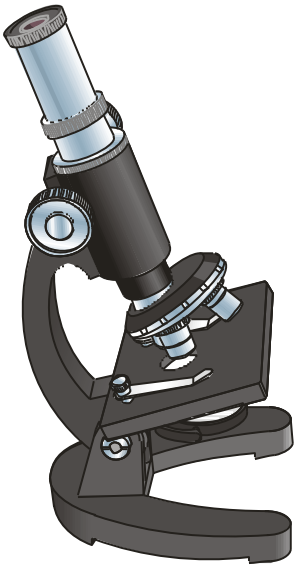
Протокол № 1

Тема: ***Правила роботи в бактеріологічній лабораторії. Імерсійний мікроскоп. Кулясті бактерії. Прості методи фарбування.***

Мета: ***Освоєння практичних навичок роботи у мікробіологічній лабораторії, приготування мазків, фарбування простими методами.***

Медична мікробіологія - _____
_____
_____
_____

1. Ознайомлення з імерсійним мікроскопом і правилами роботи з ним. Основні частини мікроскопу.



Механічна частина_____
_____
_____
_____

Оптична частина _____
_____
_____

Технічні характеристики:

- розділювальна здатність імерсійного об'єктиву _____
- позначення імерсійного об'єктиву _____
- збільшення імерсійного об'єктиву _____

2. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів: а) еритроцити та коки, фарбування за Романовським-Гімзою; б) стафілококи, фарбування за Грамом; в) стрептококи, фарбування за Грамом; г) диплококи (Streptococcus pneumoniae), фарбування метиленовою синькою.

3. Приготування мазків з агарових культур бактерій та фарбування простим методом - фуксином або метиленовою синькою, мікроскопія, зарисовка.

4. Дайте визначення. Наведіть приклади коків, які є патогенними для людини.

Коки (грец. kokkos – зерно) - _____
_____
_____

Мікрококи (лат. micros - малий) - _____
_____
_____

Диплококи (лат. diplos - подвійний) - _____
_____
_____
_____

Стрептококи (грец. streptos - ланцюг) - _____
_____
_____
_____

Тетракоки (лат. tetra - чотири) - _____
_____
_____
_____

Сарцини (лат. sarcina – тюк, пакет) - _____
_____
_____
_____

Стафілококи (лат. staphyle - гроно) - _____
_____
_____
_____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Загальні вказівки до проведення лабораторних робіт

При виконанні лабораторних робіт з мікробіології працюють з різним біологічним матеріалом і культурами мікроорганізмів. Вивчають будову живих організмів і їх основну структурну одиницю - клітину. Клітини мають невеликі розміри, тому неозброєним оком їх розглянути неможливо. Для їх вивчення готують певним чином препарати, які розглядають під мікроскопом. Тому роботи на рівні клітин і мікроорганізмів проводять в спеціальних лабораторіях, які повинні відповідати певним вимогам. На лабораторному столі повинні знаходитися: спиртівка; штатив для пробірок і бактеріальних петель та голок; набір барвників; промивалка; кювета з шинами для забарвлення препаратів; фільтрувальний папір; олівець для скла; дезінфікуючий розчин. В лабораторії повинні бути створені умови, що забезпечують стерильність роботи, при яких буде виключена можливість потрапляння як сторонніх мікроорганізмів ззовні, так і мікроорганізмів з лабораторії в навколишнє середовище. Тому в мікробіологічній лабораторії необхідно чітко дотримуватися певних правил роботи і поведінки, які запобігають виникненню зараження.

Правила роботи в лабораторії

1. У приміщення лабораторії не можна входити без спеціального одягу - халату.
2. Не дозволяється виходити в халаті за межі лабораторії і надягати на халат верхній одяг.
3. У приміщенні лабораторії забороняється приймати їжу і зберігати продукти харчування.
4. Не можна виносити за межі лабораторії посуд і матеріали, що використовуються для проведення лабораторних робіт (пробірки, фарби і т.п.).
5. Не дозволяється класти на стіл особисті речі (сумки, папки та ін.), слід тримати їх на спеціально відведених місцях.
6. Якщо мікроорганізми потрапляють на обладнання або підлогу (розіб'ється пробірка чи чашка Петрі, на якій вони росли), про це треба відразу ж повідомити викладачеві або лаборанту, а на тому місці провести знезараження, заливши поверхню дезінфікуючим розчином. Після цього слід провести прибирання.
7. Під час виконання практичних робіт не можна відкривати кватирки. Необхідно дотримуватися тиші, уникати зайвого руху та ходіння, відкривання та закривання дверей - всього того, що підсилює рух повітря.
8. Перед початком роботи чергові проводять вологе прибирання приміщення, а столи протирають дезінфікуючим розчином.
9. Кожен студент перед початком роботи повинен перевірити, чи все необхідне знаходиться на його столі та чи справний мікроскоп.
10. Роздача матеріалу і посуду, що необхідний для проведення лабораторної роботи, проводиться лаборантом або черговими.
11. На заняттях студенти повинні мати зошит, протоколи мікробіологічних досліджень, збірник задач КРОК-1 і олівці (простий і кольорові). Малюнки при мікроскопії треба робити з препаратів, а не з книжок чи посібників.
12. Після закінчення роботи всі інструменти, що було використано, знезаражують. Бактеріальні петлі і голки прожарюють над полум'ям спиртівки, а піпетки і скло занурюють у дезінфікуючий розчин.
13. Всі мікробні культури, що були використані при роботі, здають лаборанту, який проводить їх знезараження в автоклаві або в дезінфікуючому розчині.
14. Наприкінці занять треба привести до ладу робочий стіл, протерти і прибрати мікроскоп, ретельно вимити руки (при роботі з інфекційним матеріалом їх спочатку дезінфікують) і зняти халат.

Прибирання робочого місця

Після закінчення роботи беруть пінцетом шматок вати, змочують його в 5% розчині хлораміну або в 5% розчині формаліну і протирають ним поверхню столу на робочому місці. Така повсякденна дезінфекція має профілактичний характер.

Загальна мікробіологія - наука, що вивчає будову і життєдіяльність мікроорганізмів, їх поширення в природі, спадковість і мінливість.

Медична мікробіологія - вивчає патогенні і умовно-патогенні для людини мікроорганізми, їх екологію і поширеність, методи їх виділення та ідентифікації, а також питання епідеміології, специфічної терапії та профілактики викликаних ними захворювань.

Санітарна мікробіологія - вивчає санітарно-мікробіологічний стан об'єктів навколишнього середовища, харчових продуктів та напоїв, розробляє санітарно-мікробіологічні нормативи і методи індикації патогенних мікроорганізмів в різних об'єктах і продуктах.

Медична мікробіологія поділяється на:

- **бактеріологію** - науку про бактерії;
- **вірусологію** - науку про віруси;
- **мікологію** – науку, що вивчає патогенні для людини гриби;
- **протозоологію** – науку, що вивчає одноклітинні патогенні організми.

Методи дослідження мікроорганізмів:

- мікроскопія: світлова (в тому числі фазово-контрастна, темнопольна, флуоресцентна) та електронна;
- культуральний метод (бактеріологічний, вірусологічний);
- біологічний метод (зараження лабораторних тварин з відтворенням інфекційного процесу на чутливих моделях);
- молекулярно-генетичний метод (ПЛР, ДНК-і РНК-зонди та ін.);
- серологічний метод - виявлення антигенів мікроорганізмів або антитіл до них (ІФА).

Мета медичної мікробіології - вивчення структури і властивостей патогенних мікробів, взаємовідношення їх з організмом людини в певних умовах природного і соціального середовища, вдосконалення методів мікробіологічної діагностики, розробка нових, більш ефективних лікувальних і профілактичних препаратів, рішення такої важливої проблеми, як ліквідація і попередження інфекційних хвороб .

Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів

Структуру і морфологію бактерій вивчають за допомогою різних методів мікроскопії: світлової, фазово-контрастної, інтерференційної, темнопольної, люмінесцентної та електронної.

Світлопольна мікроскопія здійснюється за допомогою звичайного світлового мікроскопу, основною частиною якого є об'єктив. На оправі об'єктиву позначається збільшення: 8, 10, 20, 40, 90. При дослідженні мікробів застосовується імерсійна система (об'єктив). Імерсійний об'єктив занурюють в краплю кедрової олії, нанесеного на препарат. Кедрова олія має такий же коефіцієнт заломлення, як і скло, і цим досягається найменше розсіювання світлових променів.

Зображення, що одержано в об'єктиві, збільшує окуляр, який складається з двох лінз. У вітчизняних мікроскопах застосовуються окуляри зі збільшенням 7, 10, 15. Загальне збільшення мікроскопу визначається множенням збільшення об'єктиву на збільшення окуляру. У мікробіології зазвичай використовуються збільшення у 900-1000 разів. Якість мікроскопу залежить не від ступеня збільшення, а від його роздільної здатності - найменша відстань між двома точками препарату, при якому вони ще чітко помітні під мікроскопом. Роздільна здатність звичайних світлових мікроскопів з імерсійною системою дорівнює 0,2 мкм.

Темнопольна мікроскопія - заснована на такому принципі: промені освітлюють об'єкт не знизу, а збоку і не потрапляють в очі спостерігача: поле зору залишається темним, а об'єкт на його тлі виявляється таким, що світиться. Це досягається за допомогою спеціального конденсора (параболоїд) або звичайного конденсора, прикритого в центрі кружечком чорного паперу. Препарати для темнопольної мікроскопії готують по типу «висячої» і «роздавленої» краплі. При приготуванні препарату «роздавлена» крапля, досліджуваний матеріал (бактеріальну культуру в фізіологічному розчині) наносять на предметне скло, яке накривають покривним склом. Крапля матеріалу заповнює весь простір між покривним і предметним склом, утворюючи рівний шар. Для приготування «висячої» краплі необхідно використовувати спеціальне предметне скло з поглибленням в центрі і покривне скло. На середину покривного скла наносять досліджуваний матеріал. Краї поглиблення на предметному склі змащують вазеліном, і їм накривають покривне скло так, щоб крапля перебувала проти центру поглиблення. Потім перевертають препарат покривним склом вгору. Темнопольна мікроскопія використовується для вивчення живих нефарбованих мікроорганізмів.

Фазово-контрастна мікроскопія - при проходженні пучка світла через незабарвлений об'єкт змінюється лише фаза коливання світлової хвилі, що не сприймається оком людини. Щоб зображення стало контрастним, необхідно перетворити фазові зміни світлової хвилі у видимі амплітудні. Це досягається за допомогою фазово-контрастного конденсора і фазового об'єктиву. Фазово-контрастний конденсор являє собою звичайний об'єктив з револьвером і набором кільцевих діафрагм для кожного об'єктиву. Фазовий об'єктив забезпечений фазовою пластинкою, яку отримують нанесенням солей рідкісноземельних елементів на об'єктив. Зображення кільцевої діафрагми збігається з кільцем фазової пластинки відповідного об'єктива. Фазово-контрастна мікроскопія значно підвищує контрастність об'єкту і використовується для вивчення нативних препаратів.

Люмінесцентна мікроскопія заснована на здатності деяких речовин під впливом світла, яке падає на них, випускати промені з іншою (зазвичай більшою) довжиною хвилі (давати флюоресценцію). Такі речовини називають флюорохромами (акридіновий жовтий, родамін та ін.). Об'єкт, який оброблений флюорохромом, при освітленні ультрафіолетовими променями набуває яскравий колір в темному полі зору. Основною частиною люмінесцентного мікроскопу є освітлювач, що має лампу ультрафіолетового кольору і систему фільтрів до нього. Дуже важливо використання нефлуоресцентного імерсійного масла. Люмінесцентна мікроскопія в практичній мікробіології використовується для індикації та ідентифікації збудників інфекційних захворювань.

Електронна мікроскопія. Можливості оптичних мікроскопів обмежені занадто великою довжиною хвилі видимого світла (6000 А). Об'єкти, розміри яких менше цієї величини, знаходяться за межами роздільної здатності світлового мікроскопу. В електронному мікроскопі замість світлових хвиль використовуються електронні промені, що володіють надзвичайно малою довжиною хвилі і високою роздільною здатністю. Як джерело електронних променів застосовують електронну гармату, основою якої є вольфрамова нитка, нагріта електричним струмом. Між вольфрамовою ниткою і анодом на шляху електронів знаходиться електричне поле високої напруги. Електронний потік викликає світіння фосфоресціруючого екрану. Проходячи через об'єкт, частини якого мають різну товщину, електрони будуть відповідно затримуватися, що проявиться на екрані ділянками затемнення. Об'єкт набуває контрастності. Препарати для електронної мікроскопії готують на найтонших колоїдних плівках, досліджують об'єкти після їх висушування («нативні препарати»), напилення за допомогою важких металів, ультратонких зрізів методу реплік та ін. За допомогою електронної мікроскопії можна виявити найдрібніші структури, отримати збільшення до 200000 і побачити об'єкти розміром 0,002 мкм.

Техніка приготування і фарбування фіксованих препаратів

Приготування фіксованих фарбованих препаратів включає наступні етапи: приготування мазка, висушування, фіксація і фарбування.

На знежирене предметне скло наносять маленьку краплю стерильного фізіологічного розчину і переносять до неї бактеріологічною петлею невелику кількість досліджуваного матеріалу. Отриману суспензію рівномірно розміщують тонким шаром на площі 1-2 см^2 за допомогою петлі.

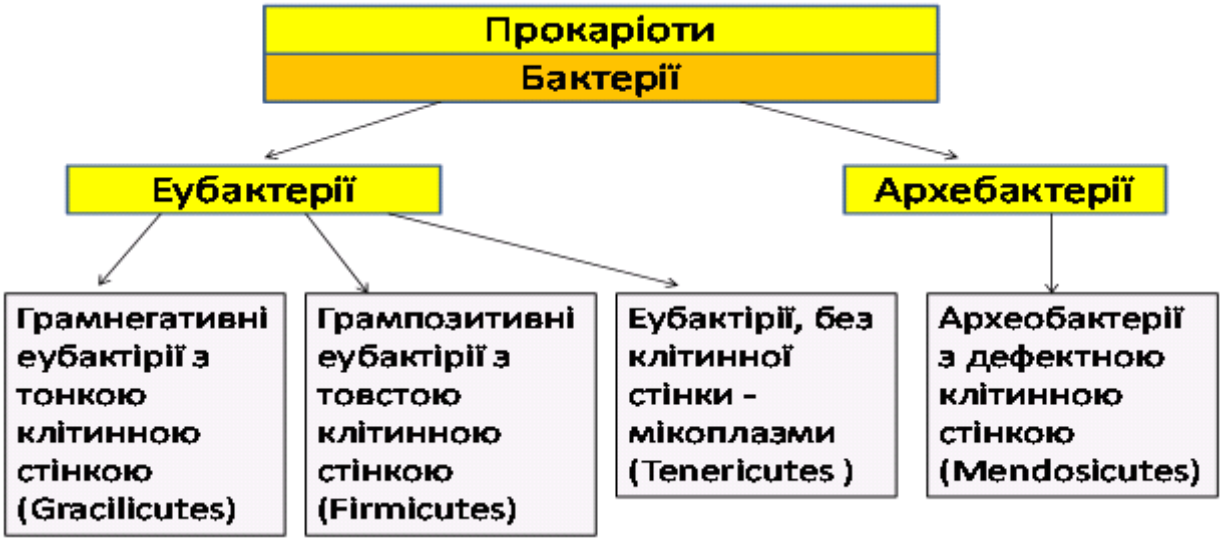
Висушування мазка. Найкраще сушити препарат при кімнатній температурі на повітрі, препарат також можна висушити в струмені теплого повітря, тримаючи скло високо над полум'ям пальника.

Фіксація мазка. Фіксація препарату необхідна для того, щоб убити мікроорганізми, тобто зробити безпечною подальшу роботу з ними, забезпечити краще прилипання бактеріологічних клітин до скла (убиті клітини фарбуються краще, ніж живі). Найпоширенішим способом фіксації є термічна обробка. Для цього препарат тричі проводять через найбільш гарячу частину полум'я пальника.

Для дослідження тонкої будови клітин використовують фіксацію хімічними речовинами. У цьому випадку фіксуючу рідину або наливають на мазок, або препарат на певний час занурюють у склянку з фіксатором. Найчастіше використовують етиловий спирт (час фіксації 12-20 хв.), метиловий спирт (час фіксації 3-5 хв.), суміш рівних за об'ємом частин етилового спирту й ефіру (препарат занурюють на 15-20 хв. у суміш чи заливають нею мазок і дозволяють суміші випаруватися). Існує цілий ряд інших фіксаторів. По закінченні фіксації препарат відмивають від фіксатора.

При фарбуванні простими методами барвник (метиленову синьку або фуксин) у невеликій кількості розташовують на предметному склі так, щоб фарба повністю покрила мазок, через 1-2 хвилини фарбу змивають водою та висушують препарат.

(http://labx.narod.ru)



Сферичні форми, або **коки** - кулясті бактерії розміром 0,5-1,0 мкм; за взаємним розташуванням клітин розрізняють мікрококи, диплококи, стрептококи, тетракоки, сарцини та стафілококи.

Мікрококи (від лат. - малий) - окремо розташовані клітини або у вигляді "пакетів".

Диплококи (від лат. - подвійний), або парні коки, розташовуються парами (пневмокок,

гонокок, менінгокок), тому що клітини після поділу не розходяться. **Пневмокок** має з протилежних сторін ланцетоподібну форму, а **гонокок** і **менінгокок** мають форму кавових зерен, звернених увігнутою поверхнею один до одного.

Стрептококи (від грец. *streptos* - ланцюжок) - клітини округлої або витягнутої форми, що складають ланцюжок внаслідок поділу клітин в одній площині та збереження зв'язку між ними в місці поділу.

Сарцини (від лат. *sarcina* - зв'язка, тюк) розташовуються у вигляді "пакетів" з 8 і більше коків, тому що вони утворюються при поділі клітини в трьох взаємно перпендикулярних площинах.

Стафілококи (від грец. s*taphyle* - виноградні грона) - коки, розташовані у вигляді грону винограду в результаті поділу в різних площинах.

Теоретичні питання:

1. Правила роботи в бактеріологічній лабораторії.
2. Будова імерсійного мікроскопа.
3. Характеристики імерсійного об’єктиву.
4. Правила використання імерсійного мікроскопа при мікроскопії фарбованих препаратів.
5. Барвники для простих методів фарбування.
6. Техніка приготування препаратів із культур бактерій і фарбування їх простими методами.
7. Кулясті бактерії, їх морфологія.
8. Приклади коків патогенних для людини і захворювань, які вони викликають.

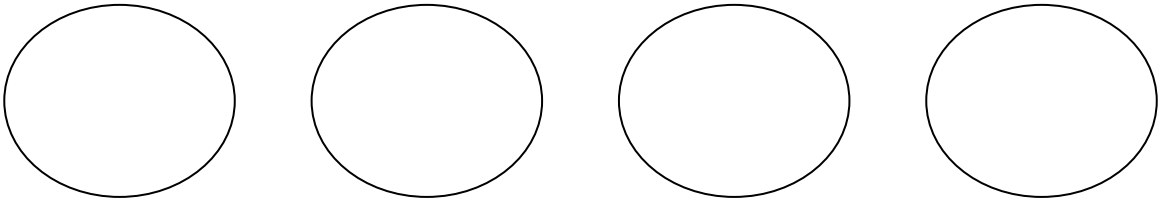
Протокол № 2

Тема: ***Паличкоподібні бактерії. Фарбування за Грамом. Ультраструктура бактеріальної клітини.***

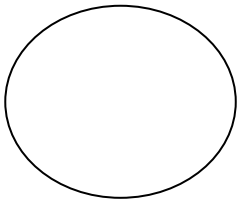
Мета: ***Освоєння практичних навичок фарбування за методом Грама. Вивчення структури бактеріальної клітини.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:

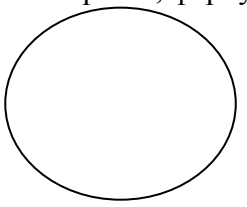
а) маленька паличка (кишкова паличка), фарбування за Грамом; б) велика паличка (антракоїд), фарбування за Грамом; в) еритроцити та палички, фарбування за Романовським-Гімзе; г) суміш бактерій (стафілокок, кишкова паличка, антракоїд), фарбування за Грамом.



2. Приготування мазка з чистої культури B. anthracoides, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка.



3. Приготування мазка з суміші мікробів, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка.



4. Дайте визначення. Наведіть приклади паличкоподібних бактерій, які є патогенними для людини.

Бактерії (грец. bacteria - паличка) - _____
_____
_____

Бацили (лат. bacillus - паличка) - _____
_____
_____

Клостридії (лат. clostridium - веретено) - _____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Паличкоподібні бактерії - це найчисленніша група прокаріот, які мають осьову симетрію і циліндричну форму клітин з округлими або загостреними кінцями. Паличкоподібні форми поділяють на дві групи: неспорові палички – власне бактерії (Bacterium) і палички, що утворюють спори. Палички, у яких діаметр спори не перевищує (або дорівнює) ширині вегетативної клітини, називаються бацилами (Bacillus). Палички, у яких діаметр спори перевищує ширину вегетативної клітини, називаються клостридіями (Clostridium) – веретеноподібні.

Залежно від взаємного розташування клітин паличкоподібні бактерії поділяють на одиночні і безсистемні скупчення, диплобактерії і диплобацили (розташовуються попарно), також стрептобактерії і стрептобацили (форми, що утворюють довгі або короткі ланцюжки).

До паличкоподібних форм також відносять коринебактерії і фузобактерії.

Коринебактерії (грец. *koryne*-булава) - прямі або зігнуті палички з булавовидними стовщеннями на кінцях (*Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium pseudotuberculosis* та ін.).

Фузобактерії - довгі, товсті, з загостреними кінцями палички. Є патогенні види - збудник некробактеріозу (*Fusobactedum necrosphorum*).

Ультраструктура бактеріальної клітини

Бактеріальна клітина складається з клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани, цитоплазми з включеннями і ядерного апарату, що називається нуклеоїдом. Є інші структури: мезосома, хроматофори, тилакоїди, вакуолі, включення полісахаридів, жирові крапельки, капсула (мікрокапсула, слиз), джгутики, пілі. Деякі бактерії здатні утворювати спори.

Клітинна стінка

У клітинній стінці грампозитивних бактерій міститься невелика кількість полісахаридів, ліпідів, білків. Основним компонентом клітинної стінки цих бактерій є багатошаровий пептидоглікан (муреїн, мукопептид), що становить 40-90% маси клітинної стінки. З пептидогліканом клітинної стінки грампозитивних бактерій ковалентно пов'язані тейхоєві кислоти (від грец. *teichos* - стінка). До складу клітинної стінки грамнегативних бактерій входить зовнішня мембрана, яка пов'язана за допомогою ліпопротеїну з шаром пептидоглікану. На ультратонких зрізах бактерій зовнішня мембрана має вигляд хвилеподібної тришарової структури, що подібна до внутрішньої мембрани, яку називають цитоплазматичною. Основним компонентом цих мембран є бімолекулярний (подвійний) шар ліпідів. Внутрішній шар зовнішньої мембрани представлений фосфоліпідами, а в зовнішньому шарі розташований ліпополісахарид (ЛПС). Ліпополісахарид зовнішньої мембрани складається з трьох фрагментів: ліпіду А - консервативної структури, практично однакової у грамнегативних бактерій; ядра, або стрижневої, корової частини (лат. *core* - ядро), відносно консервативної олігосахаридної структури (найбільш постійною частиною ядра ЛПС є кетодезоксіоктонова кислота); високоваріабельного О-специфічного ланцюга полісахариду, утвореного повторюваними ідентичними олігосахаридними послідовностями (О-антиген). Білки матриксу зовнішньої мембрани пронизують її таким чином, що молекули білка, звані порінами, облямовують гідрофільні пори, через які проходять вода і дрібні гідрофільні молекули. При порушенні синтезу клітинної стінки бактерій під впливом лізоциму, пеніциліну, захисних факторів організму утворюються клітини зі зміненою (часто кулястою) формою: протопласти – бактерії,

повністю позбавлені клітинної стінки; сферопласти – бактерії з частково збереженою клітинною стінкою. Бактерії сферо- або протопластного типу, які втратили здатність до синтезу пептидоглікану під впливом антибіотиків або інших факторів і здатні розмножуватися, називаються L-формами. Вони являють собою осмотично чутливі, кулясті, ковбоподібні клітини різної величини, в тому числі і проходять через бактеріальні фільтри. Деякі L-форми (нестабільні) при видаленні фактора, що призвів до змін бактерій, можуть реверсувати, «повертаючись» у вихідну бактеріальну клітину. Між зовнішньою і цитоплазматичною мембранами знаходиться періплазматичний простір, або періплазма, що містить ферменти (протеази, ліпази, фосфатази, нуклеази, бета-лактамази) і компоненти транспортних систем.

Цитоплазматична мембрана

Цитоплазматична мембрана при електронній мікроскопії ультратонких зрізів являє собою тришарову мембрану (2 темних шари завтовшки по 2,5 нм розділені світлим - проміжним). За структурою вона схожа на плазмалему клітин тварин і складається з подвійного шару фосфоліпідів з впровадженими поверхневими, а також інтегральними білками, які нібито пронизують наскрізь структуру мембрани. При надмірному зростанні (у порівнянні з ростом клітинної стінки) цитоплазматична мембрана утворює інвагінати –впинання у вигляді складно закручених мембранних структур, які називаються мезосомами. Менш складно закручені структури називаються внутришньоцитоплазматичними мембранами.

Цитоплазма

Цитоплазма складається з розчинних білків, рибонуклеїнових кислот, включень і численних дрібних гранул - рибосом, відповідальних за синтез (трансляцію) білків. Рибосоми бактерій мають розмір близько 20 нм і коефіцієнт седиментації 70S, на відміну від 80S-рибосом, характерних для еукаріотичних клітин. Рибосомні РНК (рРНК) - консервативні елементи бактерій («молекулярний годинник» еволюції). 16S рРНК входить до складу малої субодиниці рибосом, а 23S рРНК - до складу великої субодиниці рибосом. Вивчення 16S рРНК є основою геносистематики, що дозволяє оцінити ступінь спорідненості організмів. У цитоплазмі є різні включення у вигляді гранул глікогену, полісахаридів, бета-оксимасляної кислоти і поліфосфатів (волютин). Вони є запасними речовинами для харчування і енергетичних потреб бактерій. Волютин має спорідненість до основних фарбників і легко виявляється за допомогою спеціальних методів забарвлення (наприклад, по Нейссеру) у вигляді метахроматичних гранул. Характерне розташування гранул волютину виявляється у дифтерійної палички у вигляді інтенсивно профарбованих полюсів клітини.

Нуклеоїд

Нуклеоїд - еквівалент ядра у бактерій. Він розташований в центральній зоні бактерій у вигляді двониткової ДНК, замкнутої в кільце і щільно укладеної у вигляді клубка. Ядро бактерій, на відміну від еукаріот, не має ядерної оболонки, ядерця і основних білків (гістонів). Зазвичай в бактеріальній клітині міститься одна хромосома, що представлена замкнутою в кільце молекулою ДНК. Крім нуклеоїда, представленого однією хромосомою, в бактеріальній клітині є позахромосомні фактори спадковості - плазміди, що представляють собою ковалентно замкнуті кільця ДНК.

