

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи

Едуард БУРЯЧІВСЬКИЙ

02 вересня 2024 року



**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ**

«МІКРОБІОЛОГІЯ З ОСНОВАМИ ІМУНОЛОГІЇ»

ЗМІСТОВНИЙ МОДУЛЬ:

«ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ»

Рівень вищої освіти: другий (магістерський)

Галузь знань: 22 «Охорона здоров'я»

Спеціальність: 226 «Фармація, промислова фармація»

Спеціалізація: 226.01 «Фармація»

Освітньо-професійна програма: Фармація, промислова фармація

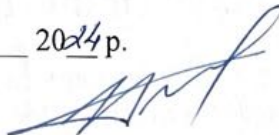
Затверджено:

Засіданням кафедри загальної та клінічної епідеміології та біобезпеки з курсом мікробіології та вірусології

Одеського національного медичного університету

Протокол № 1 від "26" 08 2024 р.

Завідувач кафедри



Микола ГОЛУБЯТНИКОВ

Розробники:

завідувач кафедри, професор закладу вищої освіти, професор, д.мед.н. Микола ГОЛУБЯТНИКОВ

завучка кафедри, доцентка закладу вищої освіти, доцентка, к.біол.н. Ганна ШЕВЧУК

професор закладу вищої освіти професор, д.мед.н. Олександр ГРУЗЕВСЬКИЙ

доцентка закладу вищої освіти, доцентка, к.мед.н. Ірина КОЛЬЦОВА

доцентка закладу вищої освіти, доцентка, к.мед.н. Маріанна КУРТОВА

старший викладач закладу вищої освіти Євген ТАРАСОВ

асистентка Анжела ДУБІНА

асистентка Марія КАГЛЯК

асистентка Сніжана КОБИЛЬНИК

ЗМІСТ

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 бактерій. Фарбування за Грамом.....	4
Структура бактеріальної клітини. Морфологія та структура бактерій, грибів та найпростіших. Фізіологія бактерій. Поживні середовища. Методи стерилізації. Дезінфекція	11
Бактеріологічний метод вивчення. Методи виділення чистих культур аеробних та анаеробних бактерій. Культуральні та біохімічні властивості бактерій. Ідентифікація чистих культур бактерій.....	20
Фаги. Генетика мікроорганізмів. Молекулярно-генетичні методи дослідження.....	26
Мікробіологічні основи антимікробної хіміотерапії та антисептики	26
Відпрацювання алгоритму діагностики в загальній мікробіології	38

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 бактерій. Фарбування за Грамом»

Мета:

Знання: засвоїти предмет та задачі медичної мікробіології, основні форми бактерій, принципи мікроскопії, прості методи фарбування (метиленова синька, генціанвіолет, фуксин). складні методи фарбування (негативне, за Грамом, для виявлення спор, капсули, джгутиків).

Розуміння: пояснити значення морфологічних ознак для ідентифікації мікроорганізмів, фізичні основи світлової мікроскопії. різницю між простим і складним фарбуванням, механізми дії складних методів фарбування.

Застосування: застосовувати методи фарбування та мікроскопії для розпізнавання основних форм бактерій у клінічних зразках. застосовувати складні методи фарбування для діагностики специфічних структур бактеріальної клітини.

Аналіз: порівнювати морфологічні та тінкторіальні властивості різних груп бактерій, аналізувати причини варіацій форм, аналізувати препарати з застосуванням простих та складних методів фарбування.

Синтез: інтегрувати знання про мікроскопічні методи для розробки алгоритму попередньої мікробіологічної діагностики.

Оцінювання: обґрунтовувати вибір методу фарбування залежно від типу мікроорганізму, оцінювати якість препаратів.

Основні поняття (перелік питань):

- Медична мікробіологія: предмет, завдання, роль у медицині та фармації
- Мікроскопія: світлова, електронна, люмінесцентна, конфокальна
- Бактеріальна форма: коки, палички, спірохети, плеоморфізм
- Розташування коків: диплококи, тетради, сарцини, стафілококи, стрептококи
- Фарбування за Грамом: грампозитивні та грамнегативні бактерії
- Фарбування кислотостійких бактерій за Цілем-Нільсеном
- Фарбування ендоспор бактерій за Ожешко
- Фарбування капсули за Гінсом-Бурі
- Фарбування включень волютину за Лефлером та Нейсером
- Властивості барвників: основні та кислі барвники, механізм фарбування
- Артефакти та помилки при виготовленні препаратів

ПЛАН

1. Контроль опорного рівня знань

Тестові завдання («А» правильна відповідь):

В лабораторії бактеріології здійснюється забарвлення бактерій за Грамом. Для цього було підготовлено наступні реактиви: генціанвіолет, розчин Люголю, водний розчин фуксину. Якого реактиву не вистачає для здійснення забарвлення?

А. 96 % етиловий спирт

- В. Карболовий фуксин
- С. 5 % сірчана кислота
- Д. 3 % перекис водню
- Е. Розчин метиленового синього

Вкажіть принцип, на якому ґрунтується мікроскопія в темному полі

А. дифракція світла при проходженні через препарат в рідкому середовищі при боковому освітлені

- В. здатність речовин випромінювати світло під дією ультрафіолету
- С. проходження світла через ряд лінз
- Д. використання потоку електронів, замість видимого світла
- Е. перетворення фазових різниць амплітуд при проходженні через прозорі

об'єкти

Вкажіть, які із нищевказаних організмів грам-негативні

- А. E. coli
- В. Сарцини
- С. Стафілококи
- Д. Бацили
- Е. Клостридії

Вкажіть, які із нищевказаних організмів грам-позитивні

- А. Корінебактерії
- В. Спірохети
- С. Вібріони
- Д. Спірили
- Е. Ешерихії

Етіологічними факторами інфекційних хвороб можуть бути організми з різною ультраструктурою. Які з нищевказаних організмів належать до еукаріотів?

- А. Найпростіші
- В. Віроїди
- С. Віруси
- Д. Пріони
- Е. Скотобактерії

Згідно особливостей будови клітин організми розіляють на прокаріотів та еукаріотів.

Вкажіть, які із нищевказаних організмів прокаріоти?

- А. Бактерії
- В. Найпростіші
- С. Гриби
- Д. Віруси
- Е. Пріони

Мазок хворого з підозрою на круп було забарвлено з використанням насутпних реактивів: генціанвіолет, розчин Люголю, 96 % етиловий спирт, водний розчин фуксину. Яким спосіб забарвлення було використано?

- А. За Грамом
- В. За Лефлером
- С. За Романовським
- Д. За Нейссером
- Е. За Цилем-Нільсеном

На занятті з мікробіології студенти ознайомилися з мікроскопічним методом дослідження. Які властивості мікроорганізмів вивчаються даним методом?

- A. Морфологічні, тінкторіальні
- B. Біохімічні
- C. Антигенні
- D. Токсигенні
- E. Культуральні

На практичному занятті з мікробіології студентам запропоновано пофарбувати суміш бактерій за методикою Грама та пояснити механізм фарбування. Які морфологічні структури бактерій зумовлюють грам-негативне та грам-позитивне фарбування бактерій?

- A. Клітинна стінка
- B. Цитоплазма
- C. Капсула
- D. ЦПМ
- E. Джгутики

Під час мікроскопічної діагностики сифілісу у хворого М. використали мікроскопію в темному полі. Які особливості освітлення поля зору при використанні даного методу мікроскопії?

- A. Препарат освітлено з усіх боків
- B. Джерело світла знаходиться зліва
- C. Поле зору затемнено за допомогою туші
- D. Джерело світла знаходиться зправа
- E. Препарат освітлено знизу

При бактеріологічному обстеженні на бактеріоносійство працівників аптеки у одного з них були виділені бактерії роду *Staphylococcus*. Які морфологічні властивості характерні для даного роду?

- A. Розташування клітин у вигляді грони винограду
- B. Розташування клітин у ланцюжок
- C. Розташування клітин попарно
- D. Розташування клітин тетрадами
- E. Розташування клітин окремо одна від одної

При мікроскопії зубного нальоту клінічно здорової дитини 10-ти років виявлені Гр+ і Гр- мікроорганізми. Який саме етап забарвлення за методом Грама дозволив віддиференціювати Гр+ бактерії від Гр-?

- A. Обробка спиртом
- B. Обробка генціанвіолетом
- C. Обробка сірчаною кислотою
- D. Обробка розчином Люголя
- E. Обробка водним розчином фуксину

При призначенні антибіотиків важливо знати до якої групи за будовою клітинної стінки належить бактерія. Вкажіть, які із наведених організмів грам-негативні?

- A. Менінгокок, гонокок
- B. Стафілокок, стрептокок
- C. Клострідії
- D. Мікобактерії
- E. Корінебактерії

При фарбуванні мазка з мокротиння хворого з підозрою на крупозну пневмонію були використані наступні фарбники та реактиви\/: розчин генціанвіолету, розчин Люголя, 96° спирт, водний фуксин. Який метод фарбування було застосовано в цьому випадку?

- A. За Грамом
- B. За Цилем-Нільсеном
- C. За Лефлером
- D. За Нейсером
- E. За Романовським

Через невеликий розмір мікроорганізмів для визначення їх морфологічних властивостей використовують мікроскопічний метод. Для чого потрібна люмінесцентна мікроскопія?

- A. дослідження препаратів, що оброблені спеціальними барвниками - флюорохромами
- B. дослідження ультраструктури вірусів та макромолекул
- C. дослідження фіксованих та забарвлених мазків в проточному світлі
- D. дослідження ультраструктури клітин
- E. дослідження незабарвлених препаратів з живими мікроорганізмами

Клінічна ситуація 1:

Лаборант підготував препарат із матеріалу пацієнта, приготував мазок, але забув нанести імерсійне масло між об'єктивом та препаратом. При використанні об'єктива 100×, зображення було розмите та невиразне.

Питання: Яка помилка допущена? Чому це призвело до погіршення якості зображення? Що слід виконати для отримання чіткого зображення?

Клінічна ситуація 2:

Здобувач виготовив два препарати: перший мазок забарвив за Грамом, другий - за Цилем-Нільсеном. На першому препараті видно грампозитивні коки та грамнегативні палички. На другому — червоні палички на синьому фоні.

Питання: Який мікроорганізм на другому препараті (кислотостійки бактерії, наприклад, мікобактерії)? Яке практичне значення цих методів у діагностиці?

Письмова робота:

Скласти протокол виготовлення препарату за Грамом з фотографіями/замальовками окремих етапів та опису спостережень.

2. Обговорення теоретичних питань для перевірки базових знань за темою

Питання для обговорення:

1. Охарактеризуйте предмет медичної мікробіології. Яка роль медичної мікробіології у медицині та стоматології? Які основні завдання?
2. Опишіть історію розвитку мікробіології від Левенгука до сучасності. Який вклад Коха, Пастера, Лістера в розвиток науки?
3. Поясніть принцип світлової мікроскопії.
4. Охарактеризуйте основні форми бактеріальних клітин: коки (сферичні), палички (циліндричні), спірохети (спіралеподібні, звивисті). Які функціональні переваги кожної форми?
5. Опишіть розташування коків у просторі: диплококи (парами), тетради (чотирма), грона (гроно винограду), ланцюжки. Яке значення цих признаков для діагностики?

6. Поясніть механізм забарвлення за Грамом: генціанвіолет → розчин люголю → спирт (знебарвлення) → фуксин Пфейфера. Чому грампозитивні залишаються фіолетовими, а грамнегативні стають червоними?

7. Охарактеризуйте структуру клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій. Як це пояснює різницю у фарбуванні та резистентності до антибіотиків?

8. Опишіть забарвлення за Цілем-Нільсеном для виявлення кислотостійких бактерій. Яка роль фенолу як протравлювачу? Які мікроорганізми виявляються цим методом?

