, і в цьому випадку середовище стає безбарвним на дні пробірки.

4. Підведення підсумків:

Поточний контроль: усне опитування, тестування, оцінювання виконання практичних навичок, розв'язання ситуаційних завдань, вміння аналізувати і інтерпретувати результати досліджень і правильно зробити обґрунтовані висновки, оцінювання активності на занятті.

Оцінювання поточної навчальної діяльності на практичному занятті:

1. Оцінювання теоретичних знань з теми заняття:

- методи: індивідуальне опитування, виконання тестових завдань, перевірка ведення протоколу досліджень;
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

2. Оцінка практичних навичок з теми заняття:

- методи: оцінювання правильності виконання практичних робіт (досліджень)
- максимальна оцінка – 5, мінімальна оцінка – 3, незадовільна оцінка – 2.

Оцінка за одне практичне заняття є середньоарифметичною за всіма складовими і може мати лише цілу величину (5, 4, 3, 2), яка округлюється за методом статистики.

Критерії поточного оцінювання на практичному занятті

Оцінка	Критерії оцінювання
«5»	Здобувач бере активну участь у практичному занятті, демонструє глибокі знання, дає повні та детальні відповіді на запитання. Бере активну участь у обговоренні проблемних ситуацій, демонструє гарні навички та вміння при виконанні практичного завдання, правильно оцінює отримані результати. Тестові завдання виконані в повному обсязі.
«4»	Здобувач бере участь у практичному занятті; добре володіє матеріалом. Демонструє необхідні знання, але дає відповіді на запитання з деякими помилками; бере участь у обговоренні проблемних ситуацій. Тестові завдання виконані в повному обсязі, не менш ніж 70% відповідей на запитання є правильними.
«3»	Здобувач іноді бере участь в практичному занятті; частково виступає і задає питання; допускає помилки під час відповідей на запитання; показує пасивну роботу на практичних заняттях. Демонструє навички та вміння при виконанні практичного завдання, однак оцінює отримані результати недостатньо повно і точно. Тестування виконано в повному обсязі, не менш ніж 50% відповідей є правильними, відповіді на відкриті питання - не логічні, з явними суттєвими помилками у визначеннях.
«2»	Здобувач не бере участь у практичному занятті, є лише спостерігачем; ніколи не виступає і не задає питання, незацікавлений у вивченні матеріалу; дає неправильні відповіді на запитання, демонструє недостатні навички та вміння, не може впоратися з практичною роботою і оцінкою отриманих результатів.. Тестування не виконано.

5. Список рекомендованої літератури:

Основна:

1. Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман & Шив Піллай. Основи імунології: функції та розлади імунної системи: 6-е видання. Київ: Медицина, 2020, 328 с.
2. Майкл Р Барер, Вілл Ірвінг, Ендрю Свонн & Нелюн Перера. Медична мікробіологія, Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль: 19-е видання: у двох томах. Київ: Медицина, 2021, 434 с.
3. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» - 3-тє видання., оновлено та доповнено // Ширококов В.П за ред. – Вінниця: «Нова книга», 2021. 920 с.

Додаткова:

1. Review of Medical Microbiology and Immunology, 12 edition/ Warren E. Levinson. McGraw-Hill Prof Med.-Tech., 2012. 688 p.
2. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition, 2012, English. 880 p.
3. Anantharyan R. Jayaram Paniker C. K. Textbook of Microbiology. 12-th Edition.- Orient Longman, 2022.
4. Burrell, C. J., Howard, C. R. & Murphy, F. A. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition. Fenner and White's Medical Virology: Fifth Edition (Elsevier Inc., 2016).
5. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-01081-7.
6. Louten, J. & Reynolds, N. Essential Human Virology. (2016).
7. Rich, R. R. & Fleisher, T. A. Clinical Immunology (Fifth Edition) Principles and Practice. Clinical Immunology (2018).
8. Abbas, A., Litchman, A. H. & Pillai, S. Basic Immunology - 6th Edition. (Elsevier Ltd, 2019).
9. Male, D., Peebles, S. & Male, V. Immunology. (2020).
10. Ream, Walt. Molecular microbiology laboratory : a writing-intensive course. (Academic Press, 2013).
11. Nath, S. K. & Revankar, S. G. Problem-based microbiology. (Saunders, 2006).
12. Sandle, T. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/C2014-0-00532-1.
13. Marsh D, P., Lewis A O, M., Rogers, H., Williams W, D. & Wilson, M. Marsh and Martin's Oral Microbiology. (Elsevier Limited, 2016).
14. Wilson, J. (Nurse) & Stucke, V. A. Clinical microbiology : an introduction for healthcare professionals. (Baillière Tindall, 2000).
15. Barer, M. & Irving, W. L. Medical Microbiology 19th Edition A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control. vol. 19 (2018).

13. Електронні інформаційні ресурси

1. <http://moz.gov.ua> – Міністерство охорони здоров'я України
2. <http://www.microbiologybook.org> - Microbiology and immunology on-line
3. <http://www.microbiologyinfo.com> - On-line microbiology note
4. www.cdc.gov - Centers for diseases control and prevention
5. www.ama-assn.org – Американська медична асоціація / American Medical Association
6. www.who.int – Всесвітня організація охорони здоров'я
7. www.dec.gov.ua/mtd/home/ - Державний експертний центр МОЗ України