Капсула, мікрокапсула, слиз

Капсула - слизова структура товщиною більше 0,2 мкм, міцно пов'язана з клітинною стінкою бактерій і має чітко окреслені зовнішні межі. Капсула помітна в мазках-відбитках з патологічного матеріалу. У чистих культурах бактерій капсула утворюється рідше. Вона виявляється при спеціальних методах забарвлення мазка (наприклад, за Буррі-Гінсом), що створюють негативне контрастування речовин капсули: туш створює темний фон навколо капсули. Капсула складається з полісахаридів (екзополісахаридів), іноді з поліпептидів, наприклад, у бацили сибірки вона складається з полімерів D-глутамінової кислоти. Капсула

гідрофільна, перешкоджає фагоцитозу бактерій. Капсула антигенна: антитіла проти капсули викликають її збільшення (реакція набухання капсули). Багато бактерій утворюють мікрокапсулу - слизове утворення товщиною менше 0,2 мкм, що виявляється лише при електронній мікроскопії. Від капсули слід відрізняти слиз – мукоїдні екзополісахариди, що не мають чітких меж. Слиз розчинна у воді. Бактеріальні екзополісахариди беруть участь в адгезії (прилипанні до субстратів), їх ще називають глікокаліксом. Крім синтезу екзополісахаридів бактеріями, існує й інший механізм їх утворення: шляхом дії позаклітинних ферментів бактерій на дисахариди. В результаті цього утворюються декстрани і левани.

Джгутики

Джгутики бактерій визначають рухливість бактеріальної клітини. Джгутики являють собою тонкі нитки, що беруть початок від цитоплазматичної мембрани, мають більшу довжину, ніж сама клітина. Товщина джгутиків 12-20 нм, довжина 3-15 мкм. Вони складаються з 3 частин: спіралеподібної нитки, гачка і базального тільця, що містить стрижень зі спеціальними дисками (1 пара дисків - у грампозитивних і 2 пари дисків - у грамнегативних бактерій). Дисками джгутики прикріплені до цитоплазматичної мембрани і клітинної стінки. При цьому створюється ефект електромотору зі стрижнем-мотором, що обертає джгутик. Джгутики складаються з білка - флагелліну (від *flagellum* - джгутик); є Н-антигеном. Субодиниці флагелліну закручені у вигляді спіралі. Число джгутиків у бактерій різних видів варіює від одного (монотріх) у холерного вібріона до десятка і сотень джгутиків, які відходять по периметру бактерії (перітріх) у кишкової палички, протея та ін. Лофотріхи мають пучок джгутиків на одному з кінців клітини. Амфітріхи мають по одному джгутику або пучку джгутиків на протилежних кінцях клітини.

Пілі

Пілі (фімбрії, ворсинки) - ниткоподібні утворення, більш тонкі і короткі (3-10нм х 0,3-10мкм), ніж джгутики. Пілі відходять від поверхні клітини і складаються з білка пілину, що має антигенну активність. Розрізняють пілі, відповідальні за адгезію, тобто за прикріплення бактерій до ураженої клітини, а також пілі, відповідальні за харчування, водно-сольовий обмін і статеві (F-пілі), або кон'югаційні пілі. Пілі численні - кілька сотень на клітину. Однак, статевих пілей зазвичай буває 1-3 на клітину: вони утворюються так званими "чоловічими" клітинами-донорами, що містять трансмісивні плазміди (F-, R-, Col-плазміди). Відмінною особливістю статевих пілей є взаємодія з особливими "чоловічими" сферичними бактеріофагами, які інтенсивно адсорбуються на статевих пілях.

Спори

Спори – своєрідна форма покою фірмікутних бактерій, тобто бактерій з грампозитивним типом будови клітинної стінки. Спори утворюються при несприятливих умовах існування бактерій (висушування, дефіцит поживних речовин і ін.). Усередині бактеріальної клітини утворюється одна спора (ендоспора). Утворення спор сприяє збереженню виду і не є способом розмноження, як у грибів. Спороутворюючі бактерії роду Bacillus мають спори, які не перевищують діаметр клітини. Бактерії, у яких розмір спори перевищує діаметр клітини, називаються клостридіями, наприклад, бактерії роду Clostridium (лат. *closter* - веретено). Спори кислотостійкі, тому фарбуються за методом Ауєскі, Ганзена або за методом Циля-Нільсена в червоний, а вегетативна клітина в синій колір. Форма спори може бути овальною, кулястою; розташування в клітині - термінальне, тобто на кінці палички (у збудника правця), субтермінально – ближче до кінця палички (у збудників ботулізму, газової гангрени) і центральне (у бацили сибірки). Спори довго зберігаються через наявність багатошарової оболонки, дипіколінату кальцію, низького вмісту води і млявих процесів метаболізму. У сприятливих умовах спори проростають, проходячи три послідовні стадії: активація, ініціація, проростання.

Забарвлення за методом Грама

Метод Грама - метод забарвлення мікроорганізмів для дослідження, що дозволяє диференціювати бактерії за біохімічними властивостями їх клітинної стінки. Запропонований в 1884 році датським лікарем Гансом Крістіаном Грамом.

За Грамом бактерії забарвлюють аніліновими барвниками – генціановим або метиловим фіолетовим і ін., потім барвник фіксують розчином йоду. При подальшому промиванні забарвленого препарату спиртом ті види бактерій, що виявляються міцно забарвленими в синій колір, називають **грампозитивними бактеріями**, позначаються **Грам (+)**, на відміну від **грамнегативних, Грам (-)**, які при промиванні знебарвлюються.

Після промивання розчинником при фарбуванні за Грамом додається контрастний червоний барвник, який забарвлює всі грамнегативні бактерії в червоний або рожевий колір. Це відбувається через наявність зовнішньої мембрани, яка перешкоджає проникненню барвника всередину клітини. Тест класифікує бактерії, розділяючи їх на дві групи щодо будови їх клітинної стінки.

Техніка проведення забарвлення

Забарвлення за Грамом відноситься до складного способу забарвлення, коли на мазок впливають двома барвниками, один з яких є основним, а інший - додатковим. Крім барвників при складних способах забарвлення застосовують знебарвлюючі речовини: спирт, кислоти та ін. Для забарвлення за Грамом частіше використовують анілінові барвники трифенілметанової групи: генціановий, метиловий фіолетовий або кристалвіолет. Грампозитивні мікроорганізми дають міцне з'єднання з зазначеними барвниками і йодом. При цьому вони не знебарвлюються при впливі на них спиртом, внаслідок чого при додатковому забарвленні фуксином грампозитивні мікроорганізми не змінюють первісно прийнятий фіолетовий колір.

Грамнегативні мікроорганізми утворюють з основними барвниками і йодом з'єднання, що легко руйнується під дією спирту. В результаті мікроби знебарвлюються, а потім фарбуються фуксином, набуваючи червоний колір.

Методика фарбування за Грамом:

1. Фіксований мазок покривають фільтрувальним папером, що містить генціанвіолет, додають 2-3 краплі води, експозиція – дві хвилини.
2. Прибирають папір з генціанвіолетом та обробляють препарат 1-2 краплями розчину Люголя, експозиція – дві хвилини.
3. Зливають розчин Люголя і додають 95% етиловий спирт на 30 секунд.
4. Препарат обережно промивають водою.
5. Мазок фарбують фуксином, експозиція – одна-дві хвилини.
6. Фарбу змивають водою і висушують препарат на повітрі при кімнатній температурі або в потоці теплого повітря над полум’ям пальника.

Механізм забарвлення за Грамом

Існує кілька теорій механізму забарвлення за методом Грама. Передбачалося, що грампозитивне забарвлення зумовлено ненасиченими жирними кислотами, які є у деяких бактерій і здатними з'єднуватися з йодом, в результаті чого «ектоплазма» бактерій стає непроникною для спирту та вилучення адсорбованого барвника не відбувається.

Інша теорія [E. Stearn, A. Stearn, 1928] пов'язує механізм забарвлення за Грамом з **відмінностями в кислотно-основних властивостях** протоплазми у грампозитивних і грамнегативних бактерій. Ці дві групи бактерій характеризуються різною ізоелектричною точкою, яка у грампозитивних видів знаходиться при pH 2,0-3,0, а у грамнегативних близько 5. Поряд з цим слід вказати, що протрави, які застосовуються при фарбуванні (йод, пікринова

кислота, біхромат та ін.), є окислювачами і мають тенденцію перетворювати деякі комплекси протоплазми в більш кислі з'єднання, зсуваючи ізоелектричну точку бактерій у кислу сторону. Властивість йоду та інших протрав зсувати ізоелектричні точки в кислу сторону у грампозитивних бактерій виражено більшою мірою, ніж у грамнегативних, що вказує на певні хімічні відмінності між цими мікробами. Оскільки спорідненість до барвників і резистентність до знебарвлення тим сильніше, чим нижче ізоелектрична точка бактерій, а початкове значення pH у грампозитивних бактерій нижче, ніж у грамнегативних, і після обробки йодом воно в значній мірі ще знижується, створюються умови для міцної фіксації фарби.

Хімічна теорія [H. Henry, M. Stacey, 1943] пояснює грампозитивність наявністю на поверхні цитоплазми клітини комплексу з білка та рібонуклеата магнію. Цей комплекс можна екстрагувати із тіла грампозитивних бактерій жовчними солями і перетворити їх в грамнегативні. Отриманий таким способом грамнегативний варіант можна знову перетворити в грампозитивний, додавши до нього виділений екстракт. Перетворення грампозитивних бактерій в грамнегативні відбувається також при обробці убитих бактерій рібонуклеазою. Присутність протеїн-рібонуклеату магнію на поверхні клітини можна довести тим, що успіх забарвлення залежить від структурної цілісності бактерій. При механічних пошкодженнях, розриві оболонки, роздавлюванні, розтиранні можна спостерігати перетворення пошкоджених бактерій в грамнегативні. Грампозитивність зберігається у морфологічно цілісних клітин.

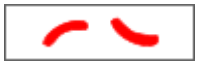
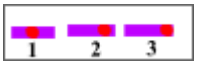
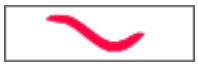
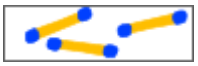
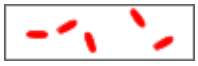
Є дані, які свідчать про те, що зрештою фарбування за Грамом залежить від різної проникності клітинних стінок у грампозитивних і грамнегативних бактерій. Зокрема, вказується, що клітинна стінка грампозитивних бактерій містить більше пептидоглікану, ніж клітинна стінка грамнегативних бактерій, і, що особливо важливо, пептидоглікани обох груп бактерій структурно відрізняються один від одного. У пептидоглікані грампозитивних бактерій (Staphylococcus aureus) залишки N-ацетил мурамової кислоти містять О-ацетил групи в положенні С6, що надає молекулам пептидоглікану стійкість, зокрема до лізоциму. Висловлюється припущення, що обробка спиртом при фарбуванні за Грамом зменшує діаметр пор в пептидогліkановому шарі у грампозитивних бактерій в більшій мірі, ніж у грамнегативних. Тому комплекс генціанвіолет-йод при обробці спиртом утримується грампозитивною клітиною і вилучається з грамнегативної (джерело: http: //бмэ.орг).

Грамнегативні бактерії:

- сферичні форми, або коки (гонококи, менінгококи, вейлонели);
- звиті форми - спірохети і спірили;
- паличкоподібні форми;
- рикетсії і хламідії.

Грампозитивні бактерії:

- сферичні форми, або коки (стафілококи, стрептококи, пневмококи);
- паличкоподібні форми: спороутворюючі, коринебактерії, мікобактерії і біфідобактерії;
- актиноміцети (розгалужені, ниткоподібні бактерії).

тонкостінні, грамнегативні бактерії		товстостінні, грампозитивні бактерії	
менінгококи		пневмококи	
гонококи		стрептококи	
вейлонели		стафілококи	
палички		актиноміцети	
вібріони		бацили	
кампілобактерії хелікобактерії		клостридії	
спірили		коринебактерії	
спірохети		мікобактерії	
рикетсії		біфідобактерії	
хламідії			

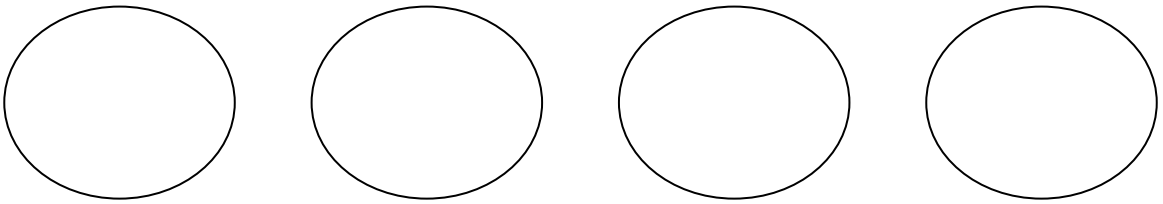
Теоретичні питання:

1. Морфологія паличкоподібних бактерій.
2. Розподіл паличкоподібних бактерій за формою, розміром, характером їх кінців і взаємному розташуванню.
3. Розподіл паличок на бактерії, бацили та клостридії.
4. Ультраструктура бактеріальної клітини.
5. Будова клітинної стінки грампозитивних та грамнегативних бактерій.
6. Фарбування за Грамом (механізм метода, техніка).
7. Відношення різних груп бактерій до фарбування за Грамом. Практичне значення.
8. Приклади грампозитивних та грамнегативних бактерій, які патогенні для людини, та захворювань, які вони викликають.

Протокол №3

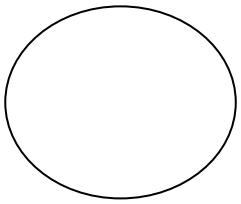
Тема: ***Вібріони. Спірохети. Джгутики у бактерій. Вивчення рухомості.***
Мета: ***Вивчення морфології звитих мікроорганізмів.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:
а) вібріон Мечникова, фарбування за Грамом; б) бліда трепонема, фарбування за Буррі, в) лептоспіра, фарбування за Морозовим; г) борелія поворотного тифу, фарбування за Романовським-Гімзою.



2. Перегляд рухливості вібріона Мечнікова за допомогою фазово-контрасного мікроскопа, зарисовка.

3. Приготування мазка з чистої культури вібріону Мечникова, фарбування за Грамом, мікроскопія та зарисовка.



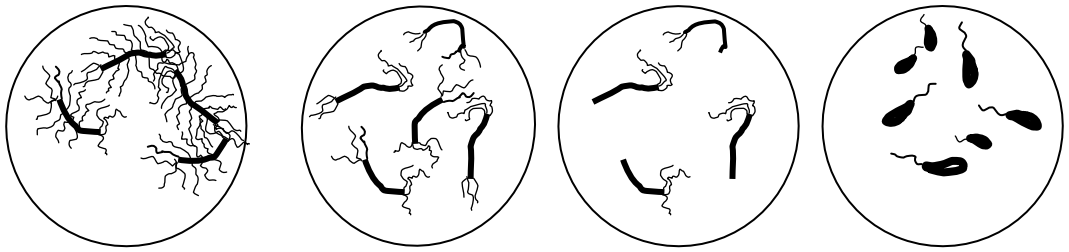
4. Дайте визначення. Наведіть приклади патогенних бактерій.

Вібріони (грец. vibrio – звиватися) - _____
_____
_____

Спірили (грец. speira - завиток) - _____
_____
_____

Спірохети (грец. speira - завиток, chaite - волосся) - _____
_____
_____

За розташуванням джгутиків рухливі бактерії розподіляються на чотири групи:



1. Перітрихи_____
2. Амфітрихи_____
3. Лофотрихи_____
4. Монотрихи_____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Рід Vibrio родини Vibrionaceae входить до 2-ї підгрупи 5-ї групи визначника Берджі «Факультативні анаеробні Гр- палички»:

1. Vibrio cholerae (типовий вид роду) на 2 серогрупи:

а) V. cholerae O1:

Біовари V.cholerae

• O1 класичний (V.cholerae cholerae or asiaticaeor classical) викликав шість пандемій холери *(описаний вперше в 1854 р. Ф. Пачіні і досліджений Р. Кохом в 1883 р.)*

• O1 Ель-Тор (*V.cholera eltor*) в 1961 р. викликав VII пандемію холери в Індонезії *(виділений з трупів прочан на карантинній станції Ель-Тор в Єгипті 1906р.)*

• O139 Бенгал був виділений в 1993 р в Південно-Східній Азії.

б) V. cholerae non O1 (НАГ) вібріони

Таксономічна категорія	Таксони V. cholerae O1	Таксони інш. представників
Родина	Vibrionaceae	
Рід	Vibrio	1. Aeromonas 2. Plesiomonas 3. Photobacterium 4. Lucibacterium
Вид роду	V.cholerae	1. V.parachemolyticus 2. V.alginolyticus 3. V.albensis 4. V.costicola
Серогрупи роду	O1	не O1 (НАГ вібріони)
Біовари серогрупи O1	1. V.cholerae cholerae (asiaticae, classical) 2. V.cholera El-tor 3. V.cholera O139 Бенгал	-
Серовари O1	1. Inaba 2. Ogawa 3. Hykoschima	-

Морфологічні властивості V. cholera

• Грамнегативна трохи вигнута паличка (кома Коха - «підступна кома»).
• Рухома (полярний монотрих)
• Спор і капсул не утворює
• У мазку з чистої культури розташовується хаотично
• У мазку з фекалій - у вигляді «зграйки риб»

Основні патогенні представники родини Spirochaetaceae

Рід	Вид	Підвид	Захворювання
Treponema	T.pallidum T.pallidum T.pallidum T.carateum T.vincentii	pallidum endemicum pertenue	Сифіліс Беджель Фрамбезія Пінта Ангіна Венсана-Плаута
Borellia	B.recurrentis B.caucasica, B.duttoni, B.persica та ін.		Епідемічний (вошивий) поворотний тиф Ендемічний (кліщовий) поворотний тиф
	B.burgdorferi		Хвороба Лайма
Leptospira	L. interrhogans		Лептоспіроз

Морфологія спірохет

Спірохети (*spira* - завиток, *chaite* - волосся) - тонкі, довгі, звиті рухливі бактерії спіралевидної форми. Вони складаються з зовнішньої мембрани (клітинної стінки), яка оточує протоплазматичний циліндр з цитоплазматичною мембраною і аксіальною ниткою (аксостиль). Розміри клітин спірохет становлять 0,05-3х5-500 мкм.

Аксіальна нитка знаходиться під зовнішньою мембраною і нібито закручується навколо протоплазматичного циліндру спірохети, при цьому утворюються первинні завитки, що надає бактерії гвинтоподібну форму. Аксіальна нитка складається з фібрил - аналогів джгутиків бактерій, до складу яких входить скоротливий білок флагеліну. Вони прикріплені до кінців клітини і спрямовані назустріч один одному, інший край фібрил вільний. Число і розташування фібрил варіює у різних спірохет (від 1 до 100). Фібрили беруть участь в пересуванні спірохет і надають клітинам обертальний, згинальний, поступальний рух. При цьому спірохети утворюють петлі, завитки, вигини, які отримали назву вторинних завитків. Тип, кількість завитків, крок, висота, кут нахилу спіралі відіграють важливу систематичну роль. Спірохети погано сприймають барвники. Зазвичай їх фарбують за методом Романовського-Гімзе або сріблення, вони грамнегативні, але в процесі забарвлення за цим методом тіло спірохет часто руйнується. У живому вигляді їх досліджують за допомогою фазово-контрастної або темнопольної мікроскопії. Вміст Г+Ц в ДНК спірохет варіює від 32 до 66 моль%. При несприятливих умовах середовища спірохети можуть перетворюватися на цисти: спірохети згортаються в клубок і виділяють слиз, яка ущільнюється й утворює оболонку цисти.

Патогенні спірохети підрозділяються на 3 роди: *Borrelia, Treponema, Leptospira.*

Спірохети роду ***Borrelia*** мають 3-8 великих нерівномірних, грубих завитків. Містять багато нуклеопротеїдів, добре сприймають анілінові барвники. За Романовським-Гімзе фарбуються в синьо-фіолетовий колір. Периплазматична нитка складається з 15-20 паралельних

фібрил, скорочення яких викликає згинально-поступальний, рідше обертально- поступальний рух. Борелії викликають хворобу Лайма, поворотний тиф та інші бореліози.

Рід ***Treponema*** включає спіралеподібно покручені ниткоподібні рухливі бактерії, що мають розміри 0,1-0,5х5-20 мкм з периплазматичною ниткою, яка має від 1 до 4 фібрил. Завитки у трепонем дрібні, рівномірні, кількістю 8-12, вміст Г+Ц 32-50%. Фарбуються за Романовським-Гімзе в рожевий колір, тому що містять мало нуклеопротеїдів і багато ліпідів. Рухливі, рухи повільні згинально-поступальні або хаотичні. Форму і рухи добре видно в живому стані в темному полі зору мікроскопу. До облігатно-патогенних для людини відноситься *T.pallidum* - збудник сифілісу. Серед трепонем багато сапрофітів, які мешкають в порожнині рота або в мулі водойм.

Представники роду ***Leptospira*** мають завитки неглибокі, часті, у вигляді закрученої мотузки. Кінці цих ниткоподібних спірохет вигнуті подібно гачкам з потовщеннями на кінцях. Мають 1-2 фібрили. Утворюючи вторинні завитки, вони набувають вигляду букв S або С, майже не забарвлюються аніліновими барвниками. Головний тип руху - поступально-обертальний. За Романовським-Гимзе фарбуються в червоний колір, але при фіксації різко змінюються їх характерні ознаки. Вивчають лептоспіри в темному полі, фазово-контрастному мікроскопі. Патогенний представник - *Leptospira interrogans*, збудник лептоспірозу. Сапрофітні представники мешкають у воді.

Джгутики

Джгутики є органами руху бактерій, складаються з білка флагеліну. За кількістю і характером розташування джгутиків розрізняють бактерії монотрихи, лофотрихи, амфітрихи і перитрихи. Джгутики мають антигенні властивості (Н-антиген) і дають можливість бактеріям пересуватися в рідкому середовищі.

Наявність джгутиків можна визначити за характером руху бактерій в «роздавленій» і «висячій» краплях при опущеному конденсорі і частково прикритій діафрагмі мікроскопу.

Метод «роздавленої краплі». Культуру в фізіологічному розчині хлориду натрію наносять на предметне скло і зверху накладають покривне. Крапля матеріалу повинна бути такого розміру, щоб вона заповнювала весь простір між покривним і предметним склом і не виступала за межі покривного. Препарат розглядають з імерсійною системою і злегка опущеним конденсором.

Метод «висячої краплі». Необхідно мати предметне скло з лункою. Краплю культури наносять на покривне скло, зверху накладають предметне скло з лункою посередині, краї якої попередньо обмазано вазеліном. Потім предметне скло злегка притискають до покривного, і препарат перевертають покривним склом догори. Виходить герметично закрита камера, в якій крапля довго не висихає.

Теоретичні питання:

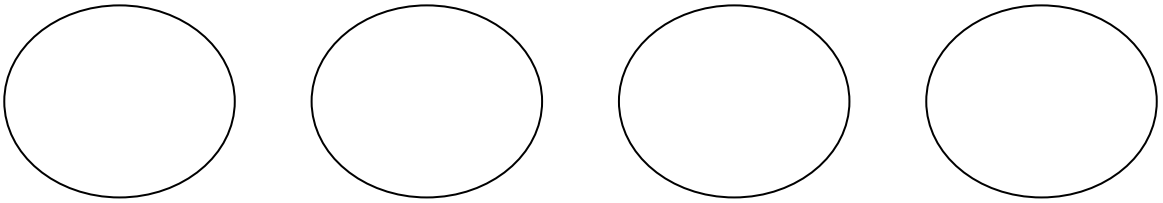
1. Назвати представників патогенних вібріонів.
2. Охарактеризувати морфологію вібріонів.
3. Назвати класифікацію патогенних спірохет.
4. Спірохети. Структура та властивості.
5. Розподіл бактерій за характером рухливості.
6. Джгутики, їх структура, функції. Розподіл бактерій за кількістю та розташуванням джгутиків.
7. Методи вивчення рухомості вібріонів, спірохет.
8. Спеціальні мікроскопи для вивчення рухомості – фазово-контрастний та з темним полем зору (принцип будови, можливості використання для спостереження за рухомістю).

Протокол 4

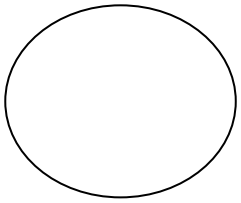
Тема: ***Спори. Спороутворення. Методи фарбування спор.***
Мета: ***Вивчення морфології спороутворюючих мікроорганізмів.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:

а) паличка з субтермінальною спорою, фарбування за Грамом (Clostridium botulinum); б) паличка з термінальною спорою, за Грамом (Clostridium tetani); в) паличка з центральною спорою, за Грамом (Bacillus anthracis); г) паличка з центральною спорою, за Ганзеном (Bacillus anthracis).



2. Приготування мазка з культури спороносної палички (антракоїд), фарбування за методом Ганзена, мікроскопія, зарисовка.



ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Спори - це особливий стан спокою бактеріальних клітин.

Спори характеризується: зниженням рівня обміну речовин і високою стійкістю до несприятливих факторів.

Причини переходу бактерій до спороутворення: нестача поживних речовин; нестача води; накопичення продуктів обміну та ін. несприятливі умови.

Ендоспори - це бактеріальні спори, які формуються всередині клітини. У деяких бактерій можуть утворюватися екзоспори (тільки у метан-окислюючих бактерій) і **цисти** (куляста клітина, у деяких видів Азотобактерій). Це теж форми спокою, але в цьому випадку сама бактерія начебто покривається захисною оболонкою, а не утворює спору всередині себе.

Серед бактерій спори утворюють: *бацили* (спора не перевищує діаметр вегетативної клітини), *клостридії* (спора перевищує діаметр вегетативної клітини). Відомі й спороутворюючі коки.

Розташування спори в клітині бактерії: центрально (в центрі), субтермінально (ближче до кінця), термінально (на кінці клітини).

Будова спори. Центральна частина спори представлена *серцевиною*, яка оточена *цитоплазматичною мембраною* (ЦПМ), до якої прилягає зародковий пептидогліканový шар,

потім шар кори - *кортекса*. На поверхні кортекса є *зовнішня мембрана*. Зовні спори оточені *багатошаровою оболонкою*.

Функція спор: збереження бактерії в несприятливих умовах; розселення бактерії. *Спори у бактерій не беруть участі у розмноженні!*

Спороутворення (інспоруляція) - це утворення спори під контролем комплексу спеціальних генів.

Стадії спороутворення:

1. Підготовча – змінюється обмін речовин, завершується подвоєння ДНК. Клітина містить 2 або більше нуклеоїдів. Один локалізований у спорогенній зоні, решта в цитоплазмі спорангію.

2. Стадія передспори – з боку ЦПМ вегетативної клітини відбувається вростання подвійної мембрани, в результаті утворюється проспора, оточена 2-ма мембранами.

3. Утворення оболонок – між мембранами утворюється зародковий пептидоглікановий шар шляхом відкладання шару кори і навколо зовнішньої мембрани формується оболонка.

4. Дозрівання спори – завершення утворення спори (відбувається її ущільнення).

5. Руйнування материнської клітини.

В оптимальних умовах відбувається проростання спори. Спочатку вона активно поглинає воду і набухає, посилюється дихання, зростає активність ферментів. Потім спора лопається і з неї виходить вегетативна клітина.