9. Яка роль простих методів фарбування (метиленовий синій, основний фуксин, сафранін)? У яких випадках їх використовують замість складних методів?

10. Охарактеризуйте плеоморфізм. На які чинники це впливає? Яке його клінічне значення в діагностиці інфекційних хвороб?

11. Поясніть поняття «артефакти» при виготовленні препаратів. Які помилки найчастіше допускаються? Як їх уникнути?

12. Яке значення мікроскопічного методу у сучасній мікробіології? Яке його місце серед інших методів діагностики (культуральні, молекулярні, серологічні)?

Методи обговорення:

- Інтерактивна лекція з демонстрацією мікроскопа, препаратів
- Робота в малих групах: розпізнавання форм бактерій на мікрофотографіях
- Практична демонстрація виготовлення препаратів та фарбування
- Дискусія про типові помилки при підготовці препаратів

Теми доповідей/рефератів

1. **Історія розвитку мікробіології: від Левенгука до сучасності** — винахід мікроскопа, перші спостереження Левенгука, робота Коха та Пастера, розвиток мікробіологічних методів, революція молекулярної мікробіології.

2. **Методи мікроскопії: від світлової до супер-резолюції** — світлова мікроскопія (історія, принцип, можливості), електронна мікроскопія (трансмисійна, сканувальна), люмінесцентна та конфокальна мікроскопія, методи супер-резолюції (STORM, PALM), застосування у мікробіології.

3. **Вивчення морфології бактерій: від забарвлення до молекулярних методів** — традиційні методи забарвлення, автоматизовані системи розпізнавання образів, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія (CLSM).

4. **Дихотомічний ключ для морфологічної ідентифікації бактерій** — використання морфологічних та тінкторіальних ознак для попередньої ідентифікації, значення у клінічній діагностиці, обмеження методу.

5. **Якість мікроскопічного препарату: критерії оцінювання та частих помилок** — стандарти для оцінювання препаратів, техніка виготовлення (фіксація, тонкість мазка, щільність матеріалу), контроль якості, професійні помилки та способи їх корекції.

Примітка: При підготовці рефератів рекомендується використовувати історичні матеріали, мікрофотографії, порівняння з сучасними методами.

3. Формування професійних вмінь та практичних навичок

Практичні навички:

1. **Користування світловим мікроскопом** — регулювання освітлення (діафрагма, дзеркало), фокусування з об'єктивом 10×, потім 40×, потім 100× (з імерсійним маслом), читання шкали окуляра.

2. **Виготовлення препарату-мазка** — правильне нанесення матеріалу, висушування на повітрі або над полум'ям, фіксація (спирт, тепло).

3. **Забарвлення за Грамом** — послідовність: кристалвіолет (1 хв) → вода → йод (1 хв) → спирт (знебарвлення) → фуксин (1 хв) → вода, висушування.

4. **Мікроскопія з імерсійним маслом** — правильне нанесення масла, переміщення на об'єктив 100×, коректне розташування ока, аналіз препарату, очищення об'єктива після спостереження.

5. **Розпізнавання форм бактерій** — ідентифікація коків, паличок, спірохет, визначення розташування коків (диплококи, тетради, грона), оцінка тінкторіальних властивостей.

Алгоритм роботи:

- Демонстрація правильного користування мікроскопом
- Практичні вправи: виготовлення та фарбування мазків
- Розпізнавання форм та розташування бактерій на еталонних препаратах
- Мікроскопія клінічних матеріалів з вказівками викладача
- Документування результатів (зарисовки, фотографії)

Вимоги до оформлення:

Протокол повинен містити: опис мікроскопа та його частин, послідовність виготовлення мазка та фарбування, мікрофотографії або зарисовки спостережень, опис морфологічних ознак виявлених мікроорганізмів.

Контроль заключного етапу:

- Практичне завдання: виготовлення та фарбування мазків
- Мікроскопія еталонних препаратів з розпізнаванням форм бактерій
- Тестування

4. Підведення підсумків

- Узагальнення знань про предмет та методи мікробіології
- Значення морфологічних методів у діагностиці інфекцій
- Практичне застосування методів фарбування у клінічній роботі
- Відповіді на запитання здобувачів
- Оцінювання практичних навичок
- Завдання для самостійної роботи: перегляд мікрофотографій різних бактерій та їхня ідентифікація

Список рекомендованої літератури

Основна:

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник / За ред. В.П. Широбокова. — Вінниця: Нова Книга, 2021. — 952 с.
2. Лабораторна діагностика інфекційних хвороб: посібник / В.В. Бондаренко, О.В. Мартиненко. — Харків: Основа, 2021. — 424 с.
3. Клінічна лабораторна діагностика: підручник / За ред. Є.О. Коваленка. — Київ: Медицина, 2020. — 648 с.

Додаткова:

1. Nester E.W., Anderson D.G., Roberts C.E. et al. Microbiology: A Human Perspective, 8th ed. — McGraw-Hill, 2021. — 1136 p.
2. Beverage T.J., Graham L.L. Surface layers of bacteria: polyelectrolytic interaction properties and physicochemical properties. — Microbiological Reviews, 2020; 55(4): 684-705.
3. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. — Williams & Wilkins, 2020.

Електронні інформаційні ресурси:

1. Microbe World: <https://www.microbeworld.org> — освітні матеріали з мікробіології
2. CDC Microscopy Resources: <https://www.cdc.gov/microscopy> — мікрофотографії та навчальні матеріали
3. Wikimedia Commons — Microbiology: <https://commons.wikimedia.org> — фотографії мікроорганізмів
4. PubMed — Bacterial Morphology: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> — наукові статті

ТЕМА

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

Мета:

Знання: засвоїти будову бактеріальної клітини (клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, цитоплазма, ядерна область, включення, капсула, джгутики), засвоїти основні принципи бактеріального метаболізму (аеробне та анаеробне дихання, бродіння), типи живлення, вимоги до фізичних умов росту, принципи конструювання поживних середовищ.

Розуміння: пояснити функцію кожної структури клітини, значення ультраструктури для адаптації та патогенезу, відмінності у будові прокаріотів та еукаріотів, пояснити механізми отримання енергії та будівельного матеріалу бактеріями, залежність росту від умов середовища, класифікацію поживних середовищ за складом та призначенням.

Застосування: застосовувати поживні середовища для культивування різних груп мікроорганізмів, вибирати оптимальні умови росту. Застосувати різні режими стерилізації, провести контроль стерилізації певних об'єктів.

Аналіз: порівнювати структури бактеріальної клітини з еукаріотичними клітинами, аналізувати функціональне значення кожної структури. порівнювати типи живлення та дихання, аналізувати криву росту бактеріальної популяції, обирати середовища для діагностики. Обирати режими стерилізації в залежності від складу матеріалу для стерилізації.

Синтез: інтегрувати знання про структуру для розуміння механізмів адаптації бактерій до умов середовища. конструювати селективні та диференціальні середовища для виділення специфічних мікроорганізмів.

Оцінювання: обґрунтовувати вибір середовища та умов культивування для діагностики конкретних мікроорганізмів. Обґрунтовувати вибір методу та режиму стерилізації різноманітних об'єктів.

Основні поняття (перелік питань):

- Клітинна стінка: пептидоглікан, грамнегативна (двошарова мембрана, ліпополісахарид)
- Цитоплазматична мембрана: дві фосфоліпідні мембрани, структура, функції
- Цитоплазма: вміст, органели, рибосоми (70S)
- Нуклеоїд: хромосома, плазмід, вміст ДНК
- Включення: поліфосфати, гранули глікогену, ліпіди
- Капсула: полісахаридна природа, роль у вірулентності
- Джгутики та пілі: будова, рухливість, адгезія
- Спори: будова, стійкість, спороутворення (кlostридії, бацили)
- Фарбування капсули: метод Гінс-Бурі
- Фарбування спор: метод Ожешко, Грама
- Фарбування джгутиків: полімерні барвники
- Енергетичний метаболізм: аеробне дихання (найбільш ефективне), анаеробне дихання, бродіння (молочнокислі, спиртове)
- Типи живлення: автотрофи, гетеротрофи, мікстотрофи

- Фізичні умови росту: температура (психрофіли, мезофіли, термофіли), рН, вологість, газовий склад
- Поживні середовища: прості, складні, селективні, диференціальні, транспортні
- Крива росту: фаза акліматизації, експоненціальна фаза, стаціонарна фаза, фаза смерті
- Концентрація кисню: облигатні аероби, факультативні анаероби, облигатні анаероби

ПЛАН

1. Контроль опорного рівня знань

Тестові завдання («=» - правильна відповідь):

Бактеріальна клітина містить такі структурні елементи, ЗА ВИКЛЮЧЕННЯМ?

- =Лізосом
- ~Мезосом
- ~Джгутиків
- ~Ядерного апарату
- ~Рибосом

Всі поверхневі структури бактерій мають антигенне різноманіття, КРІМ

- =Пептидоглікан
- ~Джгутики
- ~Капсула
- ~Пілі
- ~-

Для виявлення капсул бактерій використовують наступний метод фарбування{

- =Бурі-Гинса
- ~Ожешко
- ~Романовського-Гимзе
- ~Лефлера
- ~Нейсера

Жовті палички з темно-синіми зернами на кінцях виявляються в мазку матеріалу, взятого у хворого з підозрою на дифтерію. Який метод фарбування використовується в цьому випадку?

- =Нейсера
- ~Циля-іільсена
- ~Лефлера
- ~Романовського
- ~Козловського

Метод Циля-Нільсена застосовується для фарбування?

- =Кислотостійких бактерій
- ~Рикетсій
- ~Спирохет
- ~Хламідій
- ~Простіших

На дослідження взято виділення з ураженої слизової оболонки горла у хворої дитини з підозрою на дифтерію. Мазок підготовлений і пофарбований. При мікроскопії виявляються жовті палички з темно-синіми потовщеннями на кінцях. Який структурний елемент мікробної клітини визначається у виявлених мікроорганізмів?

- =Гранули волютину
- ~Спори
- ~Плазмід
- ~Капсули
- ~Джгутики

При мікроскопії мазка, приготованого з досліджуваного матеріалу від хворої дитини з підозрою на дифтерію і пофарбованого за Нейсером, виявили палички світло-коричневого кольору з темно-синіми включеннями на кінцях. Який структурний елемент мікробної клітини виявлено?

- =Зерна волютина
- ~Спори
- ~Капсули
- ~Ядерний апарат
- ~Джгутики

Студентам запропонували пофарбувати суміш бактерій за Грамом і пояснити механізм фарбування на практичних заняттях з мікробіології. Які морфологічні структури бактерій зумовлюють грамнегативне або грампозитивне фарбування бактерій?

- =Будова клітинної стінки
- ~Будова цитоплазматичної мембрани
- ~Будова капсули
- ~Будова джгутика
- ~Будова цитоплазми

У мікропрепараті мокротиння хворого з важким запаленням легень виявлено мікроорганізми, оточені капсулою. Який переважний хімічний склад компонентів цих клітин?

- =Полісахариди
- ~Пептидоглікан
- ~РНК
- ~Поліфосфати
- ~Ліпіди

У препараті, пофарбованому за Ожешко, виявлені паличкоподібні сині мікроорганізми з червоними кінцевими компонентами округлої форми. Як називаються ці компоненти?

- =Спори
- ~Війки
- ~Капсули
- ~Мезосоми
- ~Джгутики

Хворий доставлений в інфекційне відділення зі скаргами на судоми м'язів обличчя. З садна правої нижньої кінцівки виділені бактерії з термінально розташованими спорами, що нагадують «барабанні палички». Які бактерії володіють такими властивостями?

- =*Clostridium tetani*
- ~*Bacillus cereus*
- ~*Clostridium perfringens*
- ~*Bacillus anthracis*
- ~*Clostridium botulinum*

Яка природа гранул волютина?