Методика фарбування спор за Ганзеном

1. Фіксований мазок покривають фільтрувальним папером, наносять карболовий фуксин та тричі підігрівають полум'ям пальника до появи парів.
2. Прибирають папір та оброблюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти (1-2 краплі), експозиція – 30 секунд.
3. Препарат обережно промивають водою.
4. Наносять розчин метиленового синього, експозиція – 30 сек-1 хв.
5. Фарбу змивають водою і висушують препарат фільтрувальним папером, на повітрі при кімнатній температурі або в потоці теплого повітря над полум'ям пальника.

Теоретичні питання:

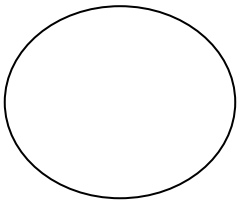
1. В яких умовах і як відбувається процес спороутворення (стадії)?
2. Порівняльна стійкість спор та вегетативних форм бактерій.
3. Використання ознак спороутворення для ідентифікації бактерій.
4. Форма, розташування спор та їх розмір відносно діаметру вегетативної клітини, що характерно для окремих видів.
5. Назвіть бактерії, які утворюють спору, та захворювання, які вони викликають. Пояснити, чому деякі з них називаються клостридіями, а інші – бацилами.
6. Основний метод забарвлення спор (за Ганзеном).

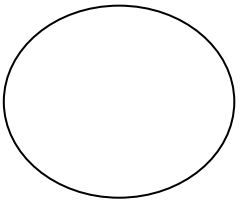
Протокол №5

Тема: ***Капсули у бактерій та методи їх виявлення.***
Мета: ***Вивчення морфології мікроорганізмів, утворюючих капсулу.***

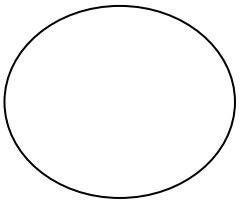
1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:

а) чиста культура клебсієли, фарбування за Буррі-Гінсом; б) мазок-відбиток, що містить Bacillus anthracoides, фарбування метиленовою синькою.





2. Приготування мазка з чистої культури капсульних бактерій (клебсієла) , фарбування за методом Буррі-Гінса, мікроскопія, зарисовка.



ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Капсула клітини – поверхнева слизова структура, що утворюється навколо оболонки. Ця аморфна речовина має велике значення для життєдіяльності клітини, робить оболонку міцнішою і щільною, служить захисним бар'єром на шляху фагоцитів, іноді виконує роль комори і зберігає запаси поживних речовин. У будові капсули розрізняють два шари: внутрішній і зовнішній. Внутрішній шар – частина зовнішнього шару цитоплазми клітини, а зовнішній – результат секреторної функції бактерії.

Види капсул

Продукти біосинтезу бактерії відкладаються навколо клітинної оболонки у вигляді своєрідного кокона, що підтримує життєдіяльність клітини. Залежно від товщини слизового шару розрізняють:

1. Мікрокапсули. Шар слизу менше 0,2 мкм. Виявляється тільки за допомогою електронного мікроскопу.

2. Макрокапсули, ті що мають стінки товщі ніж 0,2 мкм. Їх вже можна розглянути в звичайний мікроскоп, але для виявлення слизової структури знадобиться спеціальне забарвлення негативним методом.

Не всі мікроорганізми мають здатність утворювати верхній шар у вигляді аморфного кокона. Деякі бактерії утворюють їх в будь-яких умовах (істинно капсульні бактерії), але для більшості утворення капсул – метод захисту від навколишнього середовища.

Для мікроорганізмів капсула має велике **значення:**

- вони утворюють вологе середовище, в якому клітина відчуває себе більш комфортно;
- аморфна будова кокона захищає клітини від висихання і оберігає їх від механічних пошкоджень;
- збільшують здатність бактерій зчіплюватися одна з одною або з іншими поверхнями, тобто збільшують їх адгезію;
- виконують функції імунного бар'єру, тобто перешкоджають проникненню в клітину фагів (вірусів для мікроорганізмів).

Клітини, що мають капсулу, здатні вижити в несприятливих умовах. Особливо яскраво це виявляється на прикладі патогенних мікробів. При попаданні в організм деякі бактерії одразу ж набувають пухку стінку, що захищає їх від імунної системи макроорганізму (людини або тварини), тоді як у зовнішньому середовищі вони чудово існують в своєму звичайному вигляді. У випадку з патогенними бактеріями наявність капсули ускладнює проникнення в клітину антибіотиків і, відповідно, заважає організму перемогти хворобу.

Якщо бактерії об’єднані в колонію, то оболонка допомагає здійснювати зв'язок між окремими клітинами і виконує функції їх з'єднання між собою. В'язка субстанція капсули також має значення для прикріплення клітини або колонії до інших поверхонь.

Позаклітинні полімерні речовини, що накопичуються в капсулі, можна застосовувати на практиці. Так, їх використовують для отримання штучної плазми крові або для вирощування найтонших синтетичних плівок.

Виявлення капсул

У будові капсули бере участь дуже багато води, до 98%. Крім того що рідина робить кокон дуже неміцним, вона ще й прозора, тобто розглянути гелеподібну оболонку під мікроскопом звичайним методом без додаткової підготовки не вийде.

У нормальному стані бактерії теж прозорі. Зазвичай для виявлення клітин використовують різні методи забарвлення, що дозволяє легко розглянути їх під мікроскопом. Але для капсул звичайні способи не підходять з кількох причин:

1. Слизова речовина капсули погано затримує фарбувальні пігменти, після промивання препарату (це обов'язкова процедура при фарбуванні) слиз залишається безбарвним.
2. Аморфні оболонки дуже м'які і неміцні, в процесі фарбування їх легко пошкодити. При звичайних методах фарбування препарат піддається механічним впливам, які можуть знищити сам об'єкт дослідження.

Методи виявлення капсул:

1. Метод забарвлення за **Буррі-Гінсом** заснований на нездатності капсули утримувати фарбу і полягає в фарбуванні навколишнього середовища і самої бактерії: на предметне скло наносять краплю туші; додають в туш краплю бактеріальної суспензії; перемішують і акуратно розподіляють рідину по поверхні; залишають для висихання на повітрі і фіксують (обробляють сулемою, спиртом або швидко обпалюють); занурюють в розчин барвників; промивають водою і висушують. Під мікроскопом готовий препарат виглядає наступним чином: на темному (або чорному) фоні туші добре видно червоні або фіолетові бактерії, оточені світлим (нефарбованим) обідком.

2.Фарбування **за Дюгіду** – туш змішують з культурою на предметному склі, потім поміщають зверху покривне скло і сильно притискають, в результаті чого рідина розподіляється тонким шаром між поверхнями. Розглядають готовий препарат за допомогою спеціального

об'єктиву з великим збільшенням. На темному фоні туші навколо клітини чітко виділяються прозорі зони капсул.

3. Забарвлення **за Романовським-Гімзою** з використанням спеціальної фарбувальної суміші (фіксований мазок кладуть в чашку Петрі мазком вниз на підставки зі скляної соломки або сірників і наливають робочий розчин фарби Романовського-Гімзе (15-20 крапель на 10 мл води). Через 15-20 хв препарат промивають водою і висушують на повітрі. Бактерії фарбуються в темно-синій колір, капсули - в рожевий.

4. Забарвлення за **методом Міхіна** за допомогою метиленової сині Леффлера: на фіксований мазок наливають метиленову синь Леффлера (30 мл насиченого спиртового розчину метиленової сині розчиняють в 100 мл води, додають 1 мл 1% розчину NaOH і витримують в термостаті місяць) при легкому нагріванні витримують 3-5 хв., швидко промивають водою і висушують. Бактерії фарбуються в синій колір, капсули - в рожевий;

5. **Реакція Нейфельда** – заснована на розбуханні, розпушенні капсульної речовини під впливом антитіл, які імунна система організму використовує для ідентифікації та знешкодження різних чужорідних об'єктів. Наприклад, при попаданні в організм пневмококів імунна система продукує антитіла, відповідні хімічному складу капсул цих мікробів. У відповідь бактерії починають нарощувати товщину слизового шару, намагаючись вберегти клітину від загибелі. В результаті оболонка стає набагато більше і помітніше.

При проведенні медичних аналізів на виявлення конкретного виду патогенних бактерій в досліджуваний матеріал, отриманий від хворого, додають кілька видів сироватки з різними антитілами. Значення матиме той результат, де ширина аморфного шару найбільша. Таким чином досить просто підтвердити або встановити діагноз, що дозволить якомога швидше почати необхідне лікування.

Методика фарбування капсул за Буррі- Гінсом

1. Готують препарат за Буррі (краплю культури бактерій змішують з чорною канцелярською тушшю і роблять тонкий мазок).
2. Препарат висушують і фіксують над полум’ям.
3. Наносять розчин карболового фуксину, експозиція - 1-2 хв.
4. Фарбу змивають водою і висушують препарат фільтрувальним папером, на повітрі при кімнатній температурі або у потоку теплого повітря над полум’ям пальника.

Теоретичні питання:

1. Капсули у бактерій.
2. Хімічний склад капсул.
3. Мікроби, що утворюють капсули тільки в організмі, а також за його межами.
4. Значення капсулоутворення у мікробів.
5. Використання ознаки капсулоутворення з метою діагностики.
6. Методика виявлення капсул у препаратах із чистих культур, які забарвлені за Буррі-Гінсом.
7. Методика виявлення капсул у препаратах-відбитках із органів.

Протокол № 6

Тема: ***Морфологія найпростіших.***

Мета: ***Вивчення морфології патогенних найпростіших у препаратах із патологічного матеріалу.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

БУДОВА ТА КЛАСИФІКАЦІЯ НАЙПРОСТІШИХ.

Найпростіші еукаріотичні одноклітинні мікроорганізми, що складають підцарство ***Protozoa*** у царстві тварин (Animalia). Найпростіші включають 7 типів, з яких 4 типи (Sarcomastigophora, Apicomplexa, Ciliophora, Microspora) мають представників, що викликають захворювання у людини.

Клітини найпростіших покриті щільною еластичною мембраною - пелікулою, яка утворена периферичним шаром цитоплазми. Деякі з них забезпечені опорними фібрилами і мінеральним скелетом, що відсутні у бактерій. Цитоплазма найпростіших містить компактне ядро або кілька ядер, оточених мембраною, ядерний сік (каріолімфа), хромосоми і ядерця, а також структури, властиві клітинам багатоклітинних тваринних організмів: ендоплазматичний ретикулум, рибосоми, мітохондрії, апарат Гольджі, лізосоми, різні типи вакуолей та ін.

Багато найпростіших здатні активно пересуватися в просторі за допомогою тимчасових псевдоподій або постійно існуючих органел. Розміри найпростіших коливаються в середньому від 2 до 100 мкм.

Розмножуються безстатевим шляхом – бінарним діленням або множинною шизогонією, а деякі і статевим шляхом – спорогонією.

Найпростіші при несприятливих умовах навколишнього середовища утворюють цисти, стійкі до зміни температури, вологості та ін.

При фарбуванні за Романовським-Гімзе ядро найпростіших фарбується в червоний колір, а цитоплазма – в блакитний.

Дизентерійна амеба

Entamoeba histolytica була відкрита Ф.А. Лешем в 1875 р. Тип Sarcomastigophora, підтип Sarcodina, клас Lobosea, загін Amoebida.

Вона є мешканцем товстої кишки людини і в своєму розвитку (життєвий цикл) проходить 2 стадії - вегетативну і стадію спокою. До 1-ї відносяться 3 морфологічно різних форми: велика вегетативна (форма magna, або тканинна), просвітна, або кишкова (форма minuta, або коменсальна) і передцистна форми. Окремі стадії переходять одна в іншу в залежності від умов існування в організмі господаря.

Велика вегетативна форма має відносно великі розміри (20-50 мкм) і виявляється з патологічними домішками (кров, слиз) в нативних препаратах зі свіжих фекалій хворого гострим амебіазом. Внутрішній шар цитоплазми (ендоплазма) зернистий, зовнішній шар (ектоплазма) більш гомогенний, склоподібний, добре помітний при утворенні псевдоподій. Для цієї форми властиво активне і швидке переміщення за допомогою ендоплазматичних псевдоподій. Для амеби характерно поштовхоподібне утворення псевдоподій і активний поступальний рух. Ядро у живої амеби погано видно. В її ендоплазмі можуть спостерігатися фагоцитовані еритроцити господаря, що є характерною ознакою тканинної форми.

Просвітна форма амеби живе і розмножується в просвіті сліпої і висхідної частини товстої кишки і в основному має будову тканинної форми, але менших розмірів (15-20 мкм); виявляється у фекаліях реконвалесцентів, а також хворих з хронічним перебігом хвороби, а також у носіїв. Вони пересуваються повільніше, ніж тканинна вегетативна форма. В цитоплазмі виявляються фагоцитовані детрит і бактерії. Еритроцитів ця форма не фагоцитує.

Передцистна форма дизентерійної амеби зустрічається у випорожненнях реконвалесцентів, а також у безсимптомних носіїв. Вона відрізняється від інших вегетативних форм найбільш повільними рухами.

Циста має округлу форму. Вона оточена двоконтурною оболонкою. Містить 4, 2 або 1 ядро, велику глікогенову вакуолю, а у частини цист є так звані хроматоїдні тіла, що являють

собою включення в вигляді 1-3 коротких товстих паличок або брусочків з тупими кінцями. Присутність хроматоїдних тіл такої форми є одним з основних діагностичних ознак цист дизентерійної амеби.

Глікогенову вакуолю містять, як правило, цисти, що мають 1-2, рідше – 3 ядра; виявляють її при фарбуванні розчином Люголя. Хроматоїдні тіла видно в нативному препараті.

Цисти добре зберігаються у зовнішньому середовищі.

Дизентерійна амеба добре культивується на штучних поживних середовищах (середа Павлової, Даймонда та ін.).

Різні штами амеб неоднакові за своєю вірулентністю для людини, від чого й залежить патогенез захворювання.

Життєвий цикл. При попаданні в тонку кишку людини оболонка цисти руйнується, і з неї виходить чотирьохядерна материнська клітина амеби. Після поділу утворюються 8 одноядерних паразитів, які перетворюються у вегетативні форми, що заселяють товсту кишку господаря. Механізм проникнення амеб в стінку кишки пов'язаний з виділенням ними протеолітичних ферментів. Паразити руйнують епітелій кишки, що супроводжується некрозом і утворенням виразок.

Лямблії

Тип Sarcomastigophora, підтип Mastigophora клас Zoomastigophorea, загін Diplomonadida.

Збудник лямбліозу Lamblia intestinalis був відкритий Д. Лямблем в 1859 р. Він належить до роду Gardia, що включає більше 100 видів, паразитує в організмі багатьох хребетних. Специфічним паразитом людини є L. intestinalis, що мешкає в дванадцятипалій кишці і верхніх відділах тонкого кишечника.

Довжина паразита становить приблизно 15 мкм, ширина в його передній частині 7-8 мкм. Форма клітини грушоподібна, загострена до заднього кінця. В її передній частині є присмоктувальний диск, за допомогою якого лямблії щільно прикріплюються до епітеліальних клітин тонкої кишки. По поздовжній осі проходять 2 опорні нитки - аксостилі, що розділяють тіло паразита на симетричні половини, які мають ядро з великою каріосомою в середині. Від кожної половини відходять 4 джгутика (всього 8).

Присмоктувальний диск створює негативний тиск між паразитом і мікроворсинками кишечника, що порушує всмоктування в тонкій кишці амінокислот, якими і харчуються самі лямблії. Рух поступальний, іноді обертальний. Харчування лямблій здійснюється осмотично, розмноження – шляхом поздовжнього поділу.

Цисти овальної форми (8-14 мкм), оточені щільною прозорою оболонкою. Усередині цист є складний малюнок (ядра, аксостилі, джгутики).

Трихомонади

Тип Sarcomastigophora, підтип Mastigophora, клас Zoomastigophorea, загін Trichomonadida. Трихомонади відносяться до роду Trichomonas Davaine, який включає велику кількість видів, що паразитують в організмі різних хребетних. Паразитами людини є представники 3 видів: Trichomonas hominis, що мешкає в кишковому тракті, T. tenax (T.clongata) – паразит порожнини рота і T. vaginalis (Donne) – паразит урогенітального тракту.

Trichomonas hominis паразитує в товстому кишечнику. Клітини паразитів мають грушоподібну форму, довжина становить 7-20 мкм. На передньому кінці розташовані 4 джгутика, що відходять від базальних зерен. Через всю цитоплазму, від області базальних зерен до кінця клітини, проходить опорна еластична нитка (аксостиль). Крім того, з одного боку тіла паразита є ундулююча мембрана, за хвилеподібним рухом якої його розпізнають. Ядро сферичної форми розташоване в передній частині клітини. З краю є щілинне поглиблення ("джгутикова кишеня"), через яке відбувається захоплення їжі (бактерій) за допомогою

фагоцитозу. У цитоплазмі іноді видно харчові вакуолі, що містять бактерії. Окремі види трихомонад відрізняються також один від одного будовою ундулюючої мембрани. Розмножуються трихомонади агамно, поздовжнім поділом.

Трихомонади – рухливі організми, швидко пересуваються за допомогою джгутиків і ундулюючої мембрани. Стадія цисти відсутня. Трихомонади добре ростуть на поживних середовищах в присутності бактерій, якими харчуються.

Лейшманії

► В організмі людини лейшманії розвиваються внутрішньоклітинно у вигляді амастиготної (безжгутикової) або тканинної форми у вільних макрофагах.

► Амастиготи – дрібні овальної форми клітини з ядром і кінетопластом.

► За Романовським-Гімзе – цитоплазма забарвлюється в блакитний колір, ядро – в червоно-фіолетовий, кінетопласт – в рубіновий.

► Розмножується шляхом простого поділу.

► Самки москітів заражаються при поглинанні крові людини або тварин, хворих на лейшманіоз.

► Амастиготи, що потрапили в шлунок переносника, перетворюються в джгутикові форми, які розмножуються і накопичуються в його глотці.

► Промастиготи мають веретеноподібну витягнуту форму і джгутик, який відходить від кінетопласта.

Трипаносоми

► Довгастої форми

► Мають ядро, джгутик, ундулюючу мембрану

► Розмножуються поздовжнім поділом

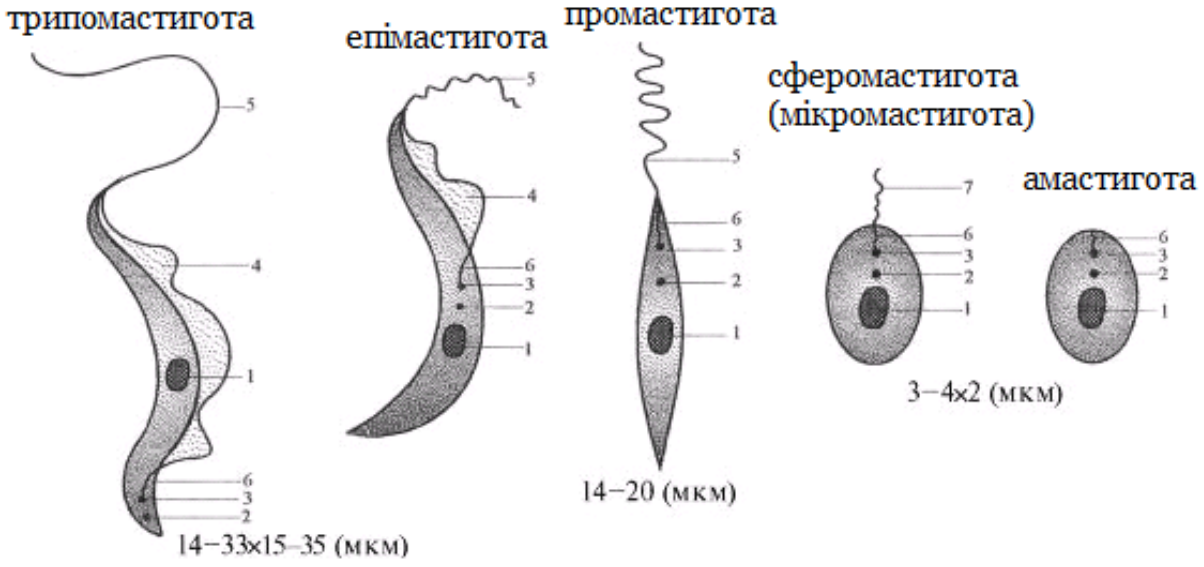
► Забарвлення - за Романовським-Гімзе

► Мають кілька стадій розвитку:

► **Епімастиготи** – ростуть в кишечнику переносників і на поживних середовищах;

► **Трипомастиготи** – знаходяться в крові тварин і людини (ундулююча мембрана різко виражена);

► **Амастиготи** – не мають джгутика, овальної форми; мешкають в м'язах та ін. тканинних клітинах.



ду ıу

ст ює

Розвиток збудника здійснюється в епітеліальних клітинах кишечника котів (коти є остаточними господарями). Усередині цих клітин утворюються незрілі цисти (форма існування, вкрита оболонкою), які виділяються з фекаліями котів в зовнішнє середовище і знаходяться у ґрунті. Через 3-7 днів утворюються ооцисти – запліднені цисти з більш міцною оболонкою і готові до самостійного поділу, які зберігаються в ґрунті протягом 1,5-2 років і у такому вигляді можуть потрапляти в організм людини (людина є проміжним господарем).

У людини токсоплазма також потрапляє в епітеліальні клітини кишечника і тканинні макрофаги та починає проходити наступні стадії життєвого циклу: трофозоіди (паразити, що розмножуються – вони заповнюють уражені клітини) і потім – тканинні цисти (це стабільна форма, яка тривалий час перебуває в організмі; при їх руйнуванні вивільняються токсоплазми і відбувається рецидив захворювання).

Для кожної форми розвитку є свій спектр стійкості та чутливості, що має значення при профілактиці та лікуванні:

- цисти і ооцисти стійкі до хімічних препаратів і фізико-хімічних чинників, тривалий час зберігаються в ґрунті (до 2 років) при високих і низьких температурах.
- трофозоїт чутливий до піріметацину, стрептоміцину, сульфаніламідів, тетрациклінів; швидко гине під впливом дезінфектантів, також висушуванні і прогріванні.

Малярійні плазмодії:

Plasmodium vivax - збудник триденної малярії (відкритий у 1890 р. – В.Грассі і Р.Фелетті),
P. malariae - збудник чотириденної малярії (відкритий у 1880 р. – А. Лавераном),
P. falciparum - збудник тропічної малярії (відкритий у 1897 р. – У. Уелчем),
P. ovale - збудник малярії овале (типу триденної – відкритий у 1922 р. – Ж. Стівенсоном).

Морфологія плазмодія в товстій краплі

При проведенні дослідження необхідно враховувати те, що посередині в більш товстій частині краплі ймовірність виявлення паразитів велика, проте вони тут менш пофарбовані, ніж по краю. У більш тонкій частині краплі форма паразитів краще зберігається.

У товстій краплі *P. vivax* відрізняється від інших збудників значною величиною і поліморфізмом. Кільцеподібні трофозоїти рідко зберігають форму, найчастіше вони розірвані, при цьому до невеликого ядра прилягає шматочок цитоплазми круглої, подовженої або трикутної форми (при подовженій формі цитоплазма з ядром нагадує знак оклику). Якщо розрив цитоплазми стався напроти ядра, то обидві половинки її розташовуються з двох сторін від ядра, в результаті чого утворюється фігура, що нагадує ластівку.

Зазвичай виявляються і зрілі шизонти, цитоплазма яких часто розірвана, а біля ядра розташовуються кілька грудочок цитоплазми різного розміру. Частину шизонтів неможливо відрізнити від гаметоцитів, тому як диференціальні ознаки в товстій краплі стираються. Морули в товстій краплі розпізнаються легко, тому що мерозоїти в них зібрані навколо купки темно-бурого пігменту.

В добре забарвленій товстій краплі частина еритроцитів зберігається у вигляді ніжних рожевих дисків з зернистістю Шюффнера, на тлі їх лежать паразити. Ця ознака дуже важлива, тому що вона відсутня у інших видів плазмодіїв (слід мати на увазі, що в ряді випадків уражені еритроцити вилуговуються повністю). Залишки уражених еритроцитів в товстій краплі зберігаються і при *P. ovale*.

Кільцеподібні трофозоїти *P. malariae* в товстій краплі не відрізняються від кілець P. vivax. Шизонти мають вигляд добре окреслених, круглих або овальних грудочок, без вакуолей. Незрілі шизонти менше зрілих. Морула добре зберігається, 6-12 мерозоїтів розташовані навколо купки пігменту. Паразити вільно лежать поза клітинами, уражені еритроцити повністю вилуговуються.

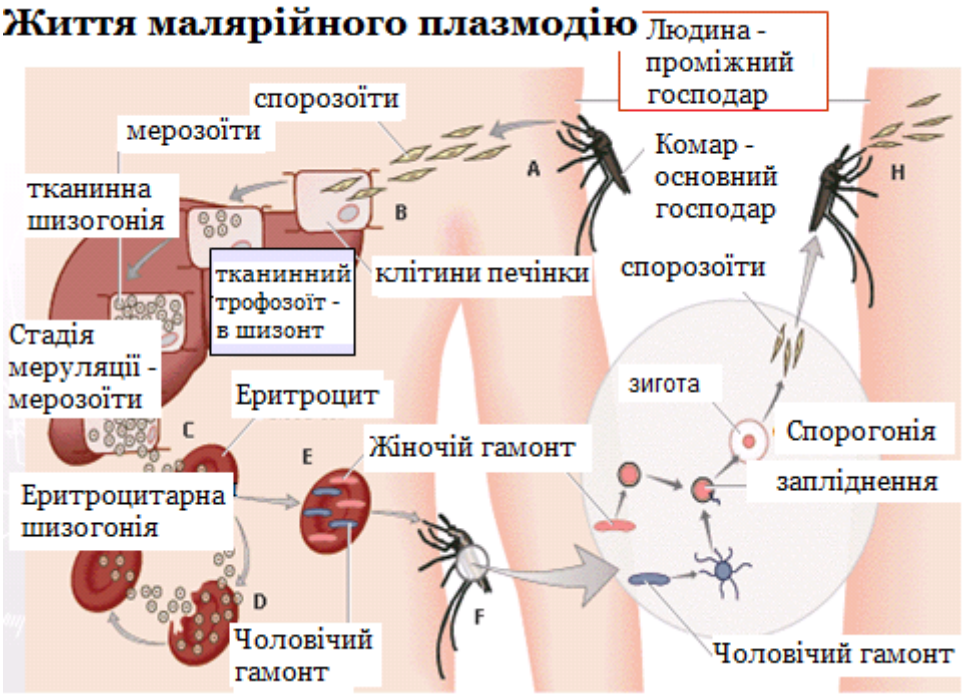
Дрібні кільця *P. falciparum* нерідко зберігають свою форму, а великі деформуються. Гаметоцити легко визначити за їх характерною формою. Уражені еритроцити повністю вилуговуються.

При складнощах в діагностиці слід провести повторне дослідження крові. У випадках триденної (через добу) і чотириденної (через дві доби) малярії при повторному дослідженні крові хворого виявляються амебоподібні трофозоїти, а при тропічній – тільки кільцеподібні.