- =Поліметафосфати
- ~Полісахариди
- ~Ліпіди
- ~Фосфоліпіди
- ~Протеїни

Яке з наступних тверджень **НАЙБІЛЬШ** точно порівнює клітини людини, бактерій та грибів?

=Клітини людини та грибів мають подібні рибосоми, в той час як бактеріальні рибосоми відрізняються

~Клітини людини здатні до мітозу, а клітини грибів та бактерій - ні

~Клітини людини та грибів мають подібну клітинну стінку, а у бактерій вона інакша - містить пептидоглікани

~Клітини людини та бактерій мають плазмід, фунгальні клітини - ні

В інфекційну лікарню поступив хворий із післягрипозним ускладненням - пневмонією. При дослідженні мокротиння виділили грампозитивні коки, які на поживному середовищі спричиняли бета-гемоліз. Яке середовище було використане при дослідженні?

- =Кров'яний агар
- ~Жовтково-сольовий агар
- ~Сироватковий агар
- ~Середовище Ендо
- ~Середовище Кітта-Тароцці

Виділяють такі типи дихання бактерій, за **ВИНЯТКОМ**?

- =Психрофіли
- ~Факультативні аероби
- ~Облігатні анаероби
- ~Облігатні аероби
- ~Мікроаерофіли

Виділяють такі фази розвитку бактеріальної культури, обов'язкові для всіх бактерій, за **ВИНЯТКОМ**?

- =Спороутворення
- ~Стаціонарного максимуму
- ~Початкова стаціонарна
- ~Логарифмічного відмирання
- ~Логарифмічного росту

Мікроби утворюють спори для виживання в навколишньому середовищі. Які з нижчеперелічених мікроорганізмів є спороутворюючими?

- =Клостридії
- ~Пептострептококи
- ~Пептококи
- ~Стафілококи
- ~Бактероїди

Мікроорганізми в навколишньому середовищі піддаються руйнівному впливу різноманітних фізичних факторів. Як впливає на мікробну клітину висока температура?

- =Незворотнє руйнування всіх структур клітини
- ~Омилення жирів
- ~Альбумінолізис
- ~Спричиняє стан анабіозу

~Мутагенний ефект

На 8 день після операції у пацієнта розвинувся правець. Хірург запідозрив, що причиною є інфікований шовний матеріал і відправив його на бактеріологічне дослідження. На яке середовище необхідно посіяти шовний матеріал спочатку?

=Середовище Кітт-Тароцці

~Середовище Ендо

~Середовище Гіса

~Жовточно-сольовий агар

~Середовище Сабуро

Під час визначення мікробного числа повітря аптеки виділено чисту культуру мікроорганізмів, що росте і розвивається за наявності в атмосфері не менше 20% кисню. До якої групи мікроорганізмів за типом дихання належить виділена культура?

=Облігатні аероби

~Облігатні анаероби

~Мікроаерофіли

~Капнофіли

Клінічна ситуація 1:

При мікроскопії нативного препарату (без фарбування) розглядаються крупні частинки, які при додаванні туші стають невидимими на темному фоні, оточені світлою облямівкою.

Питання: Яку структуру спостерігаємо (капсула)? Чому капсула видна при негативному фарбуванні? Яке клінічне значення капсули у патогенезі?

Клінічна ситуація 2:

При розгляданні препарату *Clostridium tetani* видно палички з круглими структурами на кінцях, які при фарбуванні за Грамом залишаються безбарвними (білого кольору)

Питання: Які структури видні (спори)? Що означає їхня безбарвність при звичайному фарбуванні? Який метод слід використати для їхнього виявлення?

Клінічна ситуація 3:

Лаборант посіяв матеріал від пацієнта на чашки з кров'яним агаром, та поставив їх інкубуватись у наступних умовах: в звичайному термостат при 37°C, в CO₂-інкубаторі при 37°C, в анаеростаті при 37°C. Через добу на першій чашці (на повітрі) колоній мало, на другій та третій — рясні.

Питання: Який мікроорганізм очікується (факультативний анаероб або облігатний анаероб)? Чому на повітрі колоній менше? Які мікроорганізми переважають при розвитку в CO₂ та анаеробних умовах?

Письмова робота:

Створити схему будови грампозитивної та грамнегативної бактеріальної клітини з позначенням всіх компонентів. Скласти таблицю: «Характеристика поживних середовищ для виділення та диференціації основних патогенних бактерій».

2. Обговорення теоретичних питань для перевірки базових знань за темою

Питання для обговорення:

1. Охарактеризуйте будову клітинної стінки бактерій. Яка роль пептидоглікану? Чому він важливий для виживання?

2. Опишіть структурні відмінності між грампозитивними та грамнегативними бактеріями. Яке клінічне значення цих відмінностей?

3. Поясніть структуру та функцію зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Що таке ліпополісахарид (ЛПС) та його роль у вірулентності?
4. Охарактеризуйте цитоплазматичну мембрану. Яка її роль? Чому вона чутлива до дії детергентів та антибіотиків?
5. Опишіть ядерну область (нуклеоїд). Яка хромосома бактерій? Що таке плазмід та їхня роль?
6. Яке значення включень у бактеріальній клітині? Наведіть приклади включень та їхні функції.
7. Охарактеризуйте капсулу та слизистий шар. Яка їхня природа? Яке значення у патогенезі?
8. Опишіть джгутики. Як вони організовані? Яка їхня роль у рухливості та адгезії?
9. Яке значення пілей (ворсинок)? Які типи пілей існують? Яке значення статевих пілей?
10. Охарактеризуйте спороутворення у клостридій та бацил. Яка структура спори? Чому спори стійкі до зовнішніх факторів?
11. Поясніть механізм негативного фарбування. Як ця техніка відрізняється від позитивного фарбування?
12. Опишіть методи виявлення капсули, спор, джгутиків. Яка мета використання кожного методу?
13. Охарактеризуйте енергетичний метаболізм бактерій. Яка роль АТФ?
14. Опишіть аеробне дихання. Які етапи гліколізу, циклу Кребса, окислювального фосфорилування? Скільки АТФ утворюється?
15. Поясніть анаеробне дихання (нітрат як акцептор електронів). Яка енергетична ефективність порівняно з аеробним?
16. Охарактеризуйте бродіння: молочнокисле, спиртове, оцтовокисле. Який вихід реакцій та енергетична ефективність?
17. Опишіть типи живлення: автотрофи (CO_2 як джерело вуглецю), гетеротрофи (органічні сполуки), міксотрофи. Приклади кожного типу.
18. Поясніть фізичні умови росту. Яка роль температури, рН, вологості? Як адаптуються бактерії до екстремальних умов?
19. Охарактеризуйте психрофіли, мезофіли, термофіли.
20. Опишіть залежність росту від концентрації кисню. Дайте визначення облигатні аероби, факультативні анаероби, облигатні анаероби? Наведіть приклади.
21. Поясніть поняття «поживне середовище». Яка основна мета культивування на поживних середовищах?
22. Охарактеризуйте класифікацію поживних середовищ: прості, складні, синтетичні, селективні, диференціальні.
23. Опишіть селективні середовища. Яка мета їх використання? Наведіть приклади для виділення специфічних мікроорганізмів.
24. Охарактеризуйте диференціальні середовища. Яка мета їх використання? Наведіть приклади.
25. Поясніть поняття «крива росту бактеріальної популяції». Опишіть чотири фази: акліматизація, експоненціальна, стаціонарна, смерті.
26. Яке практичне значення знання кривої росту для клінічної мікробіології?

Методи обговорення:

- Інтерактивна лекція з демонстрацією схем будови бактеріальної клітини

- Робота в малих групах: порівняння структур прокаріот та еукаріот
- Практичні вправи: виготовлення препаратів з негативним фарбуванням
- Аналіз мікроелектронних фотографій бактеріальної клітини
- Інтерактивна лекція з демонстрацією схем метаболізму
- Робота в малих групах: розпізнавання типів середовищ та їхнього призначення
- Обговорення вибору оптимальних умов для культивування різних мікроорганізмів
- Обґрунтування оптимального методу стерилізації різноманітних лікарських засобів, фітопрепаратів, повітря приміщень аптеки.

Теми доповідей/рефератів

1. **Еволюція бактеріальної клітини: адаптація структури до середовища** — простота прокаріотичної організації як еволюційна перевага, адаптивне значення клітинної стінки та капсули, мобільні генетичні елементи (плазмід, фаги) як механізми адаптації.
2. **Пептидоглікан: архітектура та мішені для антибіотиків** — структура та синтез пептидоглікану, роль у механічній стійкості клітини, механізм дії β -лактамних антибіотиків (руйнування клітинної стінки), перехідні форми бактерій.
3. **Капсула та слиз: від вірулентності до адгезії** — природа полісахаридної капсули, роль в запобіганні фагоцитозу, важливість у патогенезі, молекулярні механізми адгезії до тканин, використання капсули у вакцинах.
4. **Джгутики та рухливість: молекулярна машина бактерій** — структура джгутика (крючок, тіло, мотор), молекулярний механізм обертання, хемотаксис (рух до поживних речовин, відштовхування від токсинів), застосування в імунології та вакцинах.
5. **Спороутворення та резистентність: 3-5 млрд років еволюції** — будова спори (кортекс, оболонки, дипіколінова кислота), механізми виживання при екстремальних умовах, спороутворення як альтруїстичний процес у популяції, клінічне значення для стерилізації.
6. **Обмін речовин бактерій: від глікози до АТФ** — гліколіз, цикл Кребса, окислювальне фосфорилування, енергетичні розрахунки, еволюція обміну речовин, зв'язок з вірулентністю мікроорганізмів.
7. **Бродіння: коли кисень недоступний** — типи бродіння (молочнокисле, спиртове, пропіонове), вуглеводи як субстрати, продукти бродіння та їхнє застосування, екологічна роль анаеробних мікроорганізмів.
8. **Поживні середовища: від емпіричних до раціональних розробок** — історія розвитку, принципи конструювання, вимоги до «ідеального» середовища, контроль якості, сучасні досягнення.
9. **Крива росту мікроорганізмів: від індивіда до популяції** — математичні моделі росту, ферментаційні процеси, кооперативна поведінка, quorum sensing, значення популяційної динаміки в медицині та біотехнології.

Примітка: При підготовці рефератів рекомендується використовувати електронні мікрофотографії, схеми молекулярних механізмів, 3D моделі.

3. Формування професійних вмінь та практичних навичок

Практичні навички:

1. **Виготовлення препаратів з негативним фарбуванням** — нанесення туші або вугілля, змішування з матеріалом, розтирання тонкого шару, висушування, мікроскопія.
2. **Розпізнавання капсули при негативному фарбуванні** — виявлення світлої облямівки навколо бактеріальної клітини на темному фоні, оцінка розміру капсули.

3. **Виявлення спор** — фарбування за Ожешко, за Грамом
4. **Фарбування джгутиків** — використання полімерних барвників для утовщення джгутиків, розпізнавання розташування джгутиків (перитріхіальні, біполярні, латеральні).
5. **Виявлення включень** — фарбування за Лефлером, Нейсером,
6. **Визначення оптимальної температури для розвитку різних мікроорганізмів** — інкубація при різних температурах, спостереження за ростом, розрахунок температурного оптимуму.
7. **Інокуляція матеріалу на селективні та диференціальні середовища** — вибір потрібного середовища, асептична техніка посіву, правильна розповсюдження матеріалу.
8. **Збереження чистих культур** — умови зберігання (холодильник, глицеринові суспензії).

Алгоритм роботи

- Розпізнавання структур (капсула, спори, джгутики, включення)
- Демонстрація приготування основних типів поживних середовищ
- Практичні вправи: посів матеріалу на різні середовища
- Спостереження за ростом при різних умовах (температура, газовий склад)
- Опис та документування колоній
- Облік кривої росту мікроорганізму
- Документування результатів

Вимоги до оформлення: Протокол повинен містити: описання виявлених структур бактеріальної клітини, опис середовищ та їхнього призначення, умови культивування, описання колоній, фотографії посівів, оцінку росту (кількість колоній, розмір, морфологія).

Контроль заключного етапу:

- Мікроскопія еталонних препаратів з розпізнаванням структур
- Тестування
- Практичне завдання: інокуляція матеріалу на поживне середовище
- Спостереження та документування росту протягом 3-5 днів

4. Підведення підсумків

- Узагальнення знань про будову бактеріальної клітини
- Значення кожної структури для виживання та патогенезу
- Узагальнення знань про фізіологію бактерій та умови їхнього росту
- Практичне застосування поживних середовищ у діагностиці
- Важливість оптимізації умов культивування
- Відповіді на запитання здобувачів
- Оцінювання практичних навичок
- Завдання для самостійної роботи: порівняння структур бактерій, архей та еукаріот. Розроблення селективного середовища для виділення певного мікроорганізму

Список рекомендованої літератури

Основна:

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія / За ред. В.П. Широкова. — Вінниця: Нова Книга, 2021. — 952 с.
2. Лабораторна діагностика інфекційних хвороб / В.В. Бондаренко, О.В. Мартиненко. — Харків: Основа, 2021. — 424 с.

Додаткова:

1. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. — Journal of Bacteriology, 2020; 171(3): 1031-1040.
2. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S.G. The bacterial cell envelope. — Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2021; 2(5): a000414.
3. Errington J. Bacterial sporulation: A paradigm for cell differentiation. — Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020; 2(8): 603-609.

Електронні інформаційні ресурси:

1. Microbe World — Bacterial Cell: <https://www.microbeworld.org/types/bacteria>
2. Wikipedia — Bacterial Cell Structure:
https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_cell_structure
3. Khan Academy — Prokaryotic Cell: <https://www.khanacademy.org>
4. PubMed — Bacterial Cell Wall: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

ТЕМА

«Бактеріологічний метод вивчення. Методи виділення чистих культур аеробних та анаеробних бактерій. Культуральні та біохімічні властивості бактерій. Ідентифікація чистих культур бактерій»

Мета:

Знання: засвоїти принципи виділення чистих культур бактерій, особливості росту аеробів та анаеробів, методи роботи з ними. засвоїти основні біохімічні та культуральні властивості бактерій, принципи ідентифікації; знати схеми біохімічної ідентифікації в клінічній практиці.

Розуміння: пояснити роль чистої культури у діагностиці, принципи створення аеробних й анаеробних умов, суть основних методів посіву. пояснити значення метаболічних і культуральних властивостей для диференціації та ідентифікації патогенних та умовно-патогенних бактерій.

Застосування: застосовувати методи разового й багаторазового посіву для отримання ізольованих колоній аеробних та анаеробних бактерій на щільних середовищах. використовувати стандартні тести (ферментація цукрів, індолютворення, каталазна/оксидазна активність, гідроліз сечовини, редукція нітратів, рухливість) для ідентифікації збудників у практиці.

Аналіз: аналізувати переваги й обмеження різних методів виділення чистих культур, порівнювати умови росту аеробних і анаеробних видів. аналізувати значення набутого спектра тестів для встановлення видового чи родового рівня; оцінювати надійність різних підходів до ідентифікації.

Синтез: інтегрувати різні методики для оптимізації виділення збудника при лабораторній діагностиці. формувати цілісну тактику ідентифікації на основі результатів культурального, біохімічного, мікроскопічного аналізу.

Оцінювання: обґрунтовувати вибір найбільш ефективного методу залежно від зразка й очікуваного збудника, оцінювати чистоту культури. обґрунтовувати вибір стратегії тестування для конкретного зразка, оцінювати ефективність використаних тестів, обґрунтувати діагноз.

Основні поняття:

- Чиста культура бактерій
- Аеробні бактерії, облигатні анаероби, факультативні анаероби
- Глибокий і поверхневий посів
- Метод штриха (штриховий посів), Метод висіву "килимком"
- Середовища для аеробів і анаеробів (кров'яний агар, середовище Вільсона-Блера, Кітта-Тароцці, тіогліколятний бульйон)
- Методи створення анаеробних умов (анаеростат, газогенеруючі пакети, редуктори кисню)
- Критерії чистої культури (ізольована колонія, однорідність вигляду)
- Чиста культура, принцип ідентифікації
- Біохімічні властивості: ферментація цукрів, розкладання білків, редукція нітратів
- Культуральні властивості: типове зростання на різних середовищах, колір, форма, запах, консистенція колоній; утворення пігментів, гемоліз

- Стандартні біохімічні тести (індол, каталазна, оксидазна реакції, гідроліз уреаз, рухливість, цистиновий/ферментативний тест, вогнезаймистість)
- Диференціальні середовища: лактозовмісні-Ендо, MacConkey Agar, глюкозо-жовчний агар, середовище Ендо, Левіна, Манітол-сольовий агар
- Схема біохімічної ідентифікації-грамнегативних паличок, бактерій родини Enterobacteriaceae
- Сучасні автоматизовані підходи: тест-системи API, MALDI-TOF

ПЛАН

1. Контроль опорного рівня знань

Тестові завдання («=» - правильна відповідь):

Бактеріологічний метод застосовується для лабораторної діагностики багатьох інфекційних захворювань. Яка мета першого етапу цього методу?

- =Отримання ізолюваних колоній
- ~Виділення та накопичення чистої культури
- ~Ідентифікація досліджуваної культури
- ~Посів досліджуваного матеріалу
- ~Мікроскопія досліджуваного матеріалу

Виберіть правильне визначення для поняття "Підозріла колонія"

=Колонія, що нагадує за морфологією та мікроскопічним складом колонію патогенних або ізолюваних мікроорганізмів

~Результат розмноження однієї бактеріальної клітини на щільному живильному середовищі

- ~Культура, що містить мікроорганізми двох і більше видів
- ~Культура, що містить мікроорганізми одного виду
- ~Колонія, відокремлена від інших колоній стерильним живильним середовищем

Виберіть правильне визначення для поняття "Чиста культура"

=Культура, що містить мікроорганізми одного виду

~Колонія, що нагадує за морфологією та мікроскопічним складом колонію патогенних або ізолюваних мікроорганізмів

- ~Колонія, відокремлена від інших колоній стерильним живильним середовищем
- ~Культура, що містить мікроорганізми двох і більше видів
- ~Результат розмноження однієї бактеріальної клітини на щільному живильному середовищі

Диференційно-діагностичні живильні середовища використовуються для?

- =Дослідження ферментативної активності мікроорганізмів
- ~Дослідження чутливості бактерій до антибіотиків
- ~Вивчення патогенності мікроорганізмів
- ~Вивчення антигенної структури мікроорганізмів
- ~Накопичення мікробної біомаси

Для визначення мікробного забруднення води використовувався мембранний фільтр. Після цього його поміщали на поверхню живильного середовища Ендо в чашці Петрі. Кишкова паличка дала червоні колонії, в той час як інші бактерії утворили безбарвні колонії. До якої категорії поживних середовищ відноситься середовище Ендо?

- =Диференційно-діагностична
- ~Спеціальна
- ~Консервуюча

- ~Селективна
- ~Прості поживні середовища

Мета II етапу бактеріологічного методу?

- =Накопичення чистої культури
- ~визначення антибіотикограми досліджуваної культури
- ~посів досліджуваного матеріалу
- ~відбір ізольованих колоній
- ~ідентифікація чистої культури

Пацієнт із підозрою на анаеробну газову інфекцію прибув до лікарні. На яке середовище необхідно посіяти матеріал від пацієнта?

- =Кітт-Тароцці
- ~Рассела
- ~Ендо
- ~Мюллера
- ~Левіна

Популяція мікроорганізмів одного виду

- =Чиста культура
- ~штам
- ~колонія
- ~біовар
- ~серовар

Середовища, що застосовуються для виділення певних видів мікроорганізмів?

- =Елективні
- ~диференційно - діагностичні
- ~щільні
- ~рідкі
- ~загальнодоступні

Який матеріал НЕ може бути досліджуваним в бактеріологічному методі?

- =сироватка
- ~мокрота
- ~кров
- ~гній
- ~сеча

Ліполітичні властивості бактерій вивчають на

- =Жовточно-сольовому агарі
- ~Ендо
- ~кров'яному агарі
- ~Левіна
- ~Плоскірева

При обстеженні пацієнта з кишковою інфекцією зробили посів на середовище Ендо, в результаті чого вирости різнокольорові колонії – червоні і безбарвні. За призначенням це середовище можна віднести до?

- =Диференційно-діагностичних
- ~Елективних
- ~Селективних
- ~Спеціальних
- ~Універсальних

Ті організми, які в процесі еволюції не створили захисту від перекису водню можуть жити тільки в анаеробних умовах. Які з перерахованих ферментів можуть руйнувати перекис водню?

- =Пероксидаза та каталаза
- ~Цитохромоксидаза, цитохром b5
- ~Оксигеназа та каталаза
- ~Флавінзалежні оксидази
- ~Оксигенази та гідроксилази

Ферменти широко використовуються як фармацевтичні препарати. Яка головна відмінність між ферментами і небіологічними каталізаторами?

- =Висока специфічність і вибірковість
- ~Висока універсальність
- ~Низька універсальність
- ~Висока поширеність
- ~Висока однорідність

Які ферментативні властивості вивчають на середовищі Гіса?

- =сахаролітичні
- ~протеолітичні
- ~нуклеазні
- ~гемолітичні
- ~всі перераховані

Клінічна ситуація 1:

У стоматологічному кабінеті з абсцесу щелепи у пацієнта отримано гній. Лабораторія повинна виділити можливого анаеробного збудника. Доставка здійснювалася в шприці без дозаправки повітрям.

Питання: Як забезпечити анаеробні умови для культивування? Яке середовище обрати? Який метод посіву застосувати?

Клінічна ситуація 2:

Після посіву матеріалу із неякісної фітосировини на кров'яний агар методом штриха, на чашці Петрі вирости різні за виглядом колонії.

Питання: Чи можна таку культуру вважати чистою? Які подальші кроки треба зробити для ізоляції чистої культури?

Клінічна ситуація 3:

На середовищі Ендо вирости рожеві колонії. Проба на індол позитивна, оксидазна — негативна, уреаза — негативна. Колонії мають неприємний запах, гладку поверхню.

Питання: Який ймовірний збудник (*E. coli*)? Які додаткові тести слід провести? Чим це важливо для діагностики?

Письмова робота:

Скласти покрокову інструкцію виділення чистої культури методом штриха та схемою послідовних пересівів.

Скласти інтерпретуючу таблицю: реакції колоній на диференціальних середовищах + результати біохімічних тестів для *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*.

2. Обговорення теоретичних питань

- Які відмінності між методами виділення культур аеробних та анаеробних мікроорганізмів?

- Який принцип штрихового посіву та чому він важливий для отримання ізолюваних колоній?
- Які умови необхідні для культивування анаеробів? Які основні методи створення анаеробних умов?
- Як перевірити чистоту культури після первинного посіву? Що робити у випадку забруднення?
- Як вибрати оптимальне середовище для виділення аеробів і анаеробів при лабораторній діагностиці?
- Яке значення має чиста культура для біохімічної діагностики?
- Яка роль скринінгових тестів при масовому дослідженні?
- Які основні ферментативні властивості розрізняють у бактерій родини Enterobacteriaceae?
- Як організовано комплексну систему диференціації бактерій у сучасній лабораторії?
- Яке значення має колір і морфологія колоній при інтерпретації?
- Які обмеження стандартних біохімічних тестів? Які перспективи ідентифікації за допомогою мас-спектрометрії?