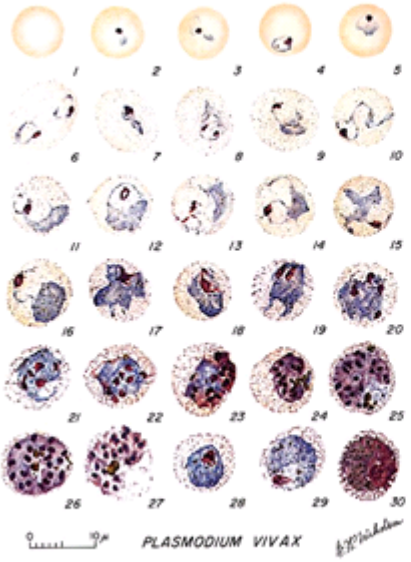
Добре помітні морули: непорушена морула P. vivax складається з 12-18 мерозоїтів, а скупчення темно-бурого пігменту знаходиться ближче її периферії; морула P. malariae складається з 8-12 мерозоїтів, зібраних у вигляді розетки навколо золотисто-жовтого пігменту; морула *P. falciparum* складається з 12-24 мерозоїтів, ближче до її периферії купкою розташовується майже чорний пігмент.

При дослідженні товстої краплі слід звертати увагу на поліхромазію, тому що, чим більше паразитів у хворого, тим більшу кількість еритроцитів вони руйнують, тим більше виражена поліхромазія в товстій краплі (результат посиленого надходження в кров молодих, незрілих еритроцитів).

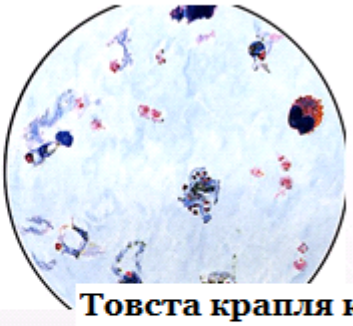
Необхідно враховувати і те, що **під впливом хіміотерапевтичних препаратів малярійні паразити змінюються**: їх ядра можуть ставати компактнішими, інтенсивніше забарвленими або бути більш пухкими, гіпохромними. Цитоплазма може набувати склоподібний відтінок, вакуолізуватися і розпадатися. Під дією акрихіну пігмент виштовхується з паразита, що ускладнює, а іноді робить неможливим розпізнавання малярійного плазмодія в товстій краплі.



Plasmodium vivax в препаратах крові



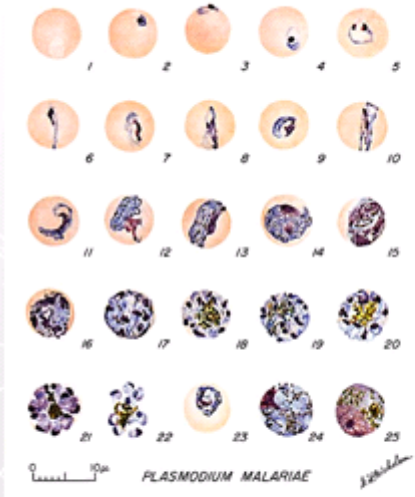
Тонкий мазок крові



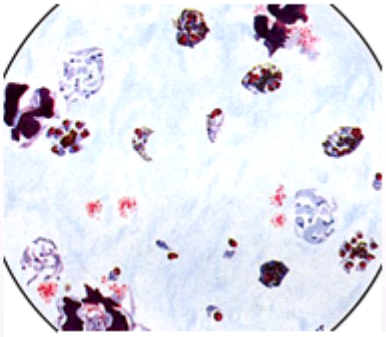
Товста крапля крові

- Трофозоїт має форму кільця;
- Уражені еритроцити збільшені, в них - зернистість "зерна Шюффнера"

Plasmodium malariae в препаратах крові



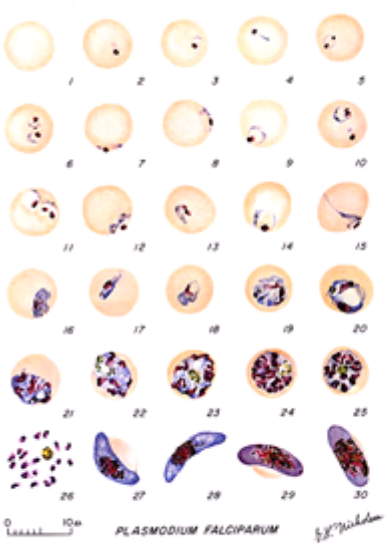
Тонкий мазок крові



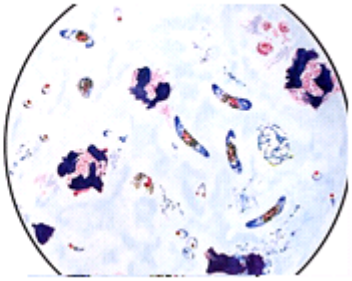
Товста крапля крові

- Напівдорослий трофозоїт має лентовидну форму;
- Мерозоїти розташовані у вигляді "розетки"

Plasmodium falciparum в препаратах крові



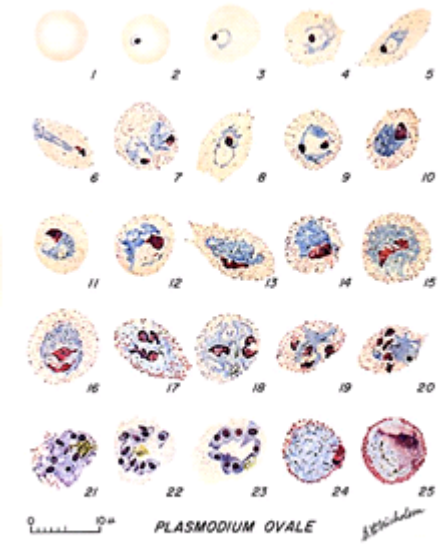
Тонкий мазок крові



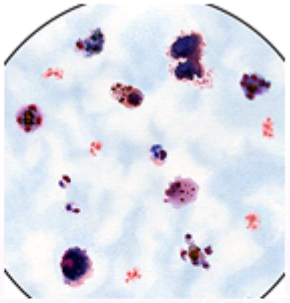
Товста крапля крові

- Юні форми у вигляді дрібних кілець;
- Уражені еритроцити збільшені, в них великі рожево-фіолетові плями "Мауера"

Plasmodium ovale в препаратах крові



Гонкий мазок крові



Товста крапля крові

- У стадії кільця в еритроциті має велике ядро;
- Еритроцити збільшені, в них - крупна зернистість "зерна Джеймса"

Теоретичні питання:

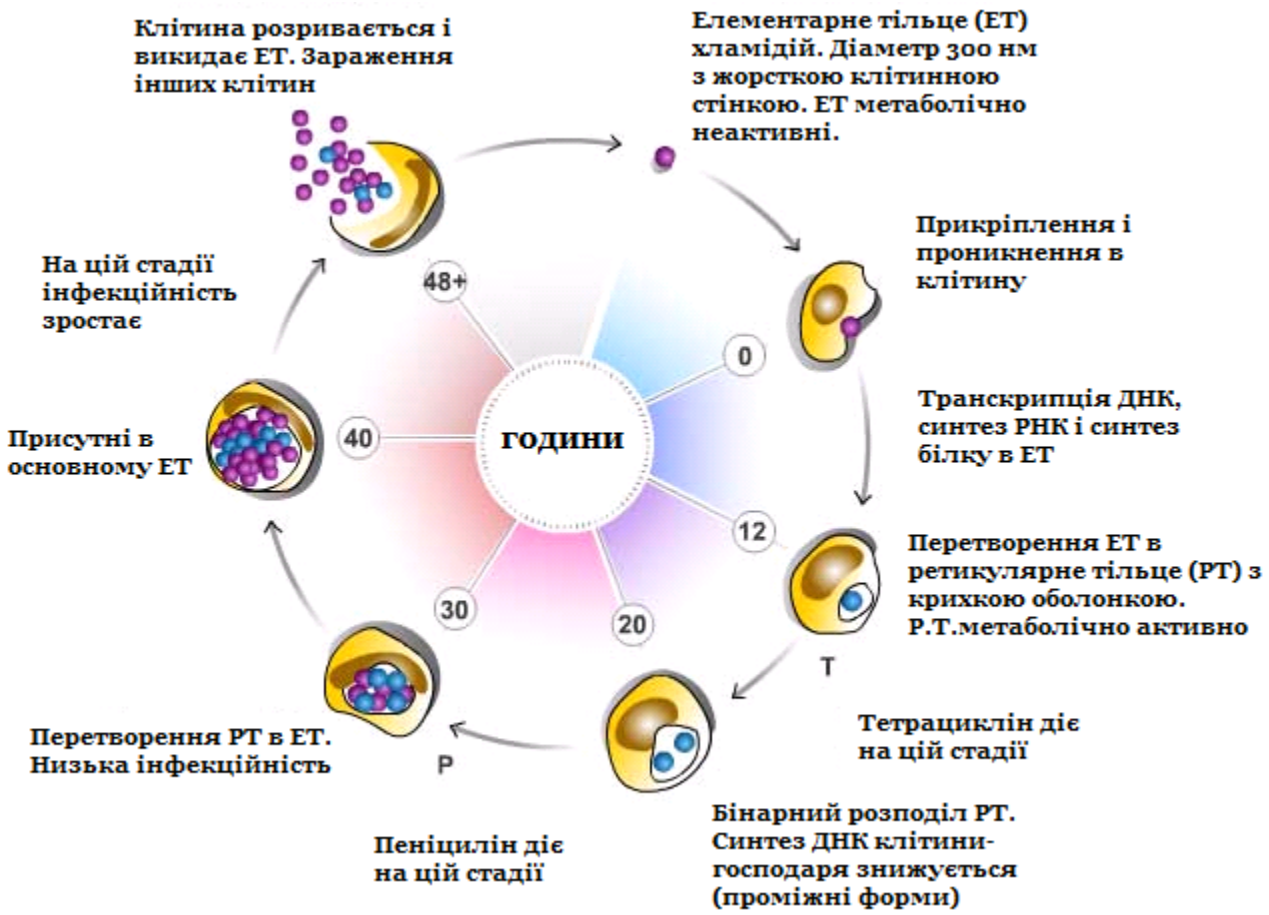
1. Класифікація найпростіших.
2. Структура клітин найпростіших (еукаріотів).
3. Порівняльна характеристика клітинної будови прокаріотів і еукаріотів.
4. Методи фарбування найпростіших.
5. Можливість дослідження нативних препаратів для діагностики протозойних інфекцій.
6. Пріоритет вітчизняних вчених у вивченні деяких протозойних інфекцій. Роботи В.А. Леша, Е.А. Марциновського, П.Ф.Боровського.

Протокол № 7

Тема: ***Морфологія рикетсій, хламідій та мікоплазм.***
Мета: ***Вивчити морфологію та методи виявлення рикетсій, хламідій та мікоплазм.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів:
а) рикетсії (фарбування за Здродовським; б) рикетсії (фарбування за Романовським-Гімзою), в) хламідії у клітинах слизової уретри (фарбування за Романовським-Гімзою); г) мікоплазми (фарбування за Романовським-Гімзою).

Схема циклу розвитку хламідій



2. Дайте визначення. Наведіть приклади рикетсій та мікоплазм, які є патогенними для людини.

Рикетсії - _____
_____
_____

Методи фарбування рикетсій:

I. _____

II. _____

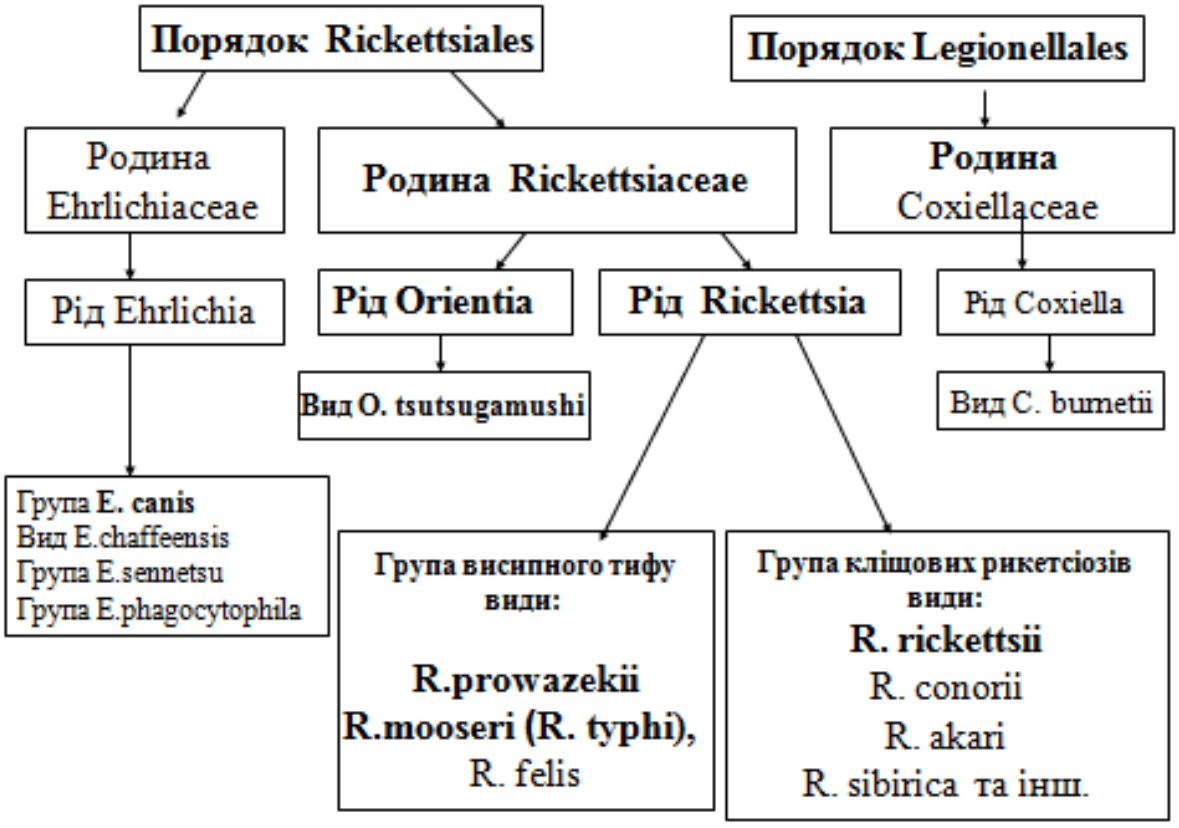
Мікоплазми - _____
_____
_____

Методи фарбування мікоплазм:

I. _____

II. _____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА



Рикетсії

Група	Представники	Хвороби людей	Резервуар	Переносник
Висипного тифу	R.prowazekii	Епідемічний висипний тиф	Людина	Воші
	R.typhy	Ендемічний щурячий (блошиний) висипний тиф	Щури, миші	Блохи
	R.felis	Каліфорнійський щурячий тиф	Опосуми	Блохи
Кліщових рикетсіозів (плямисті лихоманки)	R.rickettsii	Плямиста лихоманка скелястих гір	Гризуни	Кліщі
	R.conorii	Марсельська лихоманка	Кліщі, гризуни	Кліщі
	R.akari	Везикулярний віспо-подібний рикетсіоз	Гризуни	Кліщі
	R.sibirica	Північноазіатський рикетсіоз	Ховрахи, хом'яки	Кліщі
Цуцугамуші (тифу джунглів)	Orientia tsutsugamushi	Лихоманка цуцугамуші (чагарниковий тиф)	Гризуни, кліщі	Личинки кліщів
Тропічна панцитопенія собак	Ehrlichia canis	Моноцитарний ерліхіоз	Олені, собаки	Кліщі

Морфологія рикетсій

• Розміри – 0,3-0,6 × 0,8-3 мкм;
• Поліморфізм (паличкоподібна, кокоподібна і ниткоподібна форми);
• Не утворюють спор (виняток – C. burnetii);
• Мають мікрокапсулу;
• Грамнегативні

Тинкторіальні властивості

• *Метод Романовського-Гімзе* (кокоподібні форми – рожевий колір, паличкоподібні – блакитний);

• *Метод Макіавеллі-Здродовського* (рикетсії – рожевий колір, протоплазма клітин – блакитний, ядра – синій);

• *Сріблення за Морозовим* (рикетсії – темно-коричневі на світлому фоні).

Хламідії

Родина Chlamydiaceae відділ Gracilicutes включає один рід Chlamydia (від грец. Chlamydos, плащ - мантія, тому як в уражених клітинах вони утворюють включення, оточені оболонкою, що нагадує мантію).

Згідно з останньою класифікацією, родину Chlamydiaceae запропоновано розділяти на два роди: рід Chlamydia, представлений видом C. trachomatis, і рід Chlamidophila, в який включені види C. psittaci і C. pneumoniae.

Хламідії – унікальна група дрібних патогенних грамнегативних нерухомих бактерій, що є збудниками різних хвороб людини і тварин. У 1907 р. С. Провачек виявив збудника трахоми і назвав його «Chlamydozoa» в зв'язку з тим, що утворені ними внутрішньоклітинні мікроколонії (тільця Гальберштедтера-Провачека) були оповиті мантією «хламидою». Їх головна біологічна особливість полягає в тому, що вони розмножуються тільки в цитоплазмі еукаріотичних клітин за унікальним серед організмів циклом розвитку. На відміну від вірусів, хламідії містять як ДНК (ядерний апарат), так і рибосоми. Вони мають клітинну стінку, хімічний склад якої подібний

складу клітинної стінки грамнегативних бактерій, і розмножуються шляхом поперечного ділення. Разом з тим, подібно до вірусів і рикетсій, хламідії – облігатні внутрішньоклітинні паразити, тому що їх метаболізм залежить від метаболізму клітини-господаря. Ця залежність проявляється в нездатності хламідій синтезувати свої власні високоенергетичні сполуки, такі, як АТФ, і відсутності цитохромів, тобто вони є «енергетичними паразитами» і тому не здатні розмножуватися поза живої клітини.

Класифікація хламідій, патогенних для людини

Вид	Біовар	Серовари хламідій	Захворювання
	Трахома (Trachoma) Лімфогранульома венерум (LGV)	A, B, B_a, C	Трахома та паратрахома
Chlamydia trachomatis		Від D до K L_1,L_2,L_{2a},L_3	Урогенітальний хламідіоз і пневмонія новонароджених Венерична лімфогранульома
Chlamydia psittaci	–	8 сероварів	Орнітоз (пситтакоз)
Chlamydia pneumoniae	TWAR	TWAR, AR, RF, CWL	Пневмонія, ОРЗ, атеросклероз, саркоідоз, бронхіальна астма

Основні стадії життєвого циклу хламідій:

1) **елементарні тільця** - дрібні (0,2-0,5 мкм) електронно-щільні кулясті структури, що мають компактний нуклеоїд і ригідну тришарову клітинну стінку;

2) **ініціальні (вихідні), або ретикулярні тільця** – великі (0,8-1,5 мкм в діаметрі) сферичні утворення, що мають сітчасту структуру з тонкою клітинною стінкою і фібрилярним нуклеоїдом;

3) **проміжні тільця** – проміжна стадія між елементарними і ретикулярними тільцями.

Елементарні тільця є інфекційною, а ретикулярні – вегетативною формою хламідій. Вегетативні форми розмножуються шляхом бінарного поділу внутрішньоклітинно, але не є інфекційними, коли виділяються з клітини-господаря. Життєвий цикл хламідій починається з того, що елементарні тільця фагоцитуються клітиною-господарем, а потім протягом декількох годин реорганізуються, збільшуються в розмірах і перетворюються на ретикулярні форми, які розмножуються шляхом поперечного поділу. Утворені дочірні форми також розмножуються шляхом бінарного поділу. Життєвий цикл закінчується, коли виникаючі проміжні форми реорганізуються (ущільнюються), зменшуються в розмірах і перетворюються в елементарні тільця. Розмножуючись всередині цитоплазматичних везикул, хламідії утворюють мікроколонії, оточені мембраною, яка виникає із впинання мембрани клітини при фагоцитозі елементарного тільця. У складі мікроколоній виявляються всі 3 стадії розвитку хламідій. В одній клітині може бути кілька мікроколоній, що утворюються в разі фагоцитозу декількох елементарних тілець. Після розриву стінки везикули і мембрани клітини-хазяїна, новоутворені хламідії вивільняються, і елементарні тільця, інфікуючи інші клітини, повторюють цикл розвитку. Для мікроскопічного виявлення хламідій в інфікованих клітинах (тканинах) застосовують різні способи фарбування: Романовського-Гімзе, Кастенаді, Макіавеллі і ін. При фарбуванні за Романовським-Гімзою вони набувають блакитний або фіолетовий колір. Однак хламідії добре видно і в незабарвленому стані при мікроскопії вологих препаратів під склом за допомогою

фазово-контрастної оптичної системи. В оптимальних умовах зростання в еукаріотичних клітинах життєвий цикл хламідій становить 17-40 год. Хламідії добре розмножуються в жовтковому мішку курячих ембріонів при температурі від 33 до 41 ° С (в залежності від виду), а також в культурах клітин різних хребетних. Зміст Г + Ц в ДНК хламідій варіює від 39 до 45 мол%, відношення РНК / ДНК в елементарних тільцях у 2 рази менше, ніж в ретикулярних. У С. trachomatis виявлено дві важливі метаболічні ознаки: здатність синтезувати глікоген і попередників фолієвої кислоти, за якими (з урахуванням інших ознак) вони легко диференціюються від інших видів - С. psittaci і С. pneumoniae:

Диференційні ознаки трьох видів Chlamydia

Chlamydia trachomatis	*Chlamydia psittaci*	*Chlamydia pneumoniae*
1. Форма елементарних тілець сферична 2. Внутрішньоклітинні колонії зазвичай компактні. Хламідії синтезують глікоген, який виявляється йодною пробою 3. Хламідії синтезують суттєво важливі попередники фолієвої кислоти, тому розмноження їх в курячих ембріонах – пригнічується сульфадіазином (1 мг / ембріон) 4. Ступінь гібридизації ДНК зі штамами С. psittaci і С. pneumoniae не більше 10%	1. Форма елементарних тілець сферична 2. Мікроколонії всередині клітин менш компактні, і хламідії часто розташовуються по всій цитоплазмі, глікогену не утворюють 3. Хламідії не синтезують попередників фолієвої кислоти, тому їх зростання в жовтковому мішку курячих ембріонів не пригнічується сульфадіазином (1 мг / ембріон) 4. Ступінь гібридизації ДНК зі штамами С. trachomatis і С. pneumoniae не більше 10%	1. Форма елементарних тілець грушоподібна 2. Внутрішньоклітинні колонії схожі з мікроколоніями С. psittaci, хламідії глікоген не синтезують 3. Хламідії не синтезують попередників фолієвої кислоти, тому до сульфадіазину не чутливі. У курячому ембріоні ростуть погано. 4. Ступінь гібридизації ДНК зі штамами С. trachomatis і С. psittaci не більше 10%

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Хламідії – це дрібні грамнегативні бактерії кулястої або овоїдної форми. Не утворюють спор, не мають джгутиків і капсули.

Будова клітинної стінки хламідії відрізняється від інших бактерій: вона являє собою двошарову мембрану, що відмежовує периплазму, не містить (або містить в невеликій кількості) N-ацетилмурамову кислоту – основний компонент пептидоглікану. Ригідність клітинної стінки надають пептиди, перехресно зшиті пептидними містками. У іншому хламідії схожі з іншими грамнегативними бактеріями. Вони мають гліколіпіди, аналогічні ЛПС зовнішньої мембрани клітинної стінки грамнегативних бактерій, і при фарбуванні за Грамом набувають червоного кольору. Основним методом виявлення хламідій є метод забарвлення за Романовським - Гімзою.

Хламідії поліморфні, що пов'язано з особливостями їх репродукції. Унікальний цикл розвитку хламідій характеризується чергуванням двох різних форм існування – ***елементарних*** і ***ретикулярних*** (або ініціальних) тілець.

Елементарні тільця – це дрібні (розмір 0,2-0,3 мкм) метаболічно неактивні інфекційні частинки, які розташовуються поза клітиною. Вони мають товсту оболонку, що складається з внутрішньої і зовнішньої мембран, що визначає їх відносно високу стійкість до несприятливих

умов навколишнього середовища. Елементарні тільця забарвлюються за Романовським - Гімзою в червоний колір. Усередині клітин елементарні тільця трансформуються в ретикулярні тільця.

Ретикулярні тільця є вегетативною формою хламідій, зазвичай мають овоїдну форму і крупніші за елементарні тільця в декілька разів (їх розмір 0,4 + 0,6х0,8-5-1,2 мкм). Вони розташовуються внутрішньоклітинно близько ядра і фарбуються за Романовським - Гімзою в блакитний або фіолетовий колір. Інфекційність ретикулярних тілець в порівнянні з елементарними вкрай мала.

Репродукція хламідій. Розмноження хламідій, які є облігатними внутришньоклітинними паразитами, відбувається в клітинах, переважно епітеліальних. Елементарні тільця індукують фагоцитоз і захоплюються клітиною-мішенню, потрапляючи в неї шляхом ендоцитозу. Після поглинання елементарні тільця опиняються всередині фагосоми та блокують її злиття з лізосомами. Завдяки цій своїй особливості елементарні тільця «уникають» контакту з лізосомальними ферментами і безперешкодно розмножуються всередині фагосоми. Усередині клітин елементарні тільця трансформуються в ретикулярні, які, в свою чергу, багаторазово діляться бінарним поділом, потім ущільнюються і перетворюються в елементарні тільця. В кінці циклу останні займають більшу частину клітини хазяїна. Розтягуючи стінку вакуолі, вони розривають її, а потім і плазматичну мембрану клітини. Цикл розвитку хламідій триває 24-48 год і завершується загибеллю клітини хазяїна і виходом елементарних тілець. Останні, звільнившись, інфікують сусідні інтактні клітини, і цикл повторюється.

Хламідії розмножуються бінарним поділом.

Життєвий цикл хламідій

1 - прикріплення елементарного тільця (ЕТ) до епітеліальної клітини;
2 - проникнення ЕТ в клітину за допомогою піноцитозу;
3 - блокада фагосомо-лізосомального злиття;
4 - перетворення ЕТ в ретикулярне тільце (РТ);
5 - бінарний розподіл РТ;
6 - дозрівання ЕТ всередині РТ;
7 - вивільнення ЕТ з клітини.

Хламідії лабільні до дії високих температур (гинуть при 60°С за 10 хв), але довго зберігаються при низькій температурі. Всі види хламідій чутливі до дії антисептиків і дезінфектантів. Під впливом несприятливих факторів хламідії можуть утворювати L-форми.

Хламідії – «енергетичні паразити». Вони не здатні самостійно синтезувати високоенергетичні сполуки і забезпечувати власні потреби в енергії. Нормальний розвиток хламідій можливоий тільки в умовах внутрішньоклітинного паразитування (Джерело: http://meduniver.com/Medical/Microbiology; http: //www.studfiles).

Мікоплазми

Мікоплазми – дрібні поліморфні мікроорганізми, які не мають ригідної клітинної стінки. Мікоплазми утворюють кокоподібні, розгалужені, великі багатоядерні форми, а також псевдоміцелій, що обумовлює їх назву [від грец. mykes, гриб, + plasma, щось сформоване]. Мікоплазми розмножуються бінарним поділом, подібно до більшості бактерій, особливо після утворення дрібних кокоподібних утворень (елементарні тільця, ЕТ) в ниткоподібних структурах.

Мікоплазми здатні до брунькування і сегментації. Мінімальною одиницею, що репродукується, вважають ЕТ (0,7-0,2 мкм). Основний компонент клітинної мембрани - холестерин. Мікоплазми не здатні до утворення холестерину і утилізують його з тканин або поживних середовищ, доповнених їх внесенням.

За Грамом забарвлюються негативно, але кращі результати дає забарвлення за Романовським-Гімзою.

В організмі людини мешкають 14 видів мікоплазм, але зустрічаються різні види мікоплазм з різною частотою.

• **Mycoplasma orale** та **Mycoplasma salivarium** - входять до складу нормальної мікрофлори порожнини рота

• **Mycoplasma pneumoniae** – поширений збудник пневмонії у дорослих і дітей

• **Ureaplasma urealyticum** і **Mycoplasma hominis** - мешкають в сечових шляхах і статевих органах

• **Mycoplasma genitalium, Mycoplasma fermentans** і **Mycoplasma penetrans** – збудники мікоплазмозу у людини, виявлені на слизовій дихальних шляхів, сечових шляхів і статевих органів.

З числа мікоплазм, виділених від людини, медичне значення мають наступні види:

Mycoplasma pneumoniae,

Mycoplasma hominis,

Mycoplasma genitalium,

Mycoplasma incognitus,

Ureaplasma urealyticum.

(Джерело: http://meduniver.com/Medical/Microbiology/618.html MedUniver)

Теоретичні питання:

1. Таксономія рикетсій.
2. Морфологія рикетсій та їх класифікація за формою.
3. Методи фарбування рикетсій.
4. Представники рикетсій, які є патогенними для людини.
5. Таксономія хламідій та іх класифікація, патогенні представники.
6. Біологічна особливість хламідій. Основні стадії життєвого циклу хламідій.
7. Морфологія хламідій, ретикулярні тільця, елементарні тільця.
8. Методи виявлення цитоплазматичних включень хламідій. Практичне використання тілець включень.
9. Таксономія мікоплазм. Класифікація, патогенні представники.
10. Ультраструктура і морфологія мікоплазм.
11. Методи фарбування мікоплазм.
12. Представники мікоплазм, які є патогенними для людини.

Протокол № 8

Тема: ***Морфологія вірусів людини і бактеріофагів.***
Мета: ***Вивчення морфології вірусів людини, бактеріофагів і пріонів.***

1. Дайте визначення.

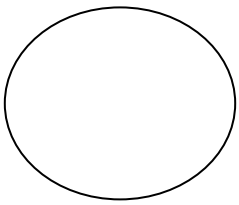
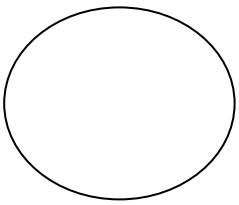
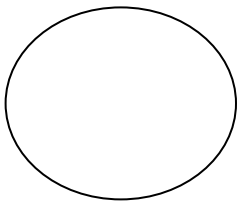
Віруси - _____
_____
_____
_____

Пріони - _____
_____
_____
_____

2. Основні ознаки вірусів:

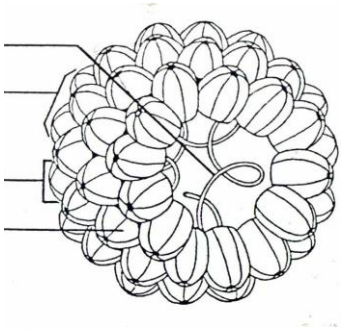
1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

3. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів: а) тільця Бабеша-Негрі; б) тільця Пашена; в) тільця Гварнієрі.

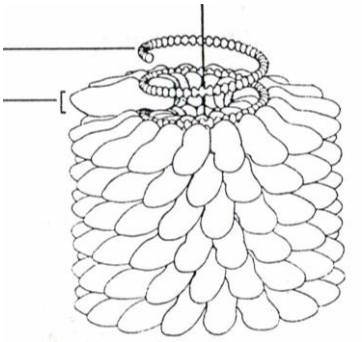




Особливості складу вірусів:

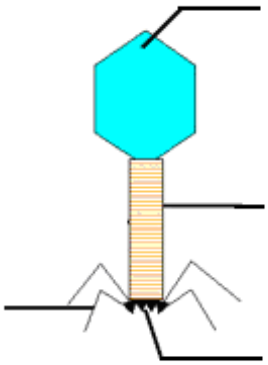
а) Кубічний тип симетрії



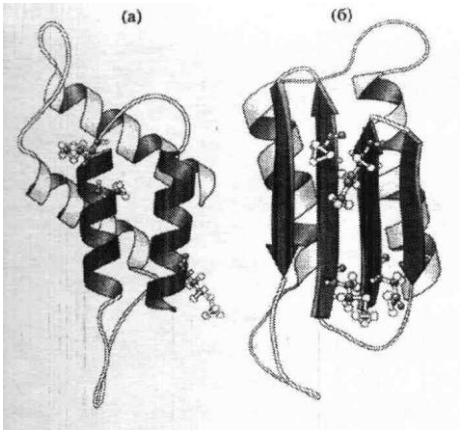
б) Спіральний тип симетрії



Особливості складу бактеріофагів:



Особливості складу пріонів:



ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

ВІРУСИ – особливе царство ультрамікроскопічних розмірів організмів, що мають тільки один тип нуклеїнових кислот, позбавлені власних систем синтезу білка і мобілізації енергії і тому є абсолютними внутрішньоклітинними паразитами.

Властивості вірусів.

1. Ультрамікроскопічні розміри;
2. Містять нуклеїнову кислоту тільки одного типу (ДНК або РНК);
3. Не здатні до зростання і бінарного поділу;

4. Розмножуються шляхом відтворення себе з власної геномної нуклеїнової кислоти;
5. У вірусів відсутні власні системи мобілізації енергії;
6. Немає власних систем синтезу білка;
7. Є абсолютними внутрішньоклітинними паразитами.

Молекулярно-генетична організація вірусів.

Основою таксономії вірусів є віріон (кінцева фаза розвитку).

За своєю будовою віруси поділяються на:

1) зі спіральною симетрією;

2) ізометричні віруси з кубічною симетрією;

3) з бінарною симетрією (фаги) (головка має кубічний тип симетрії, а хвостик – спіральний).

Геномна нуклеїнова кислота упакована в **капсид** (від грец. *capsa* – ящик).

Найбільш просто організовані віруси являють собою нуклеокапсиди, що складаються тільки з нуклеїнової кислоти і капсиду.

Оболонка називається **суперкапсидом** (містить ліпіди), на ній є **шипи**, які:

- розпізнають клітинні рецептори і зв'язуються з ними;
- забезпечують злиття вірусної мембрани з мембраною клітини і її лізосом;
- сприяють поширенню вірусу в організмі за рахунок злиття клітин.

● Паличкоподібну спіральну структуру мають:
- ортоміксовіруси
- параміксовіруси
- коронавіруси

● Кулястої форми:
- тогавіруси

● Форма паралелепіпеда:
- поксвіруси

Хімічний склад вірусів

● Дрібні РНК-віруси мають просту структуру: білок і нуклеїнову кислоту (віруси поліомієліта, ящура).

● Середні та великі віруси (аденовіруси, герпес) мають складну структуру:
- вміст білка – 50-80%
- нуклеїнової кислоти – 1-50%
- ліпідів – 1,5-57%
- вуглеводів – 2,8-15%

● У складі вірусних білків виявляють 16-18 амінокислот.

● pH білка – 3,5-6,0 (кисла або слабкокисла).

● Складні віруси (міксовіруси) мають фермент **нейрамінідазу** (розриває глікозидний зв'язок між нейраміновою кислотою і пептидною частиною рецепторів клітини, в результаті віріон проникає в клітину.

● У вірусу герпесу виявляється АТФ-аза - фермент.

Класифікація

№ п/п	Родина	Рід	Представник
РНК- вмісні віруси			
1.	Picornaviridae	Enterovirus Rhinovirus Hepatovirus	Віруси поліомієліту, ECHO-віруси, віруси коксаки, вірус гепатиту А, віруси ГРВІ та т.п.

		Parechovirus Aphtovirus Kobuvirus	
2.	Reoviridae	Reovirus Rotavirus	Реовіриси та ротавіруси
3.	Togaviridae	Alphavirus Rubivirus	Віруси з групи арбовірусних інфекцій Вірус краснухи
4.	Flaviviridae	Flavivirus	Вірус жовтої гарячки
5.	Bunyaviridae		Вірус Бун'ямвера
6.	Orthomyxoviridae		Вірус грипу
7.	Paramyxoviridae	 Morbillivirus Pneumovirus	Вірус парагрипу Вірус кору Респіраторно-сенцитіальний вірус
8.	Rabdoviridae	Vesiculovirus Lyssavirus	Вірус везикулярного стоматиту Вірус сказу
9.	Filoviridae	Filovirus	Віруси гарячок Марбург і Ебола
10.	Retroviridae	Lentivirus	ВІЛ
11.	Arenaviridae		Вірус лімфоцитарного хоріоменінгіту
12.	Coronaviridae		Коронавірус людини
13.	Caliciviridae		Вірус Норволк
ДНК-вмісні віруси			
14.	Poxviridae		Вірус натуральної віспи
15.	Herpesviridae	α- β- γ-	Віруси вітряної віспи й оперізуючого лишаю, простого герпесу Цитомегаловірус Вірус Епштейна Барр
16.	Adenoviridae		Аденовіруси
17.	Hepadnaviridae		Вірус гепатиту В
18.	Papillomaviridae		Папіломавіруси людини
19.	Polyomaviridae		
20.	Parvoviridae		Аденоасоційовані віруси

Пріони

Пріони являють собою клас патологічних агентів, які складаються лише з змінених білкових молекул хазяїна. Пріони не містять нуклеїнових кислот. Протеїн-пріон існує в двох формах:

- у вигляді **нормальної форми**, яка зустрічається в клітинах головного мозку в нормі – клітинна нормальна форма пріонного білка з мол. масою 33-35 кД (пріонний ген - PrNP знаходиться на короткому плечі 20-ї хромосоми людини). Нормальний PrP^c з'являється на поверхні клітини (закріплений у мембрані глікопротеїном), чутливий до протеази. Він регулює добові цикли гормонів, передачу нервових імпульсів, підтримує циркадні ритми і метаболізм міді в ЦНС. Ця форма позначається як клітинний протеїн-пріон - PrP^c (cellular – клітинний);

- **ізоформа** або PrP^{Sc} (від scrapie - хвороба овець), яка є патологічною формою і накопичується в головному мозку тільки у хворих людей і тварин (PrP^{Sc} і інші, наприклад PrP^{cjd} – патологічні, змінені посттрансляційними модифікаціями, ізоформи пріонів білку з мол. масою 27-30 кД. Такі пріони стійкі до протеолізу, до випромінювань, високої t, формальдегіду, не викликають запалення і імунної реакції. Відрізняються здатністю до агрегації в амілоїдні фібрили, гідрофобністю. PrP^{sc} накопичується в плазматичних везикулах клітини).

Молекула PrP^{Sc}, потрапляючи в тканини мозку, з'єднується з молекулою PrP^{c} і видаляє її з мембрани, утворюючи гетеродімерний проміжний продукт, який трансформується в 2 молекули PrP^{Sc}. У наступному циклі кожна з 2 PrP^{Sc} з'єднується з PrP^{c} молекулами, даючи початок 4 патологічним молекулам. У 3-му циклі кожна з 4 молекул PrP^{Sc} зв'язується з молекулами клітинного протеїн-пріону, дає початок 8 молекулам PrP^{Sc} і т.д., що і забезпечує експоненціальне зростання.

Пріони дуже стійкі до різних фізико-хімічних впливів (до кип'ятіння протягом 30-60 хв, висушування до 2-х років, заморожування, хімічній обробці спиртами, формальдегідом, кислотами, до УФ-опромінення, гамма-випромінювання, гідролізу ферментами) .

Бактеріофаги

Бактеріофаги (фаги) - це віруси, що вражають бактеріальні клітини.

Віріони фагів складаються з головки, що містить нуклеїнову кислоту вірусу, і більш-менш вираженого відростка. Нуклеокапсид головки фага має кубічний тип симетрії, а відросток – спіральний тип, тобто бактеріофаги мають змішаний тип симетрії нуклеокапсиду. Більшість фагів містять кільцеву двунитчатую ДНК, і лише деякі – РНК або однонитчату ДНК. Фаги, як і інші віруси, мають антигенні властивості і містять групоспецифічні (за якими діляться на серотипи) і типоспецифічні антигени. Сироватки, що містять антитіла до цих антигенів (антифагові сироватки), нейтралізують літичну активність фагів. Взаємодія бактеріофага з клітиною відбувається відповідно до основних типів взаємодії, характерних для всіх вірусів: продуктивна (літична), абортивна вірусна і латентна (лізогенія, вірогенія) інфекція, а також вірус-індукована трансформація.

За характером взаємодії фага з клітиною всі бактеріофаги діляться на:

• вірулентні (літичні), що викликають продуктивну інфекцію і лізис бактеріальної клітини;

• помірні, що викликають латентну інфекцію і асоціацію геному віруса з бактеріальною хромосомою. Помірні фаги, на відміну від вірулентних, не викликають загибелі бактеріальних клітин і при взаємодії з нею переходять в неінфекційну форму фага, звану профагом.

Профаг – геном фага, асоційований з бактеріальною хромосомою. Профаг, що став частиною хромосоми клітини, при її розмноженні реплікується синхронно з геномом бактерії, не викликаючи її лізису, і передається у спадок від клітини до клітини в необмеженій кількості поколінь. Бактеріальні клітини, що містять у своїй хромосомі профаг, називаються лізогенними. Профаг в лізогенних бактеріях мимовільно або під впливом різних індукованих агентів може переходити в вегетативний фаг. В результаті такого перетворення бактеріальна клітина лізується і продукує нові фагові частинки. В ході лізогенізації бактеріальні клітини можуть додатково набувати нових ознак, що детерміновані геномом вірусу. Таке явище – зміна властивостей мікроорганізмів під впливом профага – називається фаговою або лізогенною конверсією (прояв вірус-індукованої трансформації).

Помірні фаги, які нездатні ні за яких умов переходити з профага в вегетативний фаг (утворювати зрілі фагові частинки), називаються дефектними, частіше це відбувається в результаті порушення стадії збірки вірусних частинок. Деякі помірні фаги називаються трансдукуючими, оскільки за їх допомогою здійснюється один з механізмів генетичної рекомбінації у бактерій – трансдукція. Такі фаги можуть використовуватися, зокрема, в генній інженерії в якості векторів для отримання рекомбінантних ДНК і / або приготуванні рекомбінантних (генно-інженерних) вакцин.

Специфічність фагів стала підставою для їх найменування за видовою і родовою назвою чутливих до них бактерій. Так, наприклад, фаги, що лізують стрептококи, називаються стрептококовими, що лізують холерні вібріони – холерними, стафілококи – стафілококовими. За ознакою специфічності виділяють полівалентні бактеріофаги, що лізують культури однієї

родини або роду бактерій, моновалентні (монофаги) – що лізують культури тільки одного виду бактерій, а також ті, що відрізняються найбільш високою специфічністю – типові бактеріофаги, здатні викликати лізис тільки певних типів (варіантів) бактеріальної культури всередині виду бактерій.

Набори таких типоспецифічних фагів використовуються для диференціювання бактерій всередині виду – це метод фаготипування бактерій. За допомогою цього методу можна встановити джерело і шляхи передачі інфекційного захворювання, тобто провести його епідеміологічний аналіз, оскільки він дозволяє порівнювати фаготип (фаговари) чистих культур бактерій, виділених в ході бактеріологічного дослідження від хворого і від оточуючих його осіб – можливих бактерієносіїв.

Фаги отримують індукцією з лізогенних культур або з об'єктів, що містять відповідні бактерії, при культивуванні на рідкому поживному середовищі з подальшим виділенням з культуральної рідини шляхом фільтрування через бактеріальні фільтри.

Активність отриманого (виділеного) фага визначають шляхом титрування або визначення кількості фагових частинок в одиниці об'єму середовища методом агарових шарів за методом **Грациа**. Суть його полягає в тому, що на газон чутливою культури (перший шар) наносять певне розведення фага в напіврідкому агарі (другий шар). Кожна фагова частка, розмножуючись на бактеріальному газоні, утворює на поверхні культури, що виросла, стерильну пляму («бляшка», або негативна колонія фага). Таким чином, за кількістю стерильних плям можна підрахувати кількість фагових часток в одиниці середовища (титр).

Фаги можуть застосовуватися в якості **діагностичних препаратів** для встановлення роду та виду бактерій, виділених в ході бактеріологічного дослідження. Однак найчастіше їх використовують для **лікування** і **профілактики** деяких інфекційних захворювань (перорально або місцево). Активність фага висловлюють числом часток фага, що містяться в 1 мл або 1 таблетці.

Відмінною рисою бактеріофагів як терапевтичних засобів є майже повна відсутність у них побічної дії, що дозволяє призначати ці препарати різним віковим групам без будь-яких обмежень, і можливість призначення полівалентних бактеріофагів до отримання результатів бактеріологічного дослідження. Препарати діагностичних бактеріофагів вводити категорично забороняється. В даний час для фаготерапії і фагопрофілактики використовуються: полівалентний сальмонельозний бактеріофаг; моновалентні бактеріофаги - черевнотифозний, дизентерійний, протейний, синьогнійний, холерний, стафілококовий, стрептококовий, колі-фаг (кишкової палички); комбіновані препарати полівалентних бактеріофагів – коліпротейний, піобактеріофаг (що включає стафілококові, стрептококові, клебсієльозні, ешеріхіозні, протейні і синьогнійні бактеріофаги) та ін. (Джерело: http://bsmy.ru/1730).

Теоретичні питання:

1. Біологічні особливості вірусів.
2. Морфологія та ультраструктура вірусів (із визначенням специфічних термінів).
3. Електронний мікроскоп. Принцип роботи.
4. Методи непрямого виявлення наявності вірусів у організмі.
5. Методи виявлення вірусів у дослідному матеріалі з використанням імерсійної люмінесцентної мікроскопії.
6. Уявлення про люмінесцентний мікроскоп.

Протокол № 9

Тема: Харчування бактерій. Прості поживні середовища. Посів на МПБ і МПА. Методи стерилізації.

Мета: Студенти мають знати принципи культивування бактерій, правила транспортування інфекційного матеріалу, методи стерилізації та дезінфекції.

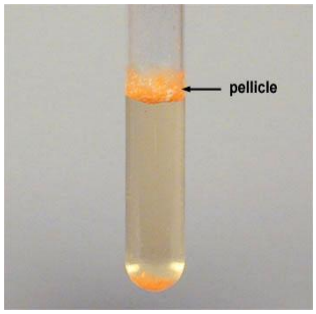
1. Вивчення набору інгредієнтів для приготування простих поживних середовищ.

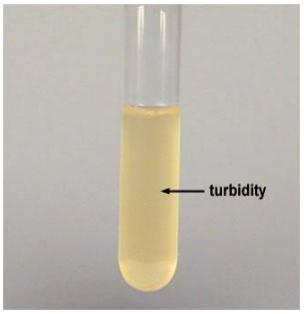
2. Ознайомлення з простими поживними середовищами (МПБ, МПА).

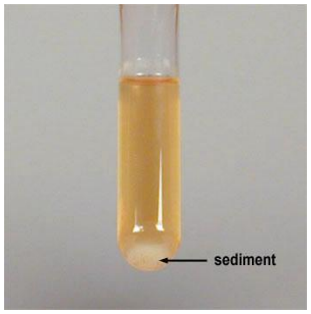
МПБ - _____
_____

МПА - _____
_____

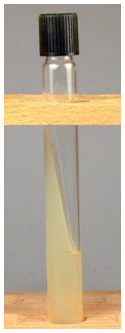
3. Ознайомлення з ознаками росту мікробів на МПБ і МПА: на МПБ – плівка, помутніння, осад; на МПА в чашці Петрі та скошеному агарі в пробірці; демонстрація правильно зробленого посіву штрихом і неправильного – рівною лінією. Колонії різних видів бактерій, що виросли на МПА в чашці Петрі.







_____ _____ _____



_____ _____

4. Приготування мазка із чистої культури кишкової палички, фарбування за Грамом, мікроскопія і зарисовка.

5. Кожен студент робить посів кишкової палички на МПБ і МПА.

6. Ознайомлення з апаратурою для стерилізації: автоклав, стерилізатор, апарат Коха та інші прилади.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Фізіологія бактерій вивчає життєдіяльність, метаболізм бактерій, питання харчування, отримання енергії, росту і розмноження бактерій, а також їх взаємодію з навколишнім середовищем. Метаболізм бактерій лежить в основі вивчення і розробки методів їх культивування, отримання чистих культур і їх ідентифікації. З'ясування фізіології патогенних і умовно-патогенних бактерій важливо для вивчення патогенезу викликаних ними інфекційних хвороб, для постановки мікробіологічної діагностики, проведення лікування і профілактики інфекційних захворювань, регуляції взаємин людини з навколишнім середовищем, а також для використання бактерій в біотехнологічних процесах з метою отримання біологічно активних речовин.

В основі фізіологічних функцій лежить безперервний обмін речовин – метаболізм, який має в своєму складі два протилежних і разом з тим взаємопов'язаних процеси:

1.**Анаболізм** (асиміляція) – сукупність біохімічних реакцій, які здійснюють синтез компонентів клітини (конструктивний обмін). Виділяють 2 групи біосинтетичних процесів: біосинтез мономерів (амінокислот, нуклеотидів, моносахарів, жирних кислот) і біосинтез полімерів (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і ліпідів).

2.**Катаболізм** (дисиміляція) – сукупність реакцій, що забезпечують клітину енергією (енергетичний обмін клітини). В процесі катаболізму в результаті ряду послідовних ферментативних реакцій відбувається розщеплення великих молекул до більш простих сполук. Катаболізм супроводжується виділенням вільної енергії, що укладена в структурах великих органічних молекул, і запасанням її в формі АТФ.

Взаємозв'язок анаболізму і катаболізму виражається в тому, що на певних етапах метаболізму маються однакові проміжні продукти, які використовуються в обох процесах. Вони називаються амфіболіти, а катаболічні і анаболічні шляхи, що їх об'єднують, мають назву – центральних (амфіболічних).

Харчування бактерій

Хімічний склад бактеріальної клітини

Бактеріальна клітина на 80-90% складається з води, і тільки 10% припадає на частку сухої речовини. Вода в клітині знаходиться у вільному або зв'язаному стані. Вона виконує механічну роль в забезпеченні тургору, бере участь в гідролітичних реакціях. Видалення води з клітини шляхом висушування призводить до припинення процесів метаболізму, припинення розмноження. Висушування мікроорганізмів в вакуумі із замороженого стану (ліофілізація) припиняє розмноження мікробів і сприяє їх тривалому збереженню.

Склад сухої речовини розподілений таким чином:

52% складають білки, 17% - вуглеводи, 9% - ліпіди, 16% - РНК, 3% - ДНК і 3% - мінеральні речовини.

Білки є ферментами, а також складовою частиною клітини, входять до складу цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) і її похідних, клітинної стінки, джгутиків, спор і деяких капсул. Деякі білки є антигенами і токсинами бактерій. До складу білків бактерій входять Д-амінокислоти, що відсутні у людини, а також діамінопімелінова кислота.

Вуглеводи представлені в бактеріальній клітині у вигляді моно-, ди-, олігосахаридів і полісахаридів, а також входять до складу комплексних з'єднань з білками, ліпідами і іншими сполуками.

Полісахариди є в складі деяких капсул, клітинної стінки; крохмаль і глікоген є запасними поживними речовинами. Деякі полісахариди беруть участь в формуванні антигенів.

Ліпіди або жири входять до складу ЦПМ і її похідних, клітинної стінки грамнегативних бактерій, а також служать запасними речовинами, входять до складу ендотоксину грамнегативних бактерій, в складі ЛПС формують антигени. У бактеріальних жирах переважають довголанцюгові насичені жирні кислоти і ненасичені жирні кислоти, що містять один подвійний зв'язок. Складні ліпіди представлені фосфатидилінозитом, фосфатидилгліцерином і фосфатидилетаноламіном. У деяких бактерій в клітині знаходяться воски, ефіри міколової кислоти. Мікоплазми – єдині представники царства *Procaryotae*, що мають в складі ЦПМ стероли. Решта бактерій в складі ЦПМ і її похідних не мають стеролів.

Нуклеїнові кислоти. В бактеріальній клітині присутні всі типи РНК: іРНК, тРНК, рРНК. Пуринові і піримідинові нуклеотиди – це ті будівельні блоки, з яких синтезуються нуклеїнові кислоти. Крім того, пуринові і піримідинові нуклеотиди входять до складу багатьох коферментів і служать для активації і перенесення амінокислот, моносахарів, органічних кислот. ДНК виконує в бактеріальній клітині спадкову функцію. Молекула ДНК складається з двох полінуклеотидних ланцюжків. Кожен нуклеотид складається з азотистої основи, цукру дезоксирибози і фосфатної групи. Азотисті основи представлені пуринами (аденін, гуанін) і піримідинами (тимін, цитозин). Кожен нуклеотид має полярність. У нього є дезоксірібозний 3'-кінець і фосфатний 5'-кінець. Нуклеотиди з’єднуються в полінуклеотидний ланцюжок за допомогою фосфодіефірних зв'язків. Зчеплення між двома ланцюгами забезпечується водневими зв'язками між комплементарними азотистими основами: аденіну з тиміном, гуаніну з цитозином. Нуклеотидні ланцюги антипаралельні: на кожному з кінців лінійної молекули ДНК розташований 5'-кінець одного ланцюга і 3'-кінець іншого ланцюга. Процентний вміст кількості гуанін-цитозин (ГЦ) в ДНК визначає ступінь спорідненості між бактеріями і використовується при визначенні таксономічного положення бактерій.

Мінеральні речовини виявляються в золі, отриманій після спалювання клітин. У великій кількості представлені мінеральні речовини: N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а також мікроелементи: Zn, Cu, Co, Ba.

Азот входить до складу білків, нуклеотидів, коферментів. Сірка входить у вигляді сульфгідрильних груп в структуру білків. Фосфор у вигляді фосфатів представлений в нуклеїнових кислотах, АТФ, коферментах. В якості активаторів ферментів використовуються іони Mg, Fe, Mn. Іони K і Mg необхідні для активації рибосом. Ca є складовою частиною клітинної стінки грампозитивних бактерій. У багатьох бактерій є сидерохроми, які забезпечують транспортування іонів Fe всередину клітини у вигляді розчинних комплексних сполук.

Класифікація бактерій за типами харчування і способам отримання енергії

Основною метою метаболізму бактерій є ріст, тобто координоване збільшення всіх компонентів клітини. Оскільки основними компонентами бактеріальної клітини є органічні сполуки, білки, вуглеводи, нуклеїнові кислоти і ліпіди, остов яких побудований з атомів вуглецю, то для росту потрібно постійне надходження атомів вуглецю.

В залежності від джерела вуглецю, мікроорганізми розподіляються на дві основні групи: автотрофи і гетеротрофи.

АВТОТРОФИ (від грецького *autos* – сам, *tropha* – живлення) здатні синтезувати складні органічні речовини, використовуючи для цього прості неорганічні сполуки. Джерелом вуглецю й азоту для цих мікроорганізмів є вуглекислота та інші неорганічні сполуки вуглецю, молекулярний азот повітря й амонійні солі. За рахунок цих простих сполук автотрофні мікроорганізми синтезують білки, жири, вуглеводи, вітаміни, ферменти.

До автотрофів (прототрофів) належать ґрунтові бактерії – нітрифікуючі, сіркобактерії, азотфіксуючі та ін.