Методи: показ схем, обговорення практичних ситуацій у малих групах, інтерпретація реальних фото чашок з різними типами росту. групова робота, аналіз протоколів тестів, практична інтерпретація результатів реальних лабораторних карт.

Теми доповідей/рефератів

1. «Класичні й сучасні методи виділення чистої культури в мікробіології»
2. «Роль ідентифікації чистих культур у сучасній клінічній практиці»
3. «Анаеростат: принципи роботи, переваги та перспективи для практики стоматолога»
4. «Значення отримання чистих культур у контролі антибіотикорезистентності»
5. «Біохімічна ідентифікація грамнегативних паличок у клінічній бактеріології»
6. «Стандарти та алгоритми використання диференціальних середовищ у сучасній мікробіологічній лабораторії»
7. «MALDI-TOF як революція в ідентифікації бактерій: переваги, роль і обмеження»
8. «Автоматизовані тест-системи (API, Vitek тощо) та їх значення для рутинної лабораторної діагностики»

3. Формування професійних вмінь та практичних навичок

- Робота з чашками Петрі: виконання штрихового і глибокого посіву
- Виділення чистих колоній з мікробної асоціації: пересівання ізолюваної колонії
- Проведення обліку росту та опис морфології колоній
- Створення анаеробних умов (закриті банки, пакети, анаеростат, тіогліколятний бульйон)
- Правила асептики при роботі з клінічним матеріалом і культурами
- Виконання стандартних біохімічних тестів (індол, уреаза, каталазна, оксидазна проби, ферментація цукрів)
- Інтерпретація результатів на диференціальних середовищах
- Опис кольору, консистенції, запаху та морфології колоній

- Робота з сучасними тест-системами API (ознайомлення, інтерпретація результатів)
- Застосування MALDI-TOF (пояснення методики, розбір спектра)

4. Підведення підсумків

- Обговорення типових помилок при виділенні чистих культур
- Значення чистих культур для мікробіологічної діагностики
- Інтеграція знань із суміжних тем (морфологія, фізіологія, фарбування)
- Оцінювання виконаних практичних робіт
- Завдання для самостійної роботи: скласти пам'ятку для молодого лікаря «Правила виділення чистої культури у клінічній лабораторії»
- Роль біохімічних та культуральних властивостей для ідентифікації та клінічного діагнозу
- Визначення тактики діагностики: з чого почати, які тести пріоритетні?
- Розбір типових помилок у постановці/інтерпретації тестів
- Відповіді на питання здобувачів, поточний контроль

Список рекомендованої літератури

Основна:

1. Ширококов В.П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія. — Вінниця: Нова Книга, 2021.
2. Лабораторна діагностика інфекційних хвороб: посібник / В.В. Бондаренко, О.В. Мартиненко. — Харків: Основа, 2021.
3. Клінічна лабораторна діагностика: підручник / За ред. Є.О. Коваленка. — Київ: Медицина, 2020.

Додаткова:

1. Cappuccino J.G., Sherman N. Microbiology: A Laboratory Manual, 12th ed. — Pearson, 2021.
2. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Microbiology (10th ed.), McGraw-Hill, 2021.
3. MacFaddin J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 4th Edition, Wolters Kluwer, 2022.

Електронні ресурси:

1. CDC Microbiology Resources: <https://www.cdc.gov/labs>
2. Microbe World — Laboratory Techniques: <https://www.microbeworld.org>
3. PubMed — Bacterial Isolation: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Khan Academy — Microbial Growth: <https://www.khanacademy.org>

ТЕМА

«Фаги. Генетика мікроорганізмів. Молекулярно-генетичні методи дослідження. Мікробіологічні основи антимікробної хіміотерапії та антисептики»

Мета:

Знання: засвоїти будову та класифікацію бактеріофагів, механізми літичного та лізогенного циклів, основи генетики бактерій (хромосома, плазмід, мутації, рекомбінації). Засвоїти принципи та типи молекулярно-генетичних методів (ПЛР, секвенування, гібридизація, FISH), їхнє застосування в діагностиці інфекційних захворювань. Засвоїти класифікацію антимікробних засобів (антибіотики, антисептики, дезінфектанти), механізми дії, спектр активності, основні групи антибіотиків.

Розуміння: пояснити роль фагів у горизонтальному переносі генів, механізми трансдукції, трансформації, кон'югації, значення генетичної мінливості для еволюції та антибіотикорезистентності. Пояснити переваги молекулярних методів над культуральними, механізми ампліфікації ДНК, принципи детекції продуктів ПЛР. Пояснити механізми антибіотикорезистентності, принципи раціонального використання антибіотиків, різницю між бактерицидною та бактеріостатичною дією.

Застосування: використовувати знання про фаги для розуміння фаготипування в епідеміології, застосування фагів у терапії інфекцій. Використовувати знання про ПЛР для розуміння діагностики важкокультивованих та некультивованих мікроорганізмів у медичній практиці. Застосовувати знання про антибіотики для вибору емпіричної терапії, інтерпретувати антибіотикограми.

Аналіз: порівнювати механізми генетичної мінливості бактерій, аналізувати переваги та недоліки фаготерапії. Порівнювати чутливість та специфічність різних молекулярних методів, аналізувати показання до їхнього застосування. Аналізувати причини розвитку та розповсюдження антибіотикорезистентності, порівнювати ефективність різних груп антибіотиків.

Синтез: інтегрувати знання про генетику для розуміння походження антибіотикорезистентності та механізмів її розповсюдження. Інтегрувати молекулярні методи в загальний алгоритм мікробіологічної діагностики. Інтегрувати знання про фармакокінетику та фармакодинаміку для оптимізації антибіотикотерапії в усіх галузях медицини.

Оцінювання: обґрунтовувати потенціал фаготерапії як альтернативи антибіотикам, оцінювати ризики горизонтального переносу генів резистентності. Обґрунтовувати вибір молекулярного методу для діагностики конкретної інфекції. Оцінювати обмеження та можливі помилки. Обґрунтовувати вибір антибіотика для конкретної клінічної ситуації, оцінювати доцільність призначення антибіотикопрофілактики.

Основні поняття (перелік питань):

- Бактеріофаг: структура (голівка, хвіст, білки), класифікація (ДНК/РНК-фаги, віруленті/помірні)
- Літичний цикл: адсорбція, проникнення, реплікація, збірка, лізис
- Лізогенний цикл: інтеграція профагу, лізогенна конверсія, індукція
- Генетика бактерій: хромосома (кільцева ДНК), плазмід (R-, F-, Col-плазмід)
- Мутації: спонтанні, індуковані, точкові, делеції, інсерції
- Горизонтальний перенос генів: трансформація, трансдукція, кон'югація
- Фаготипування: епідеміологічний маркер

- Фаготерапія: використання фагів для лікування бактеріальних інфекцій
- Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): принцип, етапи (денатурація, відпал праймерів, елонгація), ПЛР у реальному часі (Real-time PCR)
- Праймери: специфічні олігонуклеотиди, дизайн праймерів
- Таq-полімераза: термостабільний фермент
- Секвенування: методи Сенгера, NGS (секвенування нового покоління), метагеномне секвенування
- Гібридизація нуклеїнових кислот: Southern blot, Northern blot, dot-blot
- FISH (флуоресцентна in situ гібридизація): виявлення мікроорганізмів у зразках
- Мультиплексна ПЛР: одночасне виявлення декількох патогенів

ПЛАН

1. Контроль опорного рівня знань

Тестові завдання («=» - правильна відповідь):

В ході експерименту було продемонстровано підвищення активності β -галактозидази після внесення лактози до культурального середовища з *E.coli*. Яка ділянка лактозного оперону стає розблокованою від репресору за цих умов?

- =Оператор
- ~Регуляторний ген
- ~Промотор
- ~Структурний ген
- ~Праймер

Генні мутації з'являються в результаті

- =заміни пар основ
- ~переміщення Is-последовностей
- ~переміщення транспозонів
- ~вставки основ
- ~випадань пар основ

Генотипова мінливість спостерігається в результаті?

- =мутацій
- ~утворення форм бактерій, що фільтруються
- ~дисоціацій
- ~ферментативної мінливості
- ~модифікації

ДНК, що містить генетичну інформацію локалізована в

- =нуклеоїді
- ~мітохондріях
- ~амінокислотах
- ~дезоксирібозі
- ~в усіх перерахованих

Передача ДНК від бактерій-донора до бактерії-реципієнта за участю бактеріофага, називається:

- =трансдукція
- ~транслокація
- ~дисоціація
- ~кон'югація
- ~трансформація

Під час тривалого лікування інфекційного хворого пеніциліном патоген трансформувався в L-форму. Які зміни відбуваються в клітині збудника в разі L-трансформації?

- =Відсутність клітинної стінки
- ~Відсутність джгутиків
- ~Відсутність капсули
- ~Відсутність спор
- ~Відсутність включень

Процес переходу бактерій з S в R-форму і назад, називається?

- =дисоціація
- ~репарація
- ~рекомбінація
- ~трансдукція
- ~трансформація

Синтез статевих ворсинок контролюється

- =F-плазмідною
- ~H_{ly} - плазмідною
- ~Ent-плазмідною
- ~Col-плазмідною
- ~R-плазмідною

У бактерій встановлений процес кон'югації, при якому між бактеріями утворюється цитоплазматичний місток, по якому з клітини-донора до клітини-реципієнта надходять плазмиди і фрагменти молекули ДНК. Яке значення цього процесу?

- =Забезпечує обмін генетичного матеріалу
- ~Забезпечує обмін речовинами між клітинами
- ~Сприяє активізації мутаційного процесу
- ~Підвищує гетерозиготність
- ~Ліквідує небажані мутації

У клініці мали місце випадки госпітальної стафілокової інфекції, викликані штамами, які характеризувалися множинною лікарською стійкістю. Така ознака визначається наявністю

- =R -плазмид
- ~Екзотоксигенів
- ~F -плазмид
- ~Вірулентних бактеріофагів
- ~Помірних бактеріофагів

Біочіпи дозволяють виявити

- =Всі перераховані
- ~Варіанти мікробів, стійких до лікарських засобів
- ~Віруси
- ~Сприйнятливості до раку та спадкових захворювань
- ~Бактерії

Для швидкої діагностики багатьох бактеріальних, вірусних, протозойних і грибкових захворювань, виявлення збудників хвороб у довкіллі, харчових продуктах і воді з успіхом використовується реакція, принцип якої полягає в багатократному копіюванні специфічної ділянки ДНК або окремого гена за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Назвіть цю реакцію

АПолімеразна ланцюгова реакція

~Реакція ензиммічених антитіл

~Реакція імуофлуоресценції

~Імуноферментний аналіз

~Радіоіммунний аналіз

До лікаря звернувся хворий 30 років з вірогідною ВІЛ інфекцією. Для уточнення діагнозу лікар запропонував провести полімеразну ланцюгову реакцію. Основним процесом у цьому дослідженні є

=Ампліфікація генів

~Генетична рекомбінація

~Генна мутація

~Хромосомна мутація

~Транскрипція

Праймер для ПЛР є

=20-30 послідовностей нуклеотидів

~Нуклеотидний триплет

~Полісахарид з молекулярною масою більше одного кілодальтона

~Пептидний ланцюг з 20-30 амінокислот

~Високомолекулярний білок

~Високомолекулярний білок

При проведенні лабораторної діагностики гепатиту В визначають наявність вірусної ДНК в сироватці крові хворого. За допомогою якого арбітражного (референс) метода це встановлюють?