ГЕТЕРОТРОФИ (від грец. *heteros* – інший, *tropha* – живлення) здатні асимілювати вуглець тільки з органічних сполук. Гетеротрофи, що утилізують органічні залишки відмерлих організмів у навколишньому середовищі, мають назву *сапрофіти*. Гетеротрофи, які викликають захворювання у людини або у тварини, відносяться до патогенних та умовно-патогенних. Серед них є облігатні і факультативні паразити. *Облігатні паразити* (паратрофи) здатні існувати тільки усередині клітини (віруси, рикетсії, хламідії). Культивування факультативних паразитів здійснюється на поживних середовищах. Мікроорганізми, яким для росту на поживних середовищах потрібні фактори росту (амінокислоти, пуринові та піримідинові основи, вітаміни та ін.) мають назву *ауксотрофи***.**

Білки, жири, вуглеводи і нуклеїнові кислоти є великими полімерними молекулами, які синтезуються з мономерів в реакціях поліконденсації, що протікають з поглинанням енергії. Тому для надолуження своєї біомаси бактеріям крім джерела вуглецю потрібно джерело енергії. Енергія запасається бактеріальною клітиною в формі молекул АТФ.

Організми, для яких джерелом енергії є світло, називаються **фототрофами**. Ті організми, які отримують енергію за рахунок окислювально-відновних реакцій, називаються **хемотрофами.**

Серед хемотрофів виділяють **літотрофи** (від грец. *lithos* – камінь), здатні використовувати неорганічні донори електронів (H_2, NH_3, H_2S, Fe_2 + та ін.) і **органотрофи**, які використовують в якості донорів електронів органічні сполуки.

Бактерії, що вивчаються медичною мікробіологією, є *гетерохемоорганотрофами***.** Відмінною особливістю цієї групи є те, що джерело вуглецю у них є джерелом енергії. Враховуючи різноманітність мікросвіту і типів метаболізму, далі викладання матеріалу обмежено розглядом метаболізму у гетерохемоорганотрофів.

Ступінь гетеротрофності у різних бактерій неоднакова. Серед бактерій виділяють *сапрофіти* (від грец. *sapros* – гнилий, *phyton* – рослина), які харчуються мертвим органічним матеріалом і незалежні від інших організмів, і паразити (від грец. *parasites* – нахлібник) – гетеротрофні мікроорганізми, залежні в отриманні поживних речовин від макроорганізму.

Серед паразитів розрізняють облігатних і факультативних. *Облігатні* паразити повністю позбавлені можливості жити поза клітин. До них відносяться представники родів Rickettsia, Coxiella, Ehrlichia, Chlamydia, що розмножуються тільки всередині клітин макроорганізму.

Факультативні паразити можуть жити без господаря і розмножуватися, так само як і сапрофіти, на поживних середовищах in vitro, тобто поза організмом.

Ріст і розмноження бактерій

Ріст бактеріальної клітини – це збільшення її протоплазми, що настає в результаті синтезу клітинного матеріалу в процесі харчування. Ріст бактеріальної клітини зазвичай закінчується її поділом. Поділ можна вважати завершеним, коли протоплазма дочірніх клітин розділяється перегородкою. Характерною особливістю бактерій є незвичайна швидкість їх розмноження, що обумовлено інтенсивністю їх метаболізму. Ріст бактеріальної популяції вивчається в чистих культурах на твердих і рідких поживних середовищах. Ріст бактерій в рідких поживних середовищах проявляється або у вигляді рівномірного помутніння середовища, у вигляді осаду або в утворенні плівки. На поверхні щільних поживних середовищ бактерії утворюють ізольовані скупчення клітин, які називаються колоніями. При вирощуванні бактерій на рідкому поживному середовищі спостерігається послідовна зміна окремих фаз у розвитку популяції, що відображає загальну закономірність росту і розмноження бактеріальних клітин. Після внесення в середовище, бактерії адаптуються до його умов і розмножуються порівняно повільно (лаг-фаза). Потім настає фаза експоненціального росту (логарифмічна), яка характеризується максимальною швидкістю клітинного поділу. Далі середовище виснажується, в ньому акумулюються токсичні продукти метаболізму, що проявляється зниженням темпів

розмноження і припиненням збільшення числа клітин (стаціонарна фаза). Протягом цього періоду встановлюється рівновага між клітинним ростом і поділом та процесом відмирання клітин. У певний момент співвідношення клітин, що відмирають, клітин, що знову утворюються і клітин у покої стає стабільним. Такий стан називається максимальною стаціонарної фазою. В подальшому бактеріальна культура може загинути або значно скоротитися (фаза відмирання). Фаза відмирання включає в себе період логарифмічної загибелі, що переходить в період зменшення швидкості відмирання бактерій. Спороутворюючі види переходять в стадію споруляції, у неспороутворюючих видів можливе утворення анабіотичних форм. У деяких випадках додатково виділяють фазу прискорення росту (початок експоненціальної фази) і фазу уповільнення росту (перехід до стаціонарної фази).

Ріст бактерій не завжди супроводжується поділом. Багато факторів – детергенти, антибіотики, солі жовчних кислот, УФ опромінення – затримує поділ клітин. В результаті утворюються довгі ниткоподібні форми, що значно перевищують за розмірами вихідні клітини.

Культивування бактерій в системах *in vitro* здійснюється на поживних середовищах. Штучні поживні середовища повинні відповідати наступним **вимогам:**

1. Кожне живильне середовище повинно містити воду, тому що всі процеси життєдіяльності бактерій відбуваються у воді.

2. Для культивування гетероорганотрофних бактерій середовище повинно містити органічне джерело вуглецю та енергії. Цю функцію виконують різні органічні сполуки: вуглеводи, амінокислоти, органічні кислоти, ліпіди. Найбільший енергетичний потенціал має глюкоза, тому що вона безпосередньо піддається розщепленню з утворенням АТФ і інгредієнтів для біосинтетичних шляхів. Часто використовуються в цих цілях пептон – продукт неповного гідролізу білків, що складається з полі-, оліго- і дипептидів. Пептон також поставляє амінокислоти для побудови бактеріальних білків.

3. Для синтезу білків, нуклеотидів, АТФ, коферментів бактеріям потрібно джерело азоту, сірки, фосфати та інші мінеральні речовини, в тому числі мікроелементи.

Джерелом азоту може бути пептон; крім того, більшість бактерій здатні використовувати солі амонію як джерело азоту. Сірку і фосфор бактерії здатні утилізувати у вигляді неорганічних солей: сульфатів і фосфатів. Для нормального функціонування ферментів бактеріям потрібні іони Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, які додають в живильне середовище у вигляді солей, найчастіше фосфатів.

4. Вирішальне значення для росту багатьох мікроорганізмів має pH середовища. Підтримування певного pH має значення для запобігання гибелі мікроорганізмів від продуктів обміну, що ними утворені. З цією метою у поживному середовищі найчастіше використовують фосфатний буфер. При сильному виділенні бактеріями кислот, як продуктів обміну, додають до живильного середовища карбонат кальцію.

5. Середовище повинно мати певний осмотичний тиск. Більшість бактерій здатні рости на ізотонічних середовищах, ізотонічність яких досягається додаванням NaCl в концентрації 0,87%. Деякі бактерії не здатні рости на середовищах, в яких концентрація солі нижче 1%. Такі бактерії називаються ***галофільними***. Оскільки стійкість до осмотичного тиску визначається наявністю у бактерій клітинної стінки, бактерії, що позбавлені її, мікоплазми, L-форми можуть рости на поживних середовищах, що містять гіпертонічний розчин. При необхідності до живильного середовища додають фактори росту, інгібітори росту певних бактерій, субстрати для дії ферментів, індикатори.

6. Поживні середовища повинні бути стерильними.

Класифікація середовищ

В основу класифікації покладено такі ознаки:

1.За <u>вихідними компонентами</u> розрізняють:

а) натуральні середовища – готують з продуктів тваринного і рослинного походження (м'ясо, кісткове і рибне борошно, згустки крові та ін.)

б) синтетичні середовища – готують з хімічно чистих органічних і неорганічних сполук в точно зазначених концентраціях і розчинених двічі в дистильованій воді. Їх перевага в тому, що склад їх постійний і ці середовища легко відтворювані.

2. За консистенцією виділяють: рідкі, щільні, напіврідкі поживні середовища. Для отримання середовища потрібної консистенції додають зазвичай агар-агар або желатин.

Агар – полісахарид, що одержують з водоростей. Він плавиться при температурі 100°С, але при охолодженні застигає при температурі 45-50°С. Агар додають в концентрації 0,5% – для напіврідких середовищ і 1,5-2% – для створення щільних середовищ.

Крім того, в якості щільних середовищ застосовують згорнуту сироватку крові, згорнуті яйця, картоплю, середовища з силікагелем.

3. За складом середовища поділяють на:

а) прості – м'ясопептонний агар (МПА), м'ясопептонний бульйон (МПБ), агар Хотінгера, живильний желатин, пептонна вода.

б) складні – готують, додаючи до простих середовищ кров, сироватку, вуглеводи та ін. речовини.

4. За призначенням розділяють:

а) основні – для культивування більшості мікроорганізмів.

б) спеціальні – для вирощування мікроорганізмів, які не ростуть на простих поживних середовищах (для культивування стрептококів до середовищ додають цукор, для збудника коклюшу – кров).

в) елективні і селективні – виборчі, служать для виділення певного виду мікробів, зростанню яких вони сприяють. На елективних середовищах – мікроорганізми ростуть з випередженням інших, напр. середовище Ру – згорнута кінська сироватка – на ній *Corynebacterium diphtheriae* зростає через 8-12 год., випереджаючи ріст інших мікроорганізмів, напр., стрептококів, які дають ріст через 20-24 год. На селективних середовищах – пригнічується ріст супутніх мікроорганізмів (солі жовчних кислот, пригнічуючи ріст кишкової палички, роблять середовище елективним для збудника черевного тифу). Середовища стають селективними при додаванні до них певних антибіотиків, солей, зміні pH. Напр., вісмут-сульфідний агар – селективне середовище для сальмонел.

Рідкі елективні середовища називаються середовищами накопичення (вода з pH 8,0 для розмноження холерного вібріона).

г) диференційно-діагностичні – дозволяють відрізнити один вид мікробів від іншого за ферментативною активністю (середовища Гіса з вуглеводами і індикаторами).

д) консервуючі – призначені для первинного посіву та транспортування досліджуваного матеріалу. В них запобігається відмирання патогенних мікроорганізмів і пригнічується ріст сапрофітів (гліцеринова суміш – використовується для збору випорожнень).

Методи стерилізації

Стерилізація – повне звільнення будь-якої речовини або предмета від мікроорганізмів шляхом впливу на них фізичними, хімічними, біологічними факторами.

До **фізичних методів стерилізації** відносяться:

1. Прожарювання на вогні (газовий пальник або спиртівка) – швидкий метод стерилізації. Прожарюванням стерилізують петлі, предметні скельця, дрібний інструментарій.

2. Кип'ятіння – найпростіший спосіб стерилізації, але він не завжди гарантує повне знепліднювання, якщо в матеріалі, що стерилізується, є спори.

3. Паровий – стерилізуючим агентом є водяний насичений пар при температурі – 110-132^{0}С при експозиції 60±20 хв. Це найбільш щадний метод для матеріалів, що оброблюються. Недолік полягає в тому, що, конденсуючись, пар зволожує інструменти (вироби), які стерилізуються, що може викликати корозію виробів з нестійких до неї металів, погіршує умови зберігання і підвищує небезпеку вторинного обсіменіння мікробною флорою стерилізованих виробів.

4. Стерилізація парою під тиском – найефективніший у бактеріологічній практиці спосіб стерилізації – повне і надійне знепліднювання, включаючи і спороносні бактерії. Стерилізація парою під тиском проводиться в автоклаві.

5. Стерилізація текучою парою проводиться в апараті Коха. Стерилізацію проводять протягом 30-40 хвилин з моменту виділення пари. Текучою парою стерилізують предмети, що псуються під дією високої температури. Одноразова стерилізація не забезпечує повного знепліднювання об'єктів, для цього необхідна повторна стерилізація, яка носить назву «роздрібненої стерилізації». В основу методу роздрібненої стерилізації покладено наступний принцип: вбиваючи при t = 100^{0}С вегетативні форми бактерій дають спорам проростi в вегетативні форми. Через добу знову стерилізують матеріал при t = 100^{0}С. Зазвичай після 3-ї стерилізації матеріал виявляється звільненим від бактерій і спор.

6. Тиндалізація – вид роздрібненої стерилізації при низькій температурі – нагрівання предметів протягом 5-6 днів поспіль при t = 56-58^0 С по 1 годині. Проводиться або на водяних банях або в спеціалізованих приладах з терморегулятором.

7. Пастеризація – для часткового знепліднювання рідин, які втрачають свої якості при високій температурі – молоко, вино та ін. (t = 50-60^0 С протягом 15-30 хв).

8. Гарячеповітряний – здійснюється сухим гарячим повітрям. Температура стерилізації становить 160 - 200^{0}С, а експозиція 60 хвилин.

9. Стерилізація інфрачервоним випромінюванням – досягається за рахунок теплової дії (t до 300^0) протягом 30 хв.

10. Для стерилізації методом фільтрування термолабільних рідин (лікарські препарати, біологічні препарати – сироватки, вакцини, анатоксини) використовують бактеріальні фільтри різної конструкції – мембранні і глибинні. Фільтри готуються у вигляді циліндричних свічок (фільтр Шамберлана, Беркефельда) або азбестових пластинок (фільтр Зейца). Фільтрування проводять як під вакуумом, так і під тиском.

11. Високоефективний і надійний радіаційний метод – дозволяє проводити стерилізацію в упаковці (тарі). Стерилізуючими агентами є гамма-випромінювання і прискорені електрони. Стерилізуюча доза – 2,5 М рад (25 кГр).

До **хімічних** методів належать:

1. Газовий – в якості стерилізуючих газів використовують окис етилену і формальдегіду.

2. Перекисом водню – 6% концентрації при температурі 18-20^{0}С і 50^{0}С при експозиції 6 і 3 години відповідно.

До **біологічних** методів належать:

1. Обробка бактеріофагами об'єктів зовнішнього середовища для профілактики внутрішньолікарняних інфекцій, обумовлених стафілококами, синьогнійними паличками та ін.

2. Застосування антисептичних і антибіотичних препаратів.

Теоретичні питання:

1. Метаболізм мікроорганізмів: анаболізм, катаболізм.
2. Хімічний склад бактеріальної клітини: органічні та неорганічні складові.
3. Потреба бактерій у поживних речовинах: водень, кисень, вуглець, азот, органічні фактори росту.
4. Класифікація бактерій на підставі джерел для конструктивного та енергетичного метаболізму.
5. Класифікація поживних середовищ.
6. Склад універсальних поживних середовищ.
7. Методи стерилізації та дезінфекції.

Протокол № 10

Тема: ***Методи виділення чистої культури бактерій. Елективні поживні середовища.***

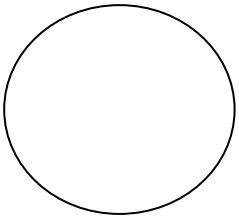
Мета: ***Студенти мають знати принципи та методи виділення чистої культури аеробів, а також як визначити типи росту на МПА і МПБ та властивості елективних і селективних поживних середовищ.***

1. Ознайомлення з колекцією елективних поживних середовищ:

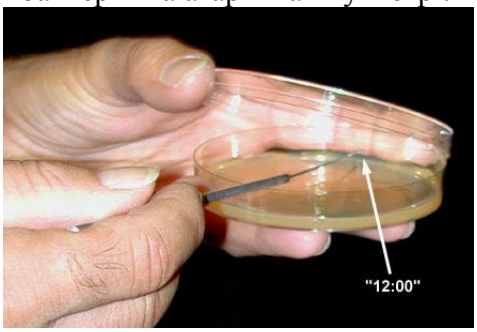
а) 1% пептонна лужна вода, б) жовчний бульйон, в) згорнута коняча сироватка.

2. Демонстрація чашок Петрі з посівом суміші мікробів. Метод механічного розсіву: на І-й та ІІ-й чашках – густий ріст бактерій, на ІІІ-й – окремі колонії.

3. Приготування мазка із суміші бактерій, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка.



4. Посів штрихом суміші бактерій на агар в чашку Петрі.



5. Макро- та мікроскопічне вивчення росту бактерій, які було посіяно на МПБ і МПА на минулому занятті:

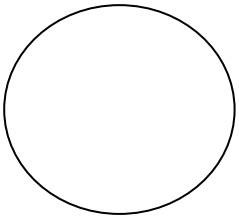
а) макроскопічне вивчення і опис росту (плівка, осад, дифузне помутніння):

_____

_____

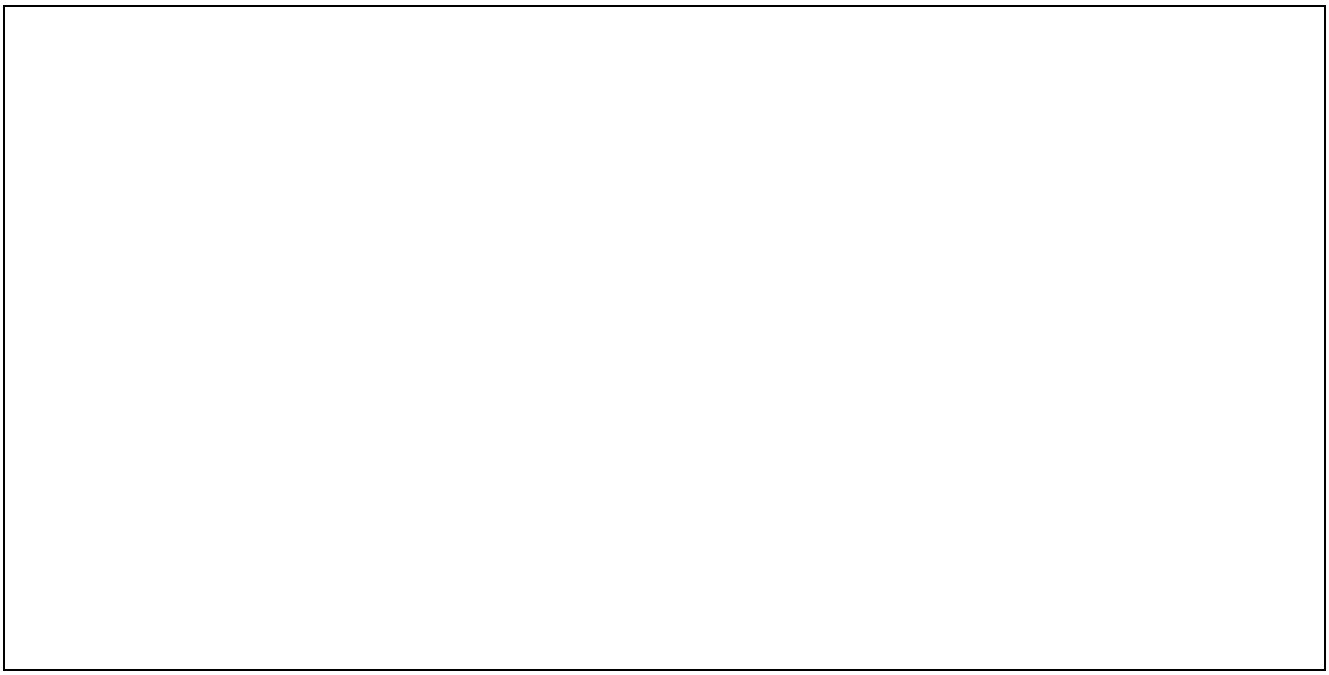
_____

б) мікроскопічне вивчення – приготування мазків, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка.



6. Намалювати схему виділення чистої культури:

СХЕМА ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ



ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Живильні середовища бувають **простими і складними (елективними, селективними, диференційно-діагностичними і консервуючими).**

Елективні середовища були введені в мікробіологічну практику С.Н.Виноградським і М.Бейєринком. Це такі живильні середовища, в яких шляхом додавання однієї чи декількох хімічних сполук створюються оптимальні умови для росту і розмноження одного виду мікроорганізмів (чи групи споріднених мікроорганізмів) та несприятливі – для всіх інших. Такі середовища застосовуються головним чином для виділення чистої культури мікроорганізмів з місць їх природного перебування і для накопичення маси культур (хімічний метод виділення чистої культури). Наприклад, живильне середовище, яке являє собою згорнуту кінську сироватку, є елективною для дифтерійних бактерій, лужна пептонна вода – для холерних вібріонів, печінковий бульйон – для збудників бруцельозу і т.п.

Накопичення мікробів на елективних середовищах у багатьох випадках є важливим попереднім етапом при виділенні чистих культур з досліджуваних матеріалів (наприклад, холерного вібріону з випорожнень хворих).

Штам - будь-який конкретний зразок даного виду. Штами одного виду, що розрізняються за антигенними характеристиками, називають сероварами, за чутливістю до специфічних фагів – фаговарами, біохімічним властивостям – хемоварами, за біологічними властивостями - біоварами.

Колонія - видима ізольована структура при розмноженні бактерій на щільних поживних середовищах, може розвиватися з однієї або декількох батьківських клітин. Якщо колонія розвинулася з однієї батьківської клітини, то потомство називається **клон.**

Культура – вся сукупність мікроорганізмів одного виду, які виросли на щільному або рідкому поживному середовищі.

Чистою культурою мікробів називають сукупність мікроорганізмів одного виду, що мають однакові морфологічні, біохімічні та культуральні властивості.

Виділення чистої культури мікробів є обов'язковим етапом будь-якого бактеріологічного дослідження. Чиста культура необхідна для вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних і антигенних властивостей, за сукупністю яких визначається видова належність досліджуваного мікроорганізму.

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

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

Техніка посівів мікроорганізмів. Посіви проводять як з метою виділення збудників з досліджуваного матеріалу так і для подальшого їх вивчення та ідентифікації.

Техніка посівів у рідкі і на щільні поживні середовища має свої особливості.

У ліву руку беруть дві пробірки. В одній знаходиться живильне середовище (щільна або рідка), в інший – досліджуваний матеріал.

Спочатку стерилізують петлю у верхній частині полум'я газового пальника. Пробірки відкривають і край їх проносять через полум'я пальника. Петлю опускають в пробірку, де є досліджуваний матеріал, і, обережно торкаючись стінки, охолоджують. В подальшому петлю опускають в пробірку і набирають матеріал. Якщо він знаходиться в рідкому стані, для посіву досить краплі бактеріальної суспензії, яка затримується в бактеріологічній петлі. Коли використовують мікроорганізми, які виросли на поверхні щільного поживного середовища, обережно плавним рухом набирають невелику їх кількість, слідкуючи, щоб не пошкодити живильне середовище. Петлю повільно виймають з пробірки, не торкаючись її стінок, і переносять в іншу пробірку з середовищем. Штриховими рухами від однієї стінки пробірки до іншої, починаючи з нижньої частини середовища, проводять по скошеній поверхні агару.

Петлю виймають з пробірки, пробки і краї пробірок проносять через полум'я і закривають. Петлю фламбірують, щоб знищити мікроорганізми.

При посіві матеріалу в рідке живильне середовище петлю з матеріалом занурюють в рідину. Якщо він не знімається з петлі, його обережно розтирають на стінці пробірки і омивають середовищем.

Матеріал, який набирали пастерівською або градуйованою піпеткою, виливають в живильне середовище, а для рівномірного його поширення пробірку обережно, щоб не намочити пробку, струшують або обертають, затиснувши в долонях.

Для посіву матеріалу на щільне поживне середовище в чашках Петрі невелику кількість матеріалу набирають стерильною петлею і втирають в поверхню середовища біля краю чашки.

Після цього петлю стерилізують в полум'ї, охолоджують. Наступний етап посіву починають з місця, де закінчився попередній. Необхідно намагатися, щоб штрихи посіву тривали від краю до краю чашки, не пошкоджували поверхні агару і розташовувалися близько один до одного. Цим подовжується лінія посіву і створюються можливості для отримання ізольованих колоній.

Посів шпателем і тампоном в чашки Петрі. Матеріал попередньо наносять на поверхню живильного середовища біля краю чашки петлею або піпеткою. Стерильний шпатель проносять через полум'я, охолоджують, торкаючись стінки чашки. Обережними круговими рухами, тримаючи чашку напівзакритою, розподіляють матеріал рівномірно по поверхні середовища.

При посіві тампоном на чашку кришку відкривають однією рукою, тампоном торкаються поверхні агару біля краю чашки і починають проводити посів штрихами від краю до краю

чашки, втираючи обережно матеріал в поверхню середовища, не пошкоджуючи його, поступово повертаючи тампон.

При посіві уколом в стовпчик живильного середовища пробірку з м'ясо-пептонним агаром, желатином та ін. беруть в ліву руку, петлю з матеріалом – в праву і роблять укол до дна пробірки в середовище. Петлю обережно виймають, а пробірку закривають.

Посів матеріалу в товщу живильного середовища. Перед посівом матеріал повинен бути в рідкому стані. Стерильною градуйованою піпеткою набирають 0,1, 0,5 або 1,0 мл матеріалу і виливають його в стерильні чашки Петрі. Після цього матеріал заливають 15-20 мл розтопленого і охолодженого до 45-50°С МПА. Обережно похитуючи чашку, круговими рухами по поверхні столу перемішують в ній матеріал, досягаючи його рівномірного розподілу в середовищі. Чашку залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном.

Для того, щоб виділити чисту культуру мікроорганізмів, слід відокремити численні бактерії, які знаходяться в матеріалі, одна від одної. Це можна досягти за допомогою методів, які засновані на двох принципах відокремлення бактерій – ***механічному*** і ***біологічному.***

Методи виділення чистих культур, засновані на механічному принципі:

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

2. Цього недоліку не має ***метод Коха (метод пластинчастих розведень)***. Р.Кох використовував щільні поживні середовища на основі желатину або агар-агару.

Отримання чистої культури методом розсіву в глибині середовища (**за Кохом**). Три пробірки, що містять по 15 мл м'ясо-пептонного агару, ставлять у водяну баню для розплавлення агару. Розплавлене середовище остуджують до температури 43-45°С. В пробірку вносять одну бактеріальну петлю досліджуваного матеріалу. Після цього прожареною і охолодженою петлею вміст 1-ї пробірки переносять у 2-у і таким же чином з 2-ї в 3-ю. Приготовлені розведення мікробів виливають з пробірок в стерильні чашки Петрі, позначені номерами, що відповідають номерам пробірок. Після застигання середовища з досліджуваним матеріалом чашки поміщають в термостат. Кількість колоній в чашках з живильним середовищем зменшується в міру розведення матеріалу.

3. Виділення чистої культури за способом **Дригальского.** Розплавлене живильне середовище розливають в три чашки Петрі. Застигле середовище обов'язково підсушують, тому що його волога поверхня сприяє утворенню злитого росту. В першу чашку вносять одну краплю досліджуваного матеріалу і стерильним шпателем втирають його в поверхню живильного середовища. Далі, не пропалюючи шпателя і не набираючи нового матеріалу, шпатель переносять в другу і третю чашки, втираючи в поверхню поживних середовищ залишки матеріалу.

4. Для отримання ізольованих колоній можна використовувати посів тампоном, яким проводили забір досліджуваного матеріалу. Трохи відкривають чашку Петрі з живильним середовищем, вносять туди тампон і обережними рухами втирають матеріал в поверхню чашки, повертаючи поступово тампон і чашку.

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

Виділення чистих культур аеробних бактерій.