=Метод полімеразної ланцюгової реакції

~Метод гібридизації

~Метод ІФА-діагностики

~Метод лігазної ланцюгової реакції

~Метод гібридизації з посиленням сигналу

Антибіотики застосовуються для

=Неспецифічне етіотропне лікування

~Симптоматична терапія

~Специфічне етіотропне лікування

~Патогенетична терапія

~Специфічна профілактика

В науковій лабораторії в експерименті на тваринах вивчається нешкідливість нового антибіотика. При цьому визначається співвідношення мінімальної діючої і максимальної переносимої доз препарату. Як називається величина, що визначається?

=Хіміотерапевтичний індекс

~Титр

~Концентрація, що пригнічує

~Серійне розведення

~Мікробне число

Для лікування урогенітальних інфекцій використовують хінолони - інгібітори ферменту ДНК-гірази. Який процес порушується під дією хінолонів у першу чергу?

=Реплікація ДНК

~Зворотна транскрипція

~Ампліфікація генів

- ~Репарація ДНК
- ~Рекомбінація генів

Для лікування інфекційних захворювань використовують наступні антибіотики (стрептоміцин, еритроміцин, хлорамфенікол). Який етап синтезу білків вони інгібують?

- =Трансляція
- ~Реплікація
- ~Процесинг
- ~Сплайсинг
- ~Транскрипція

Лікарі-інфекціоністи широко застосовують антибіотики, які інгібують синтез нуклеїнових кислот. Який етап біосинтезу гальмує рифампіцин?

- =Ініціація транскрипції в прокаріотах
- ~Сплайсинг у прокаріотах і еукаріотах
- ~Реплікація в прокаріотах
- ~Транскрипція в прокаріотах і еукаріотах
- ~Термінація транскрипції в прокаріотах і еукаріотах

Призначення доксицикліну гідрохлориду викликало порушення симбіозу мікробної флори в кишечнику. Визначити тип порушень при антибіотикотерапії

- =Дисбактеріоз
- ~Суперінфекція
- ~Сенсибілізація
- ~Ідіосинкразія
- ~Бактеріоз

У пацієнта з пієлонефритом із сечі виділено синьогнійну паличку, яка виявилась чутливою до гентаміцину при концентрації його в сечі 2 мкг/мл. Який метод дослідження дозволив встановити мінімальну пригнічуючу ріст мікроба концентрацію (МПК) антибіотика?

- =Серійних розведень антибіотика
- ~Серійних розведень сечі
- ~Серійних розведень збудника
- ~Паперових дисків, змочених сечею
- ~Паперових дисків, змочених антибіотиками

Хіміотерапевтичний засіб бактерицидно діє на стрептококи, стафілококи, бацили та клостридії. За спектром дії цей препарат належить до наступної групи?

- =Антибактеріальні препарати широкого спектру дії
- ~Протитуберкульозні препарати
- ~Противірусні препарати
- ~Протигрибкові препарати широкого спектру дії
- ~Антибактеріальні препарати вузького спектру дії

Клінічна ситуація 1:

У дослідженні виділено штамп *Staphylococcus aureus*, резистентний до метициліну (MRSA). При аналізі виявлено, що ген резистентності *mecA* розташований на плазміді, яка може передаватися іншим стафілококам.

Питання: Який механізм розповсюдження резистентності (кон'югація через R-плазмід)? Яке епідеміологічне значення? Як це впливає на вибір лікування?

Клінічна ситуація 2:

При спалаху харчової токсикоінфекції, викликаній *Salmonella*, епідеміологи використовували фаготипування для встановлення джерела інфекції.

Питання: Що таке фаготипування? Як воно допомагає в епідеміологічному розслідуванні? Які обмеження методу?

Клінічна ситуація 3:

При підозрі на туберкульоз порожнини рота взято біопсію виразки. Мікроскопія за Цілем-Нільсеном негативна, культура буде готова через 6-8 тижнів. Призначено ПЛР-дослідження (GeneXpert MTB/RIF).

Питання: Які переваги GeneXpert (швидкість 2 год, виявлення резистентності до рифампіцину)? Яка чутливість методу порівняно з мікроскопією та культурою? Як це впливає на тактику лікування?

Клінічна ситуація 4:

Пацієнт опікового відділення з множинними опіками 2-3 ступеню має прояви інфекування раньової поверхні з виділенням гною синьо-зеленого кольору та специфічним фруктовим ароматом. Емпірично призначено амоксицилін/клавуланат 875/125 мг двічі на добу. Через 3 дні покращення відсутнє, отримано результати культивування - виділено *Pseudomonas aeruginosa*, резистентна до пеніциліну.

Питання: Чому амоксицилін/клавуланат неефективний (*Pseudomonas* продукує β -лактамази)? Який антибіотик слід призначити (карбапенеми, цефалоспорины)? Яке значення антибіотикограми?

Письмова робота:

Створити схему літичного та лізогенного циклів бактеріофага з позначенням етапів і часових рамок.

Створити схему етапів ПЛР з позначенням температур та часових інтервалів для кожного етапу.

Створити таблицю: «Основні групи антибіотиків у медичній практиці» (механізм дії, спектр, показання, побічні ефекти).

2. Обговорення теоретичних питань для перевірки базових знань за темою

Питання для обговорення:

1. Охарактеризуйте будову бактеріофагів: голівка (капсид з ДНК або РНК), хвіст (контракtilьний апарат), базальна пластинка, хвостові фібрили. Яка роль кожної структури?

2. Опишіть класифікацію фагів: за типом нуклеїнової кислоти (ДНК/РНК), за формою (ниткоподібні, ікосаедричні, складні), за характером взаємодії з бактерією (віруленті/помірні).

3. Поясніть літичний цикл: адсорбція (специфічне зв'язування з рецепторами) → проникнення (ін'єкція ДНК) → реплікація фагового геному → синтез фагових білків → збірка нових фагів → лізис клітини ферментами (лізоцим). Скільки нових фагів утворюється?

4. Охарактеризуйте лізогенний цикл: інтеграція ДНК фага в хромосому бактерії (профаг) → реплікація разом з бактеріальною ДНК → передача дочірнім клітинам → індукція (УФ, хімічні агенти) → перехід у літичний цикл.

5. Що таке лізогенна конверсія? Приклади: токсигенність *Corynebacterium diphtheriae* (дифтерійний токсин кодується профагом), продукція ерिटрогенного токсину *Streptococcus* та антибіотикорезистентності?

6. Опишіть генетичний апарат бактерій: одна кільцева хромосома (3-5 млн пар основ), плазмід (невеликі кільцеві ДНК, 1-200 т.п.о.), автономна реплікація плазмід.
7. Охарактеризуйте типи плазмід: R-плазмід (резистентність до антибіотиків), F-плазмід (фертильність, кон'югація), Col-плазмід (коліцини — бактеріоцини), вірулентні плазмід (токсини, адгезини).
8. Поясніть типи мутацій: спонтанні (помилки реплікації, $\sim 10^{-6}$ - 10^{-8}), індуковані (УФ, хімічні мутагени), точкові (заміна нуклеотиду), делеції, інсерції, інверсії. Яке значення мутацій для еволюції?
9. Механізми горизонтального переносу генів:
- а. трансформація: поглинання вільної ДНК з середовища (природна компетентність)
 - б. трансдукція: перенос бактеріальної ДНК за допомогою фагів (специфічна/неспецифічна)
 - в. кон'югація: передача ДНК через пілі (F-плазмід, Hfr-штами)
10. Яке значення горизонтального переносу генів для розповсюдження антибіотикорезистентності? Як R-плазмід можуть передаватися між різними видами бактерій?
11. Що таке фаготипування? Використання специфічних фагів для диференціації штамів одного виду, епідеміологічне маркування, відстеження спалахів інфекцій.
12. Охарактеризуйте фаготерапію: історія (Д'Ерель, 1917), переваги (специфічність, саморепродукція, відсутність токсичності), недоліки (вузька специфічність, розвиток резистентності, регуляторні проблеми), сучасне відродження інтересу в епоху антибіотикорезистентності.
13. Охарактеризуйте принцип полімеразної ланцюгової реакції: експоненціальна ампліфікація специфічної ділянки ДНК *in vitro*, 2^n копій після *n* циклів (теоретично $2^{35} \approx 34$ млрд копій після 35 циклів).
14. Опишіть компоненти реакційної суміші ПЛР: матрична ДНК, праймери (прямий та зворотний), Taq-полімераза, дезоксирибонуклеотиди (dNTP), буферний розчин з Mg^{2+} .
15. Поясніть три етапи кожного циклу ПЛР:
- а. Денатурація (94-96°C, 15-30 сек): розплетення подвійної спіралі ДНК
 - б. Відпал праймерів (50-65°C, 20-40 сек): зв'язування праймерів з комплементарними ділянками
 - в. Елонгація (72°C, 1-2 хв): синтез нової ланки ДНК полімеразою
16. Охарактеризуйте Taq-полімеразу: виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, термостабільна (витримує 95°C), оптимум активності 72°C, не потребує заміни після кожного циклу.
17. Що таке праймери? Короткі одноланцюгові олігонуклеотиди (18-25 н.о.), комплементарні до флангуючих ділянок мішені, визначають специфічність ПЛР, дизайн праймерів критичний для успіху.
18. Опишіть детекцію продуктів ПЛР: електрофорез в агарозному гелі (візуалізація під УФ після забарвлення бромистим етидієм), визначення розміру ампліконів, порівняння з маркерами молекулярної маси.
19. Охарактеризуйте ПЛР у реальному часі (Real-time PCR, qPCR): детекція флуоресцентного сигналу під час реакції, кількісна оцінка початкової кількості ДНК, порогові цикли (*C_t*-значення), використання для вимірювання вірусного навантаження.
20. Поясніть принципи секвенування: метод Сенгера (дидезоксинуклеотиди, капілярний електрофорез), NGS (секвенування нового покоління — паралельне

секвенування мільйонів фрагментів), метагеномне секвенування (аналіз усієї мікробіоти без культивування).

21. Які переваги молекулярних методів: швидкість (години vs дні/тижні), чутливість (виявлення одиничних копій), специфічність (таргетування унікальних генів), можливість виявлення некультивованих мікроорганізмів, кількісна оцінка?

22. Охарактеризуйте класифікацію антимікробних засобів: антибіотики (селективна токсичність для мікроорганізмів), антисептики (застосування на тканинах), дезінфектанти (застосування на неживих поверхнях).

23. Опишіть механізми дії антибіотиків:

- a. Інгібування синтезу клітинної стінки (β -лактами, ванкоміцин)
- b. Порушення функції цитоплазматичної мембрани (поліміксини, даптоміцин)
- c. Інгібування синтезу білків (макроліди, тетрацикліни, аміноглікозиди, хлорамфенікол)
- d. Інгібування синтезу нуклеїнових кислот (фторхінолони, рифампіцин)
- e. Інгібування метаболізму фолатів (сульфаніламід, триметоприм)

24. Поясніть різницю між бактерицидною та бактеріостатичною дією: бактерициди вбивають бактерії (β -лактами, фторхінолони, аміноглікозиди, метронідазол), бактеріостатики пригнічують ріст (макроліди, тетрацикліни, хлорамфенікол). Клінічне значення для імунокомпрометованих пацієнтів.

25. Охарактеризуйте β -лактамі антибіотики:

- a. Пеніциліни: природні (бензилпеніцилін), напівсинтетичні (амоксацилін, амоксацилін/клавуланат)
- b. Цефалоспорины: покоління I-V, розширення спектру
- c. Карбапенеми: широкий спектр, резервні препарати (імідженем, меропенем)

26. Опишіть механізм дії β -лактамі: зв'язування з пеніцилін-зв'язувальними білками (PBP), інгібування транспептидази, порушення синтезу пептидоглікану, активація автолітичних ферментів, лізис клітини.

27. Охарактеризуйте макроліди: еритроміцин, азитроміцин, кларитроміцин, механізм дії (зв'язування з 50S субодиницею рибосоми), спектр (грампозитивні коки, атипівні збудники), використання при алергії на β -лактами.