За способом дихання мікроорганізми поділяються на аеробів і анаеробів. Аероби використовують для дихання вільний кисень за типом дихання вищих тварин. Анаероби не тільки не потребують кисню повітря, а й останній є для них навіть згубним.

Етапи виділення чистої культури аеробних бактерій:

1-й день – отримання ізольованих колоній. Краплю досліджуваного матеріалу петлею, піпеткою або скляною паличкою наносять на поверхню агару в чашку Петрі. Шпателем втирають матеріал в поверхню середовища; не пропалюючи шпателя проводять посів на 2-у і 3-ю чашки. В даний час частіше використовують метод секторального посіву за Голдом – розсіваючи 4 сектори по поверхні чашки, не пропалюючи петлі.

2-й день – вивчають ріст мікробів на чашках. На 3-й чашці виростають ізольовані колонії. Потрібні колонії відзначають склографом на зворотному боці чашки і пересівають на скошений агар. Посіви ставлять в термостат.

3-й день – вивчають характер росту на скошеному агарі. Роблять мазок, фарбують його. На цьому виділення чистої культури закінчується. Виділена з певного джерела і вивчена культура, називається штамом.

Теоретичні питання:

1. Бактеріологічний метод в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб.
2. Поняття: штам, колонія, чиста культура, елективне (селективне) живильне середовище.
3. Принципи і методи виділення чистої культури аеробів.
4. Склад і властивості елективних, селективних живильних середовищ.
5. Техніка посіву бактерій на рідкі та щільні живильні середовища.

Протокол № 11

Тема: ***Вивчення колоній. Пігменти бактерій.***

Мета: ***Опанування практичних навичок роботи при виділенні чистих культур бактерій: II-й день досліду.***

1. Вивчення схеми виділення чистої культури (продовження).

2. Перегляд демонстраційних чашок з колоніями 3-х видів бактерій: стафілококка, кишкової палички, антракоїда.

3. Вивчення посівів суміші бактерій в чашках Петрі, зроблених на попередніх заняттях.

4. Запис у вигляді таблиці основних особливостей різних типів колоній (№ 1 – стафілокок, № 2 – кишкова паличка, № 3 – антракоїд), що були одержані самими студентами.

ОЗНАКА	*№ 1 стафілокок*	*№ 2 кишкова паличка*	*№ 3 антракоїд*
Форма			
Розмір			
Колір			
Характер поверхні			
Характер краю			
Консистенція			
Мікроскопія			

5. Приготування мазків із 3-х типів колоній, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка у таблицю.

6. Пересів ізольованої колонії на скошений МПА в пробірці.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Колонії бактерій - ізольоване скупчення мікробних клітин, що утворилося з однієї клітини, розмножуючись на поверхні або в товщі живильного середовища. Зовнішній вигляд колонії характерний для певних груп бактерій, хоча може варіювати в залежності від умов культивування (середовища, температури, густини посіву, часу зростання). Зростання колонії відбувається радіально: старі клітини залишаються в центрі, молоді розвиваються по периферії, що пов'язано з надходженням з середовища поживних речовин.

Розміри колоній варіюють у різних видів в межах 0,05 мм - 8 см.

Деякі бактерії утворюють пігменти, що забарвлюють колонії в певні кольори (жовтий, червоний, помаранчевий і ін.).

Від способу поділу клітин залежить форма колонії. При неповному розділенні клітини зберігають протоплазматичні містки та розташування нерівними ланцюжками, утворюючи колонії неправильної форми, характерні, наприклад, для B. anthracis і R-форми ентеробактерій. При повному поділі відокремлені клітини розташовуються легкими рядами, що обумовлює формування гладких колоній. Методом скануючої електронної мікроскопії виявляють будову поверхні бактерій і їх взаємне розташування, що визначає форму колонії.

Основні критерії колонії: висота над рівнем середовища, форма краю, щільність, внутрішня структура. Крім того визначають розмір (діаметр в мм), характер поверхні (матова, гладка, блискуча, покреслена), забарвлення при відбитому та прохідному світлі (колір, флюоресценція, опалесценция, світіння), консистенцію (маслянистa, в'язка, і т.п.), диференційована (різниця в центрі та по периферії за щільностю, кольором). Колонії деяких видів настільки характерні, що мають діагностичне значення. Роїння протею спостерігають у вигляді прозорого нальоту, що поширюється на периферії колонії; B. anthracis утворюють химерні завитки, що нагадують голову медузи; S.sonnei росте у вигляді виноградного листа, а Y.pestis нагадують зім'яту мереживну хустинку. Бактерії деяких видів здатні утворювати мутантні форми колоній - слизові, карликові, а так само перехідні форми колоній.

УТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ ПІГМЕНТІВ

Колір колоній визначається утворенням пігментів, які допомагають диференціювати бактерії. Колонії актиноміцетів (A. bovis), мікрококів забарвлені у рожевий колір, стафілокока – у золотистий (S. aureus), лимонно-жовтий (S. citreus) та білий колір (S. albus), синьогнійної палички (P. aeruginosa) – в синьо-зелений, мікобактерій туберкульозу (M. tuberculosis) – у жовтий. Деякі пігменти утворюються лише на світлі (каротиноїди у M. tuberculosis), а деякі володіють антибіотичними властивостями (P. aeruginosa).

За хімічним складом і властивостями пігменти неоднорідні. Вони підрозділяються на розчинні у воді (синій пігмент - піоціанін, що виділяється синьогнійної палички); розчинні в спирті і нерозчинні у воді (червоний пігмент - продигиозан, що виділяється чудовою паличкою); нерозчинні ні у воді, ні в спирті (чорний і бурі пігменти дріжджів і цвілі). Нерозчинні у воді пігменти (ліпохроми) забарвлюють колонії бактерій (наприклад, жовтий, золотистий, палевий пігменти стафілококів), а розчинні у воді - фарбують живильне середовище (синьогнійна паличка). Утворення пігментів у мікробних клітин відбувається на світлі при достатньому доступі кисню та певному складі живильного середовища.

Пігментоутворення має певне фізіологічне значення. Пігменти захищають мікробну клітину від природного УФ, радіації, беруть активну участь в процесах дихання, мають антибіотичну дію (продігіозан).

За хімічним складом пігменти поділяють на:

1. каратіноїдні - мають червоний, помаранчевий, жовтий колір; розчиняються в жиророзчинниках, синтезуються мікобактеріями, сарцинами й ін. Ці пігменти оберігають мікроорганізми від дії УФ променів.
2. хінонові - жовтого кольору, їх утворюють мікобактерії туберкульозу.
3. меланинові - чорного або коричневого кольору, вони не розчиняються у воді та кислотах.
4. Пірролові пігменти - продігіозін - яскраво червоного кольору, що утворюється серраціями.
5. Фенозинові - піоціонін, який продукується Pseudomonas aeruginosa. Пігмент розчинний у воді, в зв'язку з чим живильне середовище, на якому ростуть ці бактерії, забарвлюється в синьо - зелений колір.

Теоретичні питання:

1. Схема виділення чистої культури.
2. Особливості формування колоній у різних видів бактерій.
3. Пігментоутворення у бактерій та його значення у диференціації бактерій.

Протокол № 12

Тема: ***Ідентифікація виділеної чистої культури. Ферменти бактерій. Диференційно-діагностичні поживні середовища.***

Мета*: Вивчити методи ідентифікації виділених чистих культур бактерій*.

1. Вивчення схеми виділення чистої культури бактерій (продовження).

2. Ознайомлення з набором сухих диференційно-діагностичних середовищ – Ендо, Плоскірєва і Рессельа.

3. Ознайомлення з колекцією диференційно-діагностичних середовищ з ознаками росту на них бактерій певних видів.

а) ***агар Ендо*** з червоними і безкольоровими колоніями;

б) ***кров'яний агар*** з колоніями, оточеними зоною гемолізу і з колоніями без гемолізу;

в) чорні колонії дифтерійних бактерій на ***середовищі Тінсдаля-Садикової.***

4. Ознайомлення з колекцією середовищ, які використовують для вивчення біохімічних властивостей виділеної чистої культури:

а) середовища з вуглеводами (середовища Гіса) та молоко.

б) МПБ для визначення індолу і H_2S.

в) желатинове середовище.

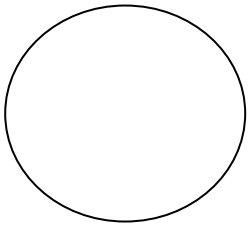
5. Дослідження виділеної студентами чистої культури бактерій:

а) опис ознак росту_____

_____

_____

б) приготування мазка і фарбування за Грамом.



6. Посів виділеної чистої культури на строкатий ряд і на МПА для визначення індолу і H_2S.

7. Для підготовки до наступної теми зробити посів ґрунту на середовища для анаеробів – Кітт-Тароцці та молоко під маслом.

Диференційно-діагностичні середовища – це такі середовища, до складу яких крім

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ферменти (ензими) - специфічні білкові каталізатори, присутні у всіх живих клітинах. У бактерій виявлені всі 6 класів ферментів: оксидоредуктаз (каталізують окислювально - відновні реакції), трансферази (каталізують реакції перенесення груп атомів), гідролази (каталізіруютгідролітическое розщеплення різних з'єднань), ліази (каталізують реакції відщеплення від субстрату тієї чи іншої хімічної групи до подвійних зв'язків) , ізомерази

(каталізують внутрішньо-молекулярні перетворення), лігази (каталізують з'єднання 2-х молекул, поєднане з розщепленням пірофосфатного зв'язку в молекулі АТФ).

Відповідно до особливостей генетичного контролю, у бактерій розрізняють 3 основні групи ферментів:

конститутивні (синтез яких відбувається протягом всього клітинного циклу),

індуцібельні (синтез яких індукується відповідним субстратом),

репресібельні (синтез яких пригнічується в результаті надмірного накопичення продукту реакції, що каталізується даними ферментом).

Ферменти бактерій поділяються на такі, що функціонують тільки усередині клітини (ендоферменти), та такі, що тільки поза клітиною (екзоферменти). Ендоферменти в основному каталізують синтетичні процеси, дихання і т.п. Екзоферменти каталізують гідроліз високомолекулярних субстратів до таких молекул, що здатні проникнути всередину клітини.

Активність ферментів залежить від ряду умов, в першу чергу від температури вирощування бактерій. Зниженням температури можна зупинити, а підвищенням до 40^0 С підвищити активність ферментів. Оптимум pH в основному лежить в межах 4-7. Ферментативна активність бактерій використовується для їх ідентифікації, найчастіше при цьому вивчаються цукролітичні та протеолітичні властивості.

Диференційно-діагностичні середовища - це такі середовища, до складу яких крім речовин, що забезпечують зростання та розвиток мікроорганізмів, входять субстрати для певних ферментів. За якісними змінам субстрату (оцінюється за допомогою індикатора, який реагує на наявність в живильному середовищі продуктів розпаду субстрату) визначається присутність ферменту.

Кожен вид мікроорганізмів характеризується досить стабільним набором ферментів. Визначення набору ферментів за допомогою диференційно-діагностичних середовищ дозволяє диференціювати види мікроорганізмів. Наприклад, кров'яний агар використовується для виявлення гемолізинів, середовища Гіса для виявлення цукролітичних ферментів (карбогідраз), желатин - для обліку протеолітичних властивостей мікробів і т.п.

Кров'яний агар. Про наявність ферменту гемолізину судять за руйнуванням еритроцитів і утворенням світлої зони гемолізу навколо колоній мікробів.

Середовища Гіса. Про наявність ферментів-карбогідраз, які розщеплюють вуглеводи до кислоти, свідчить зміна кольору живильного середовища внаслідок зміни pH середовища. Відмінність у наборі ферментів може бути використана для перевірки чистоти виділеної культури, а також для швидкої диференціації одного виду бактерій від інших при первинному дослідженні посівів заразного матеріалу.

Теоретичні питання:

1. Ферменти бактерій, їх класифікація.
2. Використовування мікробів і їх ферментів в біотехнології.
3. Методи вивчення ферментативної активності бактерій і використання їх для ідентифікації бактерій.
4. Сучасні методи швидкої ідентифікації бактерій за допомогою автоматизованих індикаторів ферментативної активності.
5. Диференційно-діагностичні живильні середовища. Загальний принцип їх використання (приклади).

Протокол № 13

Тема: ***Дихання бактерій. Виділення чистих культур анаеробів.***
Мета***: Вивчення методів культивування анаеробних бактерій.***

1 Ознайомлення з апаратурою і приладами для створення анаеробних умов – анаеростат та ексикатор.

Анаеростат – _____

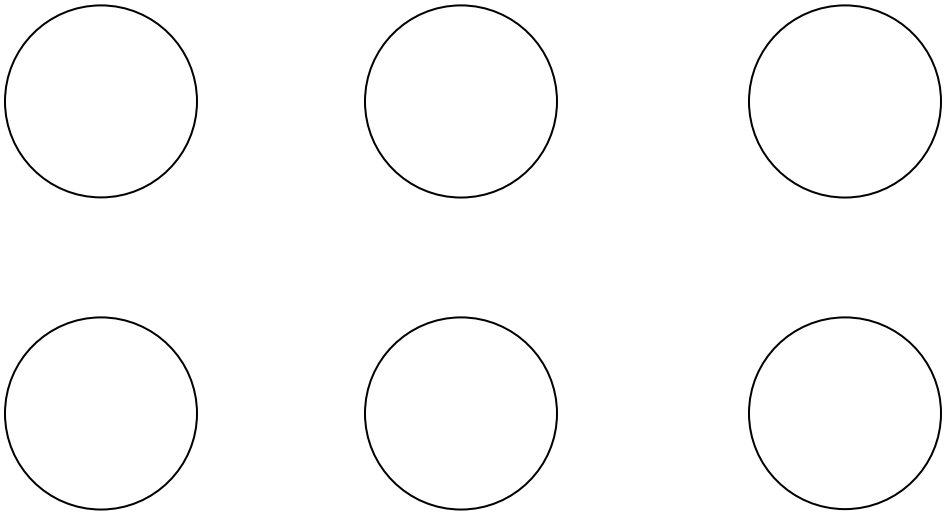
_____

Ексикатор – _____

_____

2 Ознайомлення з колекцією середовищ для вирощування анаеробів (середовище Кітт-Тароцці, молоко під олією, агар стовпчиком 15 см, агар у трубочках Він'яля та кров'яний агар Цейсслера).

3 Перегляд і зарисовка демонстраційних препаратів з культур патогенних анаеробів.



4 Приготування мазків із посівів ґрунту на молоко і середовище Кітт-Тароцці, фарбування за Грамом, мікроскопія, зарисовка.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Дихання (або біологічне окислення) мікроорганізмів являє собою сукупність біохімічних процесів, в результаті яких звільняється енергія, необхідна для життєдіяльності мікробних клітин. Мікроорганізми добувають свою енергію за рахунок окислення різних хімічних сполук: вуглеводів, спиртів, органічних кислот, жирів. Сутність окислення полягає в тому, що речовини, що окислюються, віддають електрони, відновлювані - отримують їх.

За типом дихання мікроорганізми поділяються на аероби, облігатні анаероби, мікроаерофіли і факультативні анаероби.

Облігатні аероби (мікобактерії туберкульозу та ін.) живуть і розвиваються при вільному доступі кисню, тобто реакції окислення здійснюються за участю молекулярного кисню з вивільненням великої кількості енергії.

Облігатні анаероби (клостридії правця, ботулізму і т.п.) здатні жити та розмножуватися тільки за відсутності вільного кисню. Дихання у анаеробів відбувається шляхом ферментації субстрату з утворенням невеликої кількості енергії. Наявність вільного кисню для облігатних анаеробів є летальною. Це пов'язано з тим, що в присутності кисню кінцевим продуктом окислення органічних сполук є перекис водню. А оскільки анаероби не володіють здатністю продукувати фермент каталазу, що розщеплює перекис водню, то вона накопичується та токсично діє на бактерії.

Факультативні анаероби можуть розмножуватися як при наявності молекулярного кисню, так і при відсутності його. До них відносять більшість патогенних і сапрофітних бактерій.

Для розмноження мікроаерофілів необхідна невелика кількість кисню, тому вони розмножуються в присутності CO2.

Методи культивування анаеробних бактерій.

Для культивування анаеробів необхідно створити знижений парціальний вміст кисню в середовищі або в повітрі, з яким воно стикається, що досягається наступними методами:

1. Найбільш простий - посів анаеробної культури уколом у високий стовпчик цукрового агару.

2. Додавання в середовище редукуючих речовин. Найчастіше вживається середовище Кітта - Тароцці - бульйон з 0,5 % глюкози та шматочками свіжих органів тварин (або з м'ясним фаршем). Середовище заливають зверху шаром олії. Живильні середовища перед посівом кип'ятять для видалення з них кисню. Після посіву їх заливають зверху шаром парафіну чи вазелінової олії для роз'єднання з атмосферним повітрям.

3. Видалення повітря з середовища механічним шляхом. Для цього використовують анаеростати, з яких повітря викачується насосом.

4. Заміна повітря індиферентним газом, наприклад воднем, який через приєднану трубку надходить до герметичної шафи з посівами анаеробів, витісняючи з нього повітря з киснем.

5. Механічний захист - метод Він’яля - Вейона: беруть скляну трубку 30 см довжиною та 5 мм шириною, засівають в розтоплений агар досліджуваний матеріал, перемішують і потім насмоктують агар в стерилізовану трубку. Затем запаюють один кінець, а інший – закривають парафіном, і трубку інкубують у термостаті. Якщо посів був не надто густий, то в середовищі виростають окремі колонії бактерій, які можна отримати, розпилявши трубку.

6. Хімічне поглинання кисню повітря, наприклад, лужним розчином пірогалола (10 % розчин лугу та пірогалола) у спеціальних приладах.

7. Біологічний метод - комбінований посів культур анаеробів і аеробів (спосіб Фортнера). Посів роблять на чашку з товстим шаром кров'яного агару, розділеного навпіл вирізаної по

середині чашки прожареним стерильним шпателем невеликої смужки агару. На одній половині роблять посів культури аеробів, на інший - посів анаеробної культури; чашку закупорюють парафіном і розміщують у термостаті. Спочатку відбувається зростання аеробів, коли ж вони утилізують весь кисень, то почнеться зростання анаеробів.

Виділення чистих культур анаеробів:

І день - накопичення матеріалу. Досліджуваний матеріал засівають на середовище Кітт - Тароцці, прокип'ячене протягом 20 хвилин перед посівом і охолоджене. Після посіву матеріалу середовище нагрівають 15 хв при 80^0 С для знищення вегетативної флори; спори анаеробів при цьому не знищуються. Пробірки з посівом ставлять в термостат.

ІІ день - через добу - роблять мазки, фарбують їх за Грамом. Проводять ідентифікацію культури.

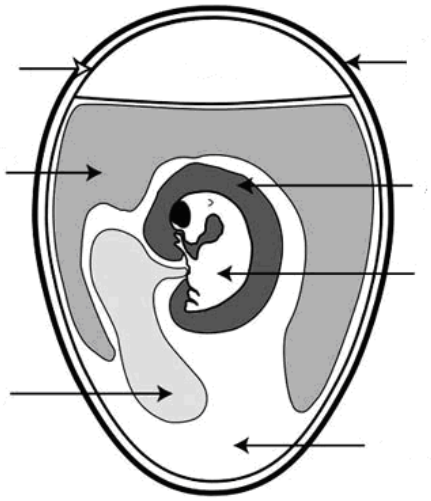
Теоретичні питання:

1. Типи дихання мікроорганізмів.
2. Ферменти, які приймають участь в біологічному окисленні.
3. Класифікація мікроорганізмів по типу дихання.
4. Методи створення анаеробних умов.
5. Розбір схеми виділення чистих культур анаеробів.
6. Методи виділення чистих культур анаеробів (метод Цейсслера і метод Вейнберга).

Протокол № 14

Тема: ***Культивування вірусів, рикетсій, хламідій.***
Мета: ***Освоєння методів культивування вірусів, рикетсій, хламідій.***

1. Розбір і зарисовка схеми будови курячого ембріона.



2. Розтин 10-11-добового курячого ембріона з метою вивчення його будовиі. Вивчення способів інфікування курячого ембріона.

3. Перегляд курячих ембріонів на овоскопі та нанесення контурів повітряного мішка.

4. Інфікування курячого ембріона в алантоїсну порожнину вірусом грипу.

5. Ознайомлення з поживними середовищами і розчинами для культивування культур клітин – середовище № 199, розчин Хенкса, середовище RPMI-1640 та інші, розчин Версена – для знімання зі скла перещеплюваних клітин. Доповнення до поживних середовищ – сироватка крові людини та бика, пеніцилін, розчин соди (для підтримки pH середовища), 0,25 % розчин трипсину для одержання первинних культур.

6. Вивчення класифікації тканевих культур.

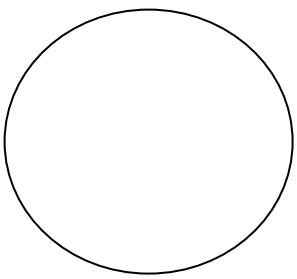
Назвати типи тканевих культур і привести приклади:

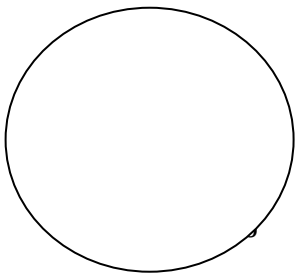
А._____

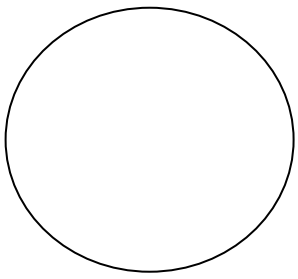
Б._____

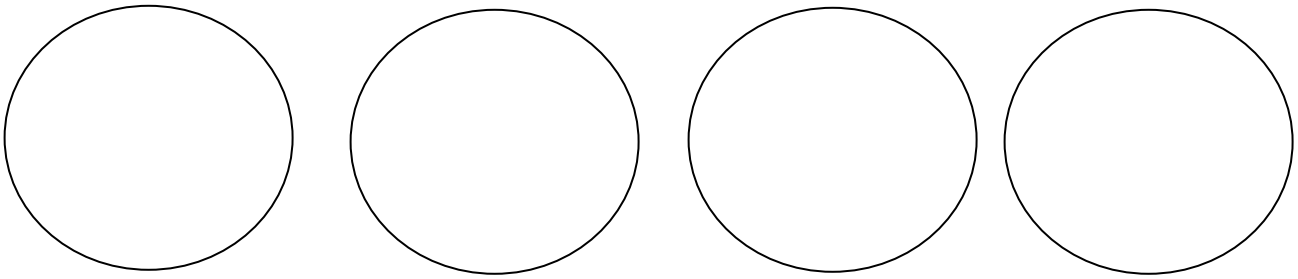
В._____

7. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів: а) рикетсії (фарб. за Здродовським), б) хламідії (фарб. за Романовським-Гімзою), в) клітини культури тканини (контроль), г) ЦПД віруса (деструкція клітинного моношару; д) ЦПД віруса (округлення клітин; е) ЦПД віруса (цитоплазматичні включення); ж) ЦПД віруса (багатоядерна клітина).









ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Рикетсії, хламідії та віруси, які є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, не культивуються на штучних поживних середовищах, які використовуються для культивування бактерій, грибів, мікоплазм і найпростіших.

Рикетсії мають власний метаболізм, однак є цілком енергетично залежними від тканинної клітини, тому рикетсії і належать до внутрішньоклітинних паразитів. У клітці господаря кожен вид рикетсій розмножується тільки в певних місцях: в цитоплазмі, ядрі або вакуолях клітин. Вони культивуються в кишечнику вошей, в желточному мішку курячого ембріона, у легенях білих мишей, в культурах клітин.

У **хламідій** спостерігається не тільки енергетична залежність від клітини, але і слабо виражена метаболічна активність. Тому хламідії можна культивувати в жовчному мішку курячого ембріона або в клітинах культури тканин.

Віруси - внутрішньоклітинні паразити. Для їх культивування використовуються три біологічні системи: 1) організм лабораторної тварини; 2) курячий ембріон; 3) тканинні культури.

Культури клітин.

Приготування первинної культури клітин складається з декількох послідовних етапів: подрібнення тканини, роз'єднання клітин шляхом трипсинізації, відмивання отриманої однорідної суспензії ізольованих клітин від трипсину з подальшим суспендируванням клітин у живильному середовищі, що забезпечує їх зростання, наприклад у середовищі 199 з додаванням телячої сироватки крові.

Перещеплювані культури адаптовані до умов, що забезпечує їм постійне існування in vitro, та зберігання протягом декількох десятків пасажів. Перещеплювані одношарові культури клітин готують зі злоякісних і нормальних ліній клітин, які володіють здатністю тривалий час розмножуватися in vitro за певних умов. До них відносяться злоякісні клітини HeLa, спочатку виділені з карциноми шийки матки, Нер-3 (з лімфоїдної карциноми), а також нормальні клітини амніона людини, нирок мавпи та ін.

Полуперещеплювані культури включають діплоїдні клітини людини. Вони являють собою клітинну систему, яка зберігає в процесі 50 пасажів (до року) диплоїдний набір хромосом, типовий для соматичних клітин тканини, що використовується. Диплоїдні клітини людини не зазнають злоякісного переродження й цим вигідно відрізняються від пухлинних.

Про репродукцію вірусів в культурі клітин судять за цитопатичною дією (ЦПД), яке може бути виявлено мікроскопічно та характеризується морфологічними змінами клітин. Характер ЦПД вірусів використовують як для їх виявлення (індикації), так і для орієнтовної ідентифікації, тобто визначення їх видової приналежності.

Один з методів індикації вірусів заснований на здатності поверхні клітин, в яких вони репродукуються, адсорбувати еритроцити - реакція гемадсорбції. Для її постановки до культури

клітин, заражених вірусами, додають суспензію еритроцитів і після деякого часу клітини промивають фізіологічним розчином хлориду натрію. На поверхні уражених вірусами клітин залишаються адсорбовані еритроцити.

Інший метод - реакція гемаглютинації (РГА). Застосовується для виявлення вірусів у культуральній рідині, культури клітин або хоріоналантоїсної чи амніотичної рідини курячого ембріону.

Кількість вірусних частинок визначають методом титрування за ЦПД у культурі клітин. Для цього клітини культури заражають десятикратним розведенням вірусу. Після 6-7-денної інкубації їх переглядають для виявлення ЦПД. Титр вірусу - це найбільше розведення, яке викликає ЦПД у 50 % заражених культур. Титр вірусу складає кількість цитопатичних доз.

Більш точним кількісним методом обліку окремих вірусних частинок є метод бляшок.

Деякі віруси можна виявити й ідентифікувати за включеннями, які вони утворюють в ядрі або цитоплазмі заражених клітин.

Курячі ембріони. Курячі ембріони в порівнянні з культурами клітин значно рідше бувають контаміновані вірусами та мікоплазмами, а також володіють порівняно високою життєздатністю й стійкістю до різних втручань.

Для отримання чистих культур рікетсій, хламідій і вірусів у діагностичних цілях, а також для приготування різноманітних препаратів (вакцин, діагностикумів) використовують 8-12-денні курячі ембріони. Про розмноження згаданих мікроорганізмів судять за морфологічними змінами, які виявляють на його оболонках після розтину ембріона.

Про репродукцію деяких вірусів, наприклад грипу, віспи, можна судити за реакцією гемаглютинації (РГА) з курячими або іншими еритроцитами.