28. Поясніть роль метронідазолу в стоматології: антианаеробна активність (облігатні анаероби), механізм дії (відновлення нітрогрупи $\rightarrow$ пошкодження ДНК), показання (одонтогенні абсцеси, гінгівіт Венсана, періодонтит, періімплантит).

29. Охарактеризуйте фторхінолони: ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, механізм дії (інгібування ДНК-гірази та топоізомерази IV), широкий спектр, обмежене використання в стоматології (резервні препарати).

30. Опишіть механізми антибіотикорезистентності:

- a. Ферментативна інактивація (β -лактамази, аміноглікозид-модифікуючі ферменти)
- b. Модифікація мішеней (змінені PBP у MRSA, рибосоми)
- c. Зниження проникності (порини)
- d. Ефлюксні помпи (виведення антибіотика з клітини)

31. Що таке β -лактамази? Ферменти, що гідролізують β -лактамі кільце, типи (пеніцилінази, ESBL, карбапенемази), клінічне значення, інгібітори β -лактамаз (клавуланова кислота, тазобактам, сульбактам).

32. Охарактеризуйте MRSA (метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus*): механізм резистентності (ген *mecA* кодує змінений PBP2a), епідеміологія (госпітальні та позагоспітальні штами), лікування (ванкоміцин, лінезолід, даптоміцин).

33. Опишіть методи визначення антибіотикочутливості:

34. Метод дисків (Кірбі-Бауера): вимірювання зони інгібування

35. Е-тест: градієнт концентрації антибіотика, визначення МІК

36. Автоматизовані системи (Vitek): швидке визначення МІК

37. Молекулярні методи: виявлення генів резистентності (*mecA*, *blaKPC*)

38. Поясніть принципи раціонального використання антибіотиків:

a. Обґрунтовані показання (бактеріальна інфекція, не вірусна)

b. Вибір оптимального препарату (спектр, фармакокінетика)

c. Адекватна доза та тривалість

d. Моніторинг ефективності

e. Уникнення профілактичного використання без показання

Методи обговорення:

- Інтерактивна лекція з демонстрацією електронних мікрофотографій фагів
- Інтерактивна лекція з демонстрацією відео про ПЛР
- Інтерактивна лекція з демонстрацією механізмів дії антибіотиків (анімації)
- Робота в малих групах: порівняння літичного та лізогенного циклів
- Робота в малих групах: інтерпретація антибіотикограм
- Дискусія про перспективи фаготерапії у медичній практиці
- Дискусія про проблему антибіотикорезистентності та стратегії протидії
- Практична демонстрація термоциклера та електрофорезу (якщо доступно)
- Аналіз клінічних випадків: інтерпретація результатів ПЛР-діагностики
- Case-based learning: розбір клінічних випадків розповсюдження резистентності
- Case-based learning: вибір антибіотика для різних інфекцій

Теми доповідей/рефератів

1. **Бактеріофаги: від відкриття до сучасного застосування** — історія відкриття (Туорт, Д'Ерель), роль у біології (модельні системи молекулярної біології), використання у біотехнології (фаговий дисплей), перспективи фаготерапії.

2. **Лізогенна конверсія та її роль у вірулентності бактерій** — механізми інтеграції профагів, приклади токсинів, що кодуються профагами (дифтерійний токсин, шига-токсин, ерритогенний токсин), еволюційне значення лізогенії.

3. **Горизонтальний перенос генів та еволюція антибіотикорезистентності** — механізми трансформації, трансдукції, кон'югації, R-плазмиди як вектори резистентності, інтегрони та транспозони, стратегії протидії розповсюдженню резистентності.

4. **Фаготерапія: ренесанс забутого методу лікування** — історія фаготерапії, сучасні клінічні дослідження, переваги та недоліки порівняно з антибіотиками, регуляторні виклики, персоналізована фаготерапія.

5. **CRISPR-Cas системи: природний імунітет бактерій та революція в генній інженерії** — відкриття CRISPR як адаптивного імунітету проти фагів, механізм дії, використання в генній інженерії (редагування геному), потенціал для боротьби з антибіотикорезистентністю.

6. **ПЛР-діагностика в сучасній медичній практиці: від теорії до практики** — застосування ПЛР для виявлення бактеріальних та вірусних патогенів, кількісна оцінка

бактеріального/вірусного навантаження, моніторинг ефективності лікування, комерційні тест-системи.

7. **GeneXpert: революція в діагностиці туберкульозу** — принцип роботи (автоматизована ПЛР в картриджах), виявлення *M. tuberculosis* та резистентності до рифампіцину за 2 години, клінічне значення, застосування для екстрапульмонарного туберкульозу.

8. **Антибіотикорезистентність: глобальна загроза здоров'ю** — епідеміологія резистентності, економічний тягар, прогнози ВООЗ (10 млн смертей на рік до 2050), механізми розповсюдження, стратегії протидії (антибіотична політика, інфекційний контроль, розробка нових антибіотиків).

9. **Місцеве застосування антибіотиків** — системи доставки (гелі, волокна, чіпи з міноцикліном, доксицикліном, метронідазолом), ефективність як ад'юванта до механічного лікування, переваги (висока локальна концентрація, мінімальні побічні ефекти), обмеження.

10. **Антисептики в хірургії - хлоргексидин, повідон-йод, перекис водню** — механізми дії, спектр активності, показання, побічні ефекти, порівняння ефективності.

Примітка: При підготовці рефератів рекомендується використовувати історичні дані, сучасні клінічні дослідження, електронні мікрофотографії, дані ВООЗ, CDC, ECDC про резистентність.

3. Формування професійних вмінь та практичних навичок

Практичні навички:

1. **Визначення літичної активності фагів** — метод Грація (титрування фагів методом агарових шарів), підрахунок бляшок лізису, визначення титру фагів (БУО/мл).

2. **Фаготипування бактеріальних культур** — нанесення стандартних фагів на газон бактерій, облік результатів (наявність/відсутність лізису), інтерпретація фаготипу.

3. **Інтерпретація результатів генетичних досліджень** — аналіз патернів резистентності, розуміння механізмів переносу генів, епідеміологічна інтерпретація.

4. **Розуміння принципів фаготерапії** — вибір фагів для лікування конкретної інфекції, оцінка чутливості бактерій до фагів, протоколи застосування.

5. **Розпізнавання специфічних смуг ампліконів**, порівняння з маркерами молекулярної маси, оцінка контрольних зразків.

6. **Клінічна інтерпретація молекулярних тестів** — розуміння клінічної значущості позитивних/негативних результатів, кореляція з клінікою, моніторинг ефективності лікування.

7. **Інтерпретація антибіотикограм** — метод дисків (вимірювання діаметрів зон інгібування), визначення чутливості (S — чутливий, I — проміжний, R — резистентний), вибір оптимального антибіотика.

8. **Визначення МІК (мінімальної інгібуючої концентрації)** — принцип методу розведень, Е-тест, інтерпретація результатів ($МІК \leq$ критичної концентрації А чутливий).

9. **Вибір емпіричної антибіотикотерапії** — оцінка клінічної ситуації (локалізація, тяжкість), передбачувана мікрофлора, вибір антибіотика широкого спектру, корекція після отримання антибіотикограми.

Алгоритм роботи:

- Демонстрація титрування фагів методом Грація (відео або практична демонстрація)
- Робота з результатами фаготипування (інтерпретація паттернів)

- Електрофорез плазмідної ДНК (по фото або робота у віртуальній лабораторії)
- Розв'язання ситуаційних задач: вибір фагів для терапії
- Аналіз наукових статей про фаготерапію
- Демонстрація виділення ДНК з клінічного зразка (відео або практика)
- Робота з термоциклером (якщо доступний) або віртуальна лабораторія
- Інтерпретація фотографій гелів з результатами ПЛР
- Аналіз даних Real-time PCR (графіки, Ct-значення)
- Розв'язання ситуаційних задач: вибір молекулярного методу для діагностики
- Демонстрація методу дисків (постановка, інкубація, облік)
- Практична робота: вимірювання зон інгібування, інтерпретація за таблицями EUCAST/CLSI
- Розв'язання клінічних задач: вибір антибіотика для різних сценаріїв
- Рольова гра: консультування пацієнта щодо прийому антибіотиків
- Складання списку показань до антибіотикопрофілактики

Вимоги до оформлення:

Протокол повинен містити: опис методу, результати спостережень (фотографії бляшок лізису, гелів), розрахунки (титр фагів), інтерпретацію результатів, висновки. Опис методу, умови проведення ПЛР (температури, час), фотографії гелів або графіки ампліфікації, інтерпретацію результатів, клінічні висновки. Протокол повинен містити: опис клінічного випадку, передбачувану мікрофлору, обґрунтування вибору антибіотика, дозу та тривалість, моніторинг ефективності, інтерпретацію антибіотикограми (якщо доступна).

Контроль заключного етапу:

- Тестування
- Практичне завдання: інтерпретація результатів фаготипування
- Ситуаційні задачі: механізми розповсюдження антибіотикорезистентності

4. Підведення підсумків

- Узагальнення знань про бактеріофаги та їхню роль у природі та медицині
- Акцент на значенні генетичної мінливості для еволюції та антибіотикорезистентності
- Обговорення перспектив фаготерапії в епоху антибіотикорезистентності
- Узагальнення знань про молекулярно-генетичні методи
- Акцент на практичному застосуванні в сучасній діагностиці інфекцій
- Обговорення переваг та обмежень молекулярних методів
- Перспективи персоналізованої медицини на основі метагеноміки
- Узагальнення знань про антимікробні засоби та їхнє застосування, форми випуску антибактеріальних препаратів
- Акцент на проблемі антибіотикорезистентності та раціональному використанні
- Обговорення показань до антибіотикопрофілактики
- Важливість інтерпретації антибіотикограм
- Відповіді на запитання здобувачів
- Оцінювання роботи здобувачів

- Завдання для самостійної роботи: скласти алгоритм вибору антибіотика при різноманітних інфекціях

Список рекомендованої літератури

Основна:

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник / За ред. В.П. Широбокова. — Вінниця: Нова Книга, 2021. — 952 с.
2. Молекулярна біологія та генетика: підручник / За ред. В.О. Кордюма. — Київ: Вища школа, 2020. — 648 с.
3. Клінічна фармакологія: підручник / За ред. О.Я. Бабака. — Київ: Медицина, 2020. — 784 с.

Додаткова:

1. Summers W.C. Bacteriophage therapy. — Annual Review of Microbiology, 2021; 55: 437-451.
2. Loc-Carrillo C., Abedon S.T. Pros and cons of phage therapy. — Bacteriophage, 2021; 1(2): 111-114.
3. Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. — Clinical Microbiology Reviews, 2022; 32(2): e00066-18.
4. von Wintersdorff C.J., Penders J., van Niekerk J.M. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. — Frontiers in Microbiology, 2022; 7: 173.

Електронні інформаційні ресурси:

1. Phage Directory: <https://phage.directory> — база даних фаготерапевтичних центрів
2. Phage Therapy Center: <https://www.phagetherapycenter.com> — клінічна інформація
3. PubMed — Bacteriophage Therapy: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Nature Reviews Microbiology — Phage Collection: <https://www.nature.com/nrmicro>
5. WHO Antimicrobial Resistance: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
6. CDC Antibiotic Resistance: <https://www.cdc.gov/drugresistance>
7. EUCAST — Breakpoint Tables: <https://www.eucast.org>
8. ADA Antibiotic Stewardship: <https://www.ada.org/antibiotics>

ТЕМА

«Відпрацювання алгоритму діагностики в загальній мікробіології»

Мета:

Знання: засвоїти етапи мікробіологічної діагностики (забір матеріалу, мікроскопія, культивування, ідентифікація, антибіотикограма), показання до різних методів.

Розуміння: пояснити логіку алгоритму діагностики, інтеграцію класичних та молекулярних методів, значення швидкої діагностики для клінічного результату.

Застосування: застосовувати алгоритми діагностики для різних типів інфекцій у медичній практиці.

Аналіз: аналізувати результати комплексного мікробіологічного дослідження, порівнювати ефективність різних підходів до діагностики.

Синтез: інтегрувати клінічні дані, мікроскопію, культуру, молекулярні методи для встановлення етіологічного діагнозу.

Оцінювання: обґрунтовувати вибір методів діагностики та інтерпретацію результатів, оцінювати клінічну значущість виділених мікроорганізмів.

Основні поняття (перелік питань):

- Етапи мікробіологічної діагностики: забір матеріалу, транспортування, мікроскопія, культивування, ідентифікація, антибіотикограма
- Правила забору клінічного матеріалу: асептика, оптимальний час, адекватний об'єм, правильне транспортування
- Первинна мікроскопія: орієнтовна інформація (форма, забарвлення за Грамом), швидкість
- Селективні та диференціальні середовища: вибір залежно від передбачуваного збудника
- Ідентифікація: морфологічні, культуральні, біохімічні, молекулярні методи
- Інтерпретація результатів: клінічна значущість, контамінація, колонізація vs інфекція
- Інтеграція методів: класичні + молекулярні
- Часові рамки: мікроскопія (години), культура (дні), молекулярні методи (години)

ПЛАН

1. Контроль опорного рівня знань

Клінічна ситуація 1:

Пацієнт з гострим паратонзиллярним абсцесом. Лікар аспірував гній, але помістив його у сухий стерильний контейнер і доставив до лабораторії через 6 годин. Культура виявилася негативною.

Питання: Які помилки допущено (анаероби загинули через контакт з киснем, затримка доставки)? Як правильно забрати та транспортувати матеріал? Яке значення правильного забору для результату?

Клінічна ситуація 2:

При мікроскопії мазка з мигдаликів виявлено грамнегативні палички та спірохети. Культура на кров'яному агарі дала ріст лише стафілококів.

Питання: Чому культура не відображає справжню мікробіоту (облігатні анаероби та спірохети не ростуть на звичайному кров'яному агарі на повітрі)? Які середовища та умови потрібні? Яка роль ПЛР-діагностики?

Письмова робота:

Скласти блок-схему: «Алгоритм мікробіологічної діагностики кишкової інфекції» від забору матеріалу до остаточного звіту.

2. Обговорення теоретичних питань для перевірки базових знань за темою **Питання для обговорення:**

1. Охарактеризуйте етапи мікробіологічної діагностики:
 - Преаналітичний: забір матеріалу, транспортування
 - Аналітичний: мікроскопія, культивування, ідентифікація, антибіотикограма
 - Постаналітичний: інтерпретація, звіт, клінічна кореляція
2. Опишіть правила забору клінічного матеріалу:
 - Асептична техніка (уникнення контамінації)
 - Оптимальний час (до початку антибіотикотерапії)
 - Адекватний об'єм (достатній для всіх досліджень)
 - Правильний контейнер (анаеробні умови для анаеробів)
 - Швидке транспортування (або транспортні середовища)
3. Поясніть значення первинної мікроскопії:
 - Швидка орієнтовна інформація (години)
 - Форма бактерій (коки, палички, спірали)
 - Забарвлення за Грамом (грампозитивні/грамнегативні)
 - Наявність лейкоцитів (запалення)
 - Попередній вибір середовищ для культивування
 - Контроль якості матеріалу (достатність, контамінація)
4. Охарактеризуйте вибір поживних середовищ:
 - Універсальні (кров'яний агар, шоколадний агар)
 - Селективні (манітол-сольовий агар для стафілококів, Ендо для ентеробактерій)
 - Диференціальні (кров'яний агар для гемолізу)
 - Анаеробні (середовище Вільсона-Блера, Кітта-Тароцці, тіогліколатний бульйон)
 - Спеціальні (для мікобактерій, грибів)
5. Опишіть методи ідентифікації:
 - Морфологічні (форма, розмір, забарвлення)
 - Культуральні (тип колоній, гемоліз, пігмент)
 - Біохімічні (ферментація цукрів, каталаза, оксидаза, індол, уреаз)
 - Серологічні (аглютинація, ІФА)
 - Молекулярні (ПЛР, секвенування, MALDI-TOF)
6. Поясніть визначення антибіотикочутливості:
 - Метод дисків (зони інгібування)
 - Визначення МІК (Е-тест, розведення)
 - Автоматизовані системи (Vitek)
 - Інтерпретація за критеріями EUCAST/CLSI
 - Виявлення специфічних механізмів резистентності (ESBL, карбапенемази)
7. Охарактеризуйте інтеграцію класичних та молекулярних методів:
 - Мікроскопія + ПЛР: швидка діагностика
 - Культура: життєздатні мікроорганізми, антибіотикограма
 - Молекулярні методи: важкокультивовані/некультивовані види
 - MALDI-TOF: швидка ідентифікація з колоній
 - Секвенування: точна ідентифікація, епідеміологія

8. Опишіть часові рамки діагностики:
 - Мікроскопія: 1-2 години
 - Попередній звіт після культивування: 18-24 години
 - Остаточна ідентифікація: 2-3 дні (бактерії), тижні (мікобактерії, гриби)
 - ПЛР: 4-6 годин
 - MALDI-TOF: хвилини після отримання колоній
 - Антибіотикограма: додатково 18-24 години
9. Поясніть інтерпретацію результатів:
 - Клінічна значущість: патоген vs коменсал/контамінант
 - Кількість виділеного мікроорганізму ($\geq 10^5$ КУО/мл — значуща бактеріурія)
 - Кореляція з клінікою (лихоманка, лейкоцитоз, локальні ознаки інфекції)
 - Змішана флора: яка роль кожного компонента?
 - Повторне виділення того ж мікроорганізму
10. Охарактеризуйте специфіку діагностики захворювань порожнини рота
 - Висока контамінація нормальною мікрофлорою порожнини рота
 - Переважно змішані інфекції (аероби + анаероби)
 - Складність культивування анаеробів
 - Роль ПЛР для пародонтопатогенів
 - Показання до антибіотикограми (важкі, рецидивуючі інфекції)
11. Опишіть алгоритм діагностики абсцесів різної локалізації:
 - Клінічна оцінка (локалізація, тяжкість, супутні захворювання)
 - Забір гною (асептично, шприцом, анаеробні умови)
 - Мікроскопія (Грам, форма)
 - Культура (кров'яний агар аеробно + анаеробно)
 - Ідентифікація (біохімічна, MALDI-TOF)
 - Антибіотикограма (при показаннях)
 - Звіт: клінічно значущі ізоляти, рекомендації

Методи обговорення:

- Інтерактивна лекція з демонстрацією алгоритмів діагностики
- Робота в малих групах: складання алгоритмів для різних інфекцій
- Case-based learning: розбір складних діагностичних випадків
- Практична демонстрація: від забору матеріалу до остаточного звіту

Теми доповідей/рефератів

1. **Преаналітичний етап мікробіологічної діагностики: типові помилки та їхній вплив на результат** — статистика помилок (60-70% на преаналітичному етапі), неправильний забір матеріалу, контамінація, затримка доставки, неадекватний об'єм, вплив на чутливість та специфічність діагностики.

2. **MALDI-TOF мас-спектрометрія: революція в ідентифікації мікроорганізмів** — принцип методу (іонізація білків лазером, детекція спектру мас), швидкість (хвилини), точність (видовий рівень), бази даних, обмеження (потребує культури), вартість, впровадження в рутинну практику.

3. **Діагностика урогенітальних інфекцій: від культури до метагеноміки** — традиційні методи (мікроскопія, культура анаеробів), комерційні ПЛР-тест-системи, секвенування 16S рРНК, метагеномне секвенування, клінічне значення кількісної оцінки, персоналізована терапія.

4. **Інтерпретація мікробіологічних результатів: від звіту лабораторії до клінічного рішення** — розуміння значущості виділених мікроорганізмів, критерії патогенності, відмінність колонізації від інфекції, множинні ізоляти (який лікувати?), кореляція з клінікою, комунікація між лабораторією та клініцистом.

5. **Контроль якості в мікробіологічній лабораторії** — зовнішній контроль якості (референс-штами, міжлабораторні порівняння), внутрішній контроль (контрольні зразки, валідація методів), акредитація, стандартизація (ISO 15189), документування, навчання персоналу.

***Примітка:** При підготовці рефератів рекомендується використовувати стандарти ISO, рекомендації EUCAST, клінічні випадки з практики.*

3. Формування професійних вмінь та практичних навичок

Практичні навички:

1. **Правильний забір клінічного матеріалу** — асептична техніка, вибір контейнера, оптимальний об'єм, маркування, заповнення напрямку (паспортні дані, клінічний діагноз, матеріал, дата забору).

2. **Первинна оцінка матеріалу** — макроскопічна оцінка (гній, кров, слина), достатність для дослідження, виготовлення мазка, забарвлення за Грамом, мікроскопія.

3. **Вибір середовищ для посіву** — залежно від передбачуваного збудника та результатів мікроскопії, інокуляція середовищ, інкубація (аеробні/анаеробні умови, температура, час).

4. **Інтерпретація росту на середовищах** — оцінка колоній (розмір, форма, колір, гемоліз), підрахунок (напівкількісна оцінка), відбір колоній для ідентифікації.

5. **Складання мікробіологічного звіту** — опис виділених мікроорганізмів, кількість, результати антибіотикограми, клінічна інтерпретація, рекомендації.

Алгоритм роботи:

- Практичні вправи: виготовлення мазків, забарвлення, мікроскопія
- Робота з культурами: посів, інкубація, облік росту
- Інтерпретація реальних лабораторних звітів
- Розв'язання комплексних діагностичних задач

Вимоги до оформлення:

Протокол повинен містити: клінічну інформацію, опис матеріалу, результати мікроскопії (зарисовки або фото), схему посіву, результати культивування (опис колоній), ідентифікацію, антибіотикограму, інтерпретацію, клінічні рекомендації.

Контроль заключного етапу:

- Інтерпретація лабораторних звітів з різних клінічних сценаріїв
- Тестування

4. Підведення підсумків

- Узагальнення знань про алгоритми мікробіологічної діагностики
- Акцент на важливості правильного преаналітичного етапу
- Інтеграція класичних та сучасних методів
- Клінічна інтерпретація результатів — ключ до успішного лікування
- Відповіді на запитання здобувачів
- Оцінювання роботи здобувачів

- Завдання для самостійної роботи: скласти алгоритми діагностики для 5 різних інфекцій

Список рекомендованої літератури

Основна:

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія / За ред. В.П. Широбокова. — Вінниця: Нова Книга, 2021. — 952 с.
2. Лабораторна діагностика інфекційних хвороб / В.В. Бондаренко, О.В. Мартиненко. — Харків: Основа, 2021. — 424 с.
3. Клінічна лабораторна діагностика / ред. Є.О. Коваленка. — Київ: Медицина, 2020. — 648 с.

Додаткова:

1. Miller J.M., Binnicker M.J., Campbell S. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. — Clinical Infectious Diseases, 2021; 67(6): e1-e94.
2. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. — Clinical Chemistry, 2022; 61(1): 100-111.
3. Garcia L.S. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th Edition. — ASM Press, 2021.

Електронні інформаційні ресурси:

1. ASM Clinical Microbiology: <https://www.asm.org/Division/Clinical-Microbiology-Division>
2. EUCAST Guidelines: <https://www.eucast.org> — стандарти антибіотикограм
3. CDC Laboratory Methods: <https://www.cdc.gov/laboratory>
4. ISO 15189 Medical Laboratories: <https://www.iso.org> — стандарти якості