До недоліків даного методу відносять неможливість знайти досліджуваний мікроорганізм без попереднього розтину ембріону, а також наявність у ньому великої кількості білків і інших сполук, що ускладнюють подальшу очистку рікетсій або вірусів

Теоретичні питання:

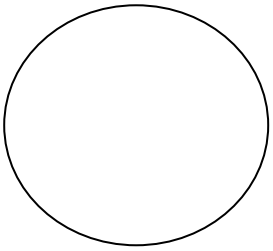
1. Особливості розмноження вірусів.
2. Сучасні методи культивування вірусів.
3. Культивування вірусів в курячому ембріоні.
4. Культивування вірусів в клітинних культурах.
5. Характер ЦПД вірусів на клітинні культури.
6. Методи культивування хламідій.

Протокол №15

Тема: ***Інфекційний процес, його види і умови виникнення. Зараження експериментальних тварин.***

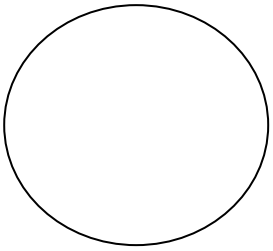
Мета: ***Вивчення методів дослідження інфікованих лабораторних тварин.***

1. Мікроскопія та зарисовка демонстраційних препаратів: мазків-відбитків з органів лабораторних тварин, інфікованих антракоїдом.



2. Ознайомлення з правилами відтворення експериментальних інфекцій на лабораторних тваринах. Експериментальна інфекція – інфікування білих мишей 1% суспензією антракоїду у черевну порожнину.

3. Фарбування метиленовою синькою готових мазків-відбитків з органів лабораторних тварин, яких інфікували антракоїдом. Мікроскопія та зарисовка.



ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Інфекція - (від лат. Infectio - забруднювати, заражати) - це історично сформований комплекс біологічних явищ і процесів, що відбуваються в макроорганизме під впливом патогенного мікробу за певних умов зовнішнього та соціального середовища.

Інфекційний процес - комплекс реакцій з боку макроорганізму, спрямованих на відновлення гомеостазу у відповідь на проникнення та розмноження патогенного мікроба. Інфекційний процес є патогенетичною основою інфекційного захворювання.

Іншими словами, інфекційний процес - складний процес взаємодії збудника і макроорганізму в певних умовах зовнішнього та внутрішнього середовища, що включає в себе розвиток патологічних, захисно-пристосувальних та компенсаторних реакцій.

Інфекційний процес виникає за наявності трьох компонентів:

- збудник,

- фактор передачі інфекції від зараженого організму до здорового,

- сприйнятливий макроорганізм (пацієнт).

Фактори, від яких залежить розвиток інфекційного процесу:

- сприйнятливість макроорганізму (реакція організму на проникнення збудника інфекції, розвиток захворювання, або носійство збудника);

- інвазивність збудника (здатність мікроорганізму проникати в тканини й органи макроорганізму та поширюватися в них);

- інфекційна доза збудника;

- патогенність збудника (здатність мікроорганізму в природних умовах викликати інфекційні захворювання) – це генетично обумовлена видова ознака. Для багатьох патогенних мікроорганізмів характерна специфічність, тобто здатність даного виду мікробів викликати певне захворювання. Наприклад, холеру викликає холерний вібріон, гонорею - гонококи та т.п. Характеризується:

- специфікою дії на макроорганізм
- шляхами передачі
- швидкістю розмноження збудника
- тропністю мікроорганізму до певних тканин макроорганізму
- патогенність є якісною характеристикою певного виду мікроба-збудника.

- вірулентність збудника (ступінь патогенності даного мікроорганізму при стандартних умовах природного або штучного зараження) – це ступінь чи міра патогенності. Вірулентність, як і будь-яку властивість мікроорганізму, може змінюватися. Ці зміни носять або фенотипический характер, або є результатом змін в геномі клітини та стають спадковими.

ОДИНИЦІ ВИМІРУ вірулентності:

- DLM (Dosis Letalis minima) - мінімальна кількість мікроорганізмів, яка здатна викликати загибель чутливих лабораторних тварин певного виду, певної ваги, при певному способі введення та за певний термін часу
- DCL (Dosis Certa Letalis) - кількість мікроорганізмів, яка викликає загибель 100 % чутливих лабораторних тварин
- DL50 (Dosis Letalis 50) - кількість патогенних мікроорганізмів, яка викликає загибель 50 % інфікованих лабораторних тварин. Визначають також DL70, DL75, DL90
- ID (Infectious Dose, англ.) - мінімальна кількість патогенних мікроорганізмів, яка здатна викликати розвиток інфекції у певної кількості лабораторних тварин. Визначають ID50, ID75, ID100.

Особливе значення в вірулентності мікробів має здатність мікроорганізмів продукувати токсичні речовини - екзотоксин і ендотоксін.Токсіни - продукти процесів метаболізму.

Основні механізми дії бактеріальних екзотоксинів:

- мембранотоксична дія (C. perfringens)
- пригнічення синтезу білка (C. diphtheriae)
- патологічна активація шляхів метаболізму (B. anthracis - активація внутрішньоклітинного цАМФ)
- протеолітична дія (C.tetani, C.botulinum)
- гіперергічна стимуляція імунної відповіді макроорганізму (S. aureus).

1 DLM дифтерійного екзотоксину – це його найменша кількість, яка викликає загибель морської свинки вагою 250 грамів при підшкірному введенні на четверту - п'яту добу.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКЗО- І ЕНДОТОКСИНІВ

Екзотоксини	Ендотоксини
Білкової природи	Ліпополісахаридний комплекс
Дифундують із клітини в навколишнє середовище	Зв'язані з тілом мікробної клітини
Високотоксичні	Менш токсичні
Мають специфічну дію	Викликають загальну інтоксикацію
Термолабільні	Термостабільні
Під дією формаліну і температури перетворюються в анатоксин	В анатоксин не перетворюються
Утворюються переважно грампозитивними мікроорганізмами (збудники дифтерії, сибірської язви, правцю, газової раневої інфекції, ботулізму)	Утворюються тільки грамнегативними мікроорганізмами (збудники черевного тифу, чуми, сальмонельозів і ін.)

Основні бактерії - продуценти екзотоксинів:

- Грам-позитивні
- Corynebacterium diphtheriae
- Clostridium tetani
- Clostridium botulinum
- Clostridium difficile
- Clostridium perfringens
- Bacillus anthracis
- Staphylococcus aureus
- Streptococcus pyogenes
- Грам-негативні
- Vibrio cholerae
- Escherichia coli
- Shigella dysenteriae
- Bordetella pertussis

Послідовність (циклічність) інфекційного процесу:

- Адгезія і колонізація збудника у вхідних воротах:
  слизові шлунково-кишкового тракту;
  слизові дихальних шляхів;
  слизові сечостатевих органів;
  шкіра (здорова і пошкоджена).
- Впровадження (інвазія) збудника в організм.
- Формування первинного вогнища.
- Розповсюдження збудника в організмі:
  лімфатичними шляхами;
  з кров'ю;
  періневральними просторами.
- Загальна інтоксикація і ураження певних органів (тропізм).
- Формування імунітету (несприйнятливості).
- Звільнення організму від збудника або перехід в бактеріоносійство.

Термінологія.

Бактеріємія - циркуляція бактерій у крові.

Вірусемія - циркуляція вірусів у крові.

Токсемія - циркуляція мікробних токсинів у крові.

Сепсис - генералізована стадія ациклічного інфекційного процесу, при якій збудник не тільки знаходиться в крові, але й може розмножуватися там і вражати всі органи та системи.

Септикопіємія - збудник не тільки розмножується в крові, але й формує гнійні вогнища в органах і тканинах хворої людини.

Інфекційні хвороби - велика група захворювань людини, викликаних патогенними вірусами, бактеріями (в тому числі риккетсиями та хламідіями) й найпростішими.

Форми перебігу інфекційного процесу.

Найбільш вивчені клінічно проявляються (маніфестних) гострі та хронічні форми. При цьому за клінічним перебігом розрізняють типові й атипові інфекції та блискавичні (фульмінантні), які в більшості випадків закінчуються летально.

Маніфестна інфекція може мати легкій, середньої тяжкості й важкий перебіг. Спільними властивостями гострої маніфестної інфекції є нетривалість перебування збудника в організмі хворого та формування в тій чи іншій мірі несприйнятливості до повторного зараження відповідним мікроорганізмом. Епідеміологічне значення гострої маніфестной інфекції дуже велике, бо пов'язано зі значною інтенсивністю виділення хворими мікроорганізмів-збудників у навколишнє середовище й, отже, з високою заразністю хворих. Деякі інфекційні хвороби протікають завжди тільки в гострій формі (скарлатина, чума, віспа), інші - в гострій і хронічній (бруцельоз, вірусний гепатит, дизентерія).

Як з теоретичної, так і з практичної точок зору особливе місце займає хронічна форма інфекції. Вона характеризується тривалим перебуванням збудника в організмі, ремісіями, рецидивами та загостреннями патологічного процесу, сприятливим прогнозом у разі своєчасної та раціональної терапії, й може закінчитися, як і гостра форма, повним одужанням.

Резидуальна форма - характерні залишкові явища, в основному функціонального характеру, внаслідок імуноалергічної перебудови та розладів вегетативної нервової системи: пітливість, дратівливість, зміни нервово-психічної сфери, артралгії, субфебрилітет, тяжкі наслідки можуть бути пов'язані з розвитком незворотних фіброзно-рубцевих змін із залученням нервових стовбурів; органічні зміни опорно-рухового апарату - деформації суглобів, анкілози, контрактури, атрофія м'язів.

Латентна форма (прихований перебіг) інфекції являє тривалу безсимптомну взаємодію організму з інфекційним агентом; при цьому збудник знаходиться або в дефектній формі, або в особливій стадії свого існування. Наприклад, при латентній вірусній інфекції вірус визначається у вигляді дефектних часток, бактерії - у вигляді L-форм. Описано й латентні форми, викликані найпростішими (малярія). Збудники латентної інфекції підтримують свою життєдіяльність, перебуваючи всередині клітин хазяїна (внутрішньоклітинний паразитизм), і в навколишнє середовище не надходять.

Під впливом деяких факторів (термічний вплив, інтеркурентні хвороби, травми, в тому числі психічна, гемотрансфузія, трансплантація) латентна інфекція може трансформуватися в гостру; при цьому збудник знову набуває своїх звичайних властивостей. Класичним прикладом латентної інфекції є герпетична.

Вкрай своєрідною формою взаємодії вірусів і організму людини є повільна (slow) інфекція. Визначальними рисами повільної інфекції є тривалий (багатомісячний, багаторічний) інкубаційний період, ациклічний неухильно прогресуючий перебіг з розвитком патологічних

змін переважно в одному органі або в одній системі (головним чином в нервовій), завжди смертельний результат захворювання.

До повільних відносять інфекції, викликані деякими вірусами: ВІЛ/СНІД, вроджена краснуха, прогресуючий краснушний паненцефаліт, коровий підгострий склерозуючий паненцефаліт. І інфекції, викликані так званими пріонами (конформаційні білки): антропонози куру, хвороба Крейтцфельда - Якоба, синдром Герстмана-Страуслера, аміотрофічний лейкоспонгіоз і зоонози овець і кіз, трансмісивна енцефалопатія норок і ін.

Інфекційні хвороби, викликані одним видом мікроорганізмів, отримали назву моноінфекції; викликані одночасно декількома видами (мікробні асоціації) - змішаної, або мікстінфекції.

Варіантом змішаної інфекції є вторинна інфекція, коли до вже існуючої інфекційної хвороби приєднується нова. Як правило, вторинна інфекція виникає при порушенні нормального симбіозу аутофлори та макроорганізму, внаслідок чого відбувається активізація умовно патогенних видів мікроорганізмів (стафілококи, протей, кишкові палички та т.п.), Тобто коли, наприклад, після вірусної інфекції (грип) розвивається запалення легенів, спричинене бактеріальною флорою.

Асоційовані інфекції - інфекції, при яких відбувається поєднаний (одночасний або послідовний) вплив декількох патогенних агентів на організм. Відомо, що вплив на організм людини двох і більше збудників є складним і неоднозначним процесом та ніколи не вичерпується простим підсумовуванням ефектів окремих представників мікробних асоціацій.

Таким чином, асоційовану (змішану) інфекцію слід розглядати як особливу форму інфекційного процесу, частота якої повсюдно наростає.

Аутоінфекція. Компонентом асоційованої інфекції є ендогенна, або аутоінфекція, що викликається власною умовно патогенною флорою організму. Ендогенна інфекція може набувати значення первинної, самостійної форми захворювання. Нерідко в основі аутоинфекції лежить дисбіоз, що виникає (поряд з іншими причинами) внаслідок тривалої антибіотикотерапії. З найбільшою частотою аутоінфекція розвивається в мигдаликах, товстій кишці, бронхах, легенях, сечовивідній системі, на шкірних покривах. Епідеміологічну небезпеку можуть являти хворі зі стафілококовими й іншими ураженнями шкіри та верхніх дихальних шляхів, так як, поширюючи збудників у навколишньому середовищі, вони можуть інфікувати предмети й людей.

Бактеріоносійство - особлива форма взаємини між мікроорганізмом і людиною. Найчастіше спостерігається в період після одужання від інфекції. Характерно, що мікроб в організмі є, а ознак хвороби вже немає. Здорове бактеріоносійство - це коли взагалі ніяких ознак хвороби не розвивається, незважаючи на проникнення патогенного мікроорганізму.

Вогнищева інфекція - наприклад, фурункул, виразка сифілітична, туберкульоз може бути локалізованою. Якщо інфекція поширюється по всьому організму, говорять про генералізацію процесу (наприклад, від фурункула виникає сепсис).

Суперінфекція - повторне зараження тим же збудником, коли ще не закінчилося захворювання. Наприклад, не видужавши від грипу, хворий може отримати додатково «порцію» вірусів від іншого джерела інфекції. Перебіг хвороби ускладнюється.

Реінфекція - повторне зараження тим же видом мікроба, але вже після повного одужання від попереднього зараження. Перебіг хвороби легше, так як є імунітет.

Рецидив - це повернення хвороби, загострення при хронічному її перебігу.

Ремісія - період відносного благополуччя при хронічному перебігу захворювання між рецидивами.

Кожна з форм інфекційного процесу має свою клінічну та епідеміологічну значимість. Наприклад, латентна (прихована) інфекція і здорове бактеріоносійство мають надзвичайно важливе епідеміологічне значення, так як в цих випадках хворі зазвичай не звертаються за лікуванням і тривалий час слугують активним джерелом зараження для здорових. Люди, які перенесли інфекційне захворювання, в період одужання називаються реконвалесцентами.

Причини загострень і рецидивів захворювання:

- порушення режиму або дієти, призначених лікарем;
- активізація збудника, що викликав основне захворювання (реінфекція) внаслідок зниження опірності організму;
- нове зараження іншим типом збудника даної хвороби (суперінфекція) при спілкуванні з людьми, зараженими даним інфекційним захворюванням;
- нашарування сторонньої мікробної флори (вторинна інфекція) внаслідок порушення гігієнічних вимог при догляді за хворими;
- недостатня напруженість сформованого імунітету після раніше перенесеної інфекції.

В залежності від виду збудника інфекційні хвороби розподіляють на основні групи:

- вірусні інфекції (грип, вірусні гепатити, ВІЛ/СНІД, інфекційний мононуклеоз, герпес, вітряна віспа, кір);
- бактеріальні інфекції (дизентерія, сальмонельоз, туберкульоз, холера, чума);
- грибкові інфекції (кандидоз, лишай);
- протозойні інфекції (малярія, лямбліоз);

За джерелом і місцем скупчення (резервуаром) збудника:

- антропонози - джерелом інфекції є тільки людина (ВІЛ/СНІД, вірусні гепатити, дизентерія, малярія);
- зоонози - в даному випадку джерелом і природним резервуаром інфекції є тварини (туляремія, чума, бруцельоз);
- сапронози - збудники можуть перебувати в інших об'єктах навколишнього середовища, таких як вода, грунт, повітря (легіонельоз, газова гангрена);

Клінічна класифікація:

- за типом (типовий або атиповий, нехарактерний для даної інфекції перебіг);
- за тяжкістю (легкий, середньотяжкий і тяжкий перебіг);
- за тривалістю процесу (гострі, підгострі та хронічні інфекційні захворювання).

Залежно від основної локалізації та вхідних воріт (вхідні ворота - орган або система органів організму людини, через які відбувається зараження):

- кишкові інфекції (дизентерія, гострі кишкові інфекції, холера, сальмонельоз);
- дихальні інфекції (дифтерія, грип, ангіна, інфекційний мононуклеоз);
- гематогенні інфекції (малярія, висипний тиф, поворотний тиф, чума);
- інфекції зовнішніх покривів (гонорея, сифіліс, цитомегаловірусна інфекція, папіломатоз).

Як на перебіг інфекційного процесу, так і на основні прояви захворювання впливають форми поширення збудника в організмі:

1. Бактеріємія та вірусемія - процес поширення збудника з током крові органами та тканинами, або генералізація інфекції. Цей процес може привести до сепсису;

2. Септицемія (сепсис) - наповнення мікробами багатьох органів і тканин (сибірська виразка, інфекції, що викликані гноєтворними коками). Для сепсису характерна одна й та ж сама клінічна картина при інфекціях, спричинених різними мікробами. Септичний компонент під час інфекційного захворювання може значно обтяжувати захворювання й прогноз, наприклад, стафілококової або менінгококової інфекцій.

3. Септикопіємія - це сепсис, що приводить до утворення гнійних вогнищ в різних органах і тканинах.

4. Токсинемія призводить до отруєння організму токсинами, які виробляє збудник, і розвитку симптомів інтоксикації. Клінічні ознаки інтоксикації обумовлені токсичним ураженням центральної нервової системи (головний біль, запаморочення, нудота, блювота, судоми, втрата свідомості та т.п.), системи дихання (задишка, ядуха, зупинка дихання), кровообігу (тахікардія, брадикардія, підвищення або зниження артеріального тиску, колапс), сечовивідної системи (поліурія, анурія), травної системи (диспепсія та т.п.). Токсичний компонент визначає тяжкість перебігу правця, ботулізму, грипу, дифтерії та інших інфекційних захворювань.

Макроорганізм має цілу серію захисних механізмів проти впливу шкідливих агентів, які об'єднуються загальним терміном - реактивність і, як її наслідок - резистентність, тобто стійкість.

Резистентність має вирішальне значення у виникненні, перебізі та наслідках інфекційного захворювання. Резистентність знижується від голодування, нестачі вітамінів, фізичної та розумової перевтоми, охолодження й т.п., а підвищується в результаті усунення шкідливих факторів праці, коректної організації відпочинку та побуту, спадкового і набутого імунітету.

Таким чином, виникнення інфекційного процесу та форми його перебігу в кожному конкретному випадку визначаються результатом протиборства між патогенним збудником і людським організмом. Наслідками цього протиборства можуть бути: а) загибель збудника, б) виникнення інфекційного процесу (хвороба); в) взаємна адаптація («здорове бактеріоносійство»).

Епідемічний процес - це процес передачі заразного агента від джерела інфекції до сприйнятливого організму (поширення інфекції від хворого до здорового). Він включає 3 ланки:

1. Джерело інфекції, що виділяє збудник у зовнішнє середовище (людина, тварини),
2. Фактори передачі збудника,
3. Сприйнятливий організм, тобто людина, яка не має імунітету проти цієї інфекції.

Джерелом інфекції можуть бути:

1 – людина. Інфекційні хвороби, які вражають тільки людей, називаються антропонозами (від грец. Anthropos - людина, noses - хвороба). Наприклад, на черевний тиф, кір, кашлюк, дизентерію, холеру, малярію хворіють тільки люди.

2 – тварини. Велику групу інфекційних та інвазійних хвороб людини становлять зоонози (від грец. Zoos - тварини), при яких джерелом інфекції служать різні види домашніх і диких тварин та птахів. До зоонозів відносять бруцельоз, сибірку, сап, ящур та ін.

3 - існує також група зооатропонозних інфекцій, при яких джерелом зараження можуть служити як тварини, так і люди (чума, туберкульоз, сальмонельоз).

Факторами передачі збудника можуть слугувати:

1. Повітря – грип, кір передаються тільки через повітря, для інших інфекцій повітря є головним фактором (дифтерія, скарлатина), а для третіх - можливим фактором передачі збудника (чума, туляремія);

2. Вода - черевний тиф, дизентерія, холера, туляремія, бруцельоз, сап, сибірська виразка та т.п.;

3. Грунт - правець, ботулізм, газова гангрена, сибірська виразка, кишкові інфекції, глистні інвазії та т.п.;

4. Харчові продукти - усі кишкові інфекції. З їжею також можуть передаватися збудники дифтерії, скарлатини, туляремії, чуми та т.п.;

5. Предмети праці та побуту, заражені хворою твариною або людиною, можуть служити фактором передачі збудника здоровим людям;

6. Членистоногі - часто є переносниками збудників інфекційних хвороб. Кліщі передають віруси, бактерії та рикетсії; воші - висипний і зворотний тифи; блохи - чуму та щурячий висипний тиф; мухи - кишкові інфекції й глистів; комари - малярію; кліщі - енцефаліт; мошки - туляремію; москіти - лейшманіоз і т.п.;

7. Біологічні рідини (кров, носоглоткові виділення, кал, сеча, сперма, навколоплідна рідина) - ВІЛ, сифіліс, гепатит, кишкові інфекції та т.п.

Основні епідеміологічні характеристики виникнення та поширення інфекційного захворювання визначаються швидкістю поширення, простором території епідемії й масовістю охоплення захворюванням населення.

Варіанти розвитку епідемічного процесу:

1. Спорадичний випадок (спорадична захворюваність). Виникають поодинокі, не пов'язані між собою випадки інфекційних захворювань, які не мають помітного поширення серед населення. Тенденція до поширення в оточенні хворого виражена мінімальним чином (наприклад, хвороба Боткіна).

2. Ендемія - груповий спалах. Виникає, як правило, в організованому колективі, в умовах постійного та тісного спілкування людей. Захворювання розвивається з одного, загального джерела інфікування й за короткий час охоплює до 10 і більше осіб (спалах епідемічного паротиту в групі дитячого садка).

3. Епідемічний спалах. Масове поширення інфекційного захворювання, яке відбувається з колективних спалахів і охоплює цілком одне або декілька організованих колективів із загальним числом хворих 100 і більше осіб (кишкові інфекції та харчові токсикоінфекції).

4. Епідемія. Масова захворюваність населення, за короткий час поширюється на великій території, що охоплює місто, район, область і ряд регіонів держави. Епідемія розвивається з безлічі епідемічних спалахів. Кількість хворих обчислюється десятками і сотнями тисяч людей (епідемії грипу, холери, чуми).

5. Пандемія. Глобальне поширення епідемічної захворюваності серед людей. Епідемією охоплені великі території різних держав, багатьох континентів земної кулі (пандемії грипу, ВІЛ-інфекції).

Природно-вогнищеве інфекційне захворювання - поширення хвороби в межах певних територіальних зон.

Таке явище, коли будь-яке захворювання з великою постійністю реєструється на певній території, називається ендемією. Як правило, - це зоонозні інфекції, які поширюються в відповідних територіальних осередках серед тварин, за допомогою комах, які переносять збудника інфекції. Вчення про природу осередків інфекційних захворювань було сформульовано в 1939 році академіком О.М. Павловським. Природні вогнища інфекційних

захворювань називають нозоареалами, а характерні для територій інфекційні хвороби - природно-вогнищевими інфекціями (геморагічні лихоманки, кліщовий енцефаліт, чума, туляремія та т.п.).

Можна назвати їх екологічно зумовленими хворобами, так як причиною ендемічності служать природні чинники, що сприяють поширенню даних захворювань: наявність тварин - джерел інфекції і комах, які виступають в ролі переносників відповідної інфекції. Нозоареалом холери є Індія та Пакистан. Людина не є фактором, який може підтримувати існування вогнища природного інфекції, так як подібні осередки сформувалися ще задовго до появи людей на цих територіях. Такі осередки продовжують існувати після відходу людей (по завершенні геологорозвідувальних, дорожніх і інших тимчасових робіт). Безсумнівний пріоритет у відкритті та вивченні існування природих осередків інфекційних хвороб належить вітчизняним вченим - академіку О.М. Павловському і академіку А.А. Смородінцеву.

Епідемічний осередок – об'єкт або територія, де розгортається епідемічний процес. Епідемічний осередок може бути обмежений межами квартири, де проживає хворий чоловік, може охоплювати територію дитячого дошкільного закладу, школи, ВНЗ, включати територію населеного пункту, регіону. Кількість хворих в осередку може варіювати від одного-двох до багатьох сотень і тисяч випадків хвороби.

Елементи епідемічного вогнища:

1. Хворі люди і здорові бактеріоносії - джерела зараження оточуючих людей;

2. Особи, що контактують з хворими («контактні»), які в разі виникнення у них захворювання стають джерелом поширення інфекції;

3. Здорові люди, яких за характером трудової діяльності відносять до групи підвищеного ризику поширення інфекції - «декретована група населення» (працівники підприємств громадського харчування, водопостачання, медичні працівники, педагоги та т.п.);

4. Приміщення, в якому знаходиться або знаходилась хвора людина, включаючи предмети обстановки та предмети повсякденного життя, які сприяють передачі заразного агента сприйнятливим людям;

5. Фактори навколишнього середовища, особливо в заміських умовах, які можуть сприяти поширенню інфекції (джерела водокористування та продовольчого забезпечення, наявність гризунів і комах, місця збору відходів і нечистот);

6. Здорове населення на території вогнища, яке не мало контакту з хворими та бактеріоносіями, як сприйнятливий до інфекції контингент, що не є застрахованим від можливого зараження в умовах епідемічного вогнища.

Всі перераховані елементи епідемічного вогнища відображають три основні ланки епідемічного процесу: джерело інфекції – шляхи передачі (механізм зараження) – сприйнятливий організм.

На всі елементи епідемічного вогнища повинні бути направлені відповідні протиепідемічні заходи, щоб найбільш швидко й ефективно вирішують два взаємопов'язані завдання: 1) строго локалізувати вогнище в його межах, не допустити поширення кордонів вогнища; 2) забезпечити якнайшвидшу ліквідацію самого вогнища, щоб не допустити масового захворювання населення.

Механізм передачі інфекції складається з 3-х фаз:

1) виведення збудника з зараженого організму назовні,

2) перебування збудника у зовнішньому середовищі,

3) проникнення збудника в новий організм.

При повітряному механізмі зараження інфекція може передаватися як повітряно-крапельним шляхом, так і повітряно-пиловим. Збудники інфекційних захворювань виділяються в повітря з носоглотки хворого при диханні, розмові, але особливо інтенсивно при чханні та

кашлі, поширюючись з крапельками слини й носоглоткового слизу на кілька метрів від хворої людини. Таким чином, поширюються гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ), коклюш, дифтерія, епідемічний паротит, скарлатина та т.п. Повітряно-пиловий шлях поширення інфекції, коли збудники з потоками повітря здатні поширюватися на значні відстані від хворої людини, характерний для вірусних інфекцій (вітряна віспа, кір, краснуха та т.п.). Повітряно-крапельним шляхом збудник потрапляє в організм, головним чином, через слизові оболонки верхніх дихальних шляхів (через респіраторний тракт) поширюючись потім по всьому організму.

Фекально-оральний механізм зараження відрізняється тим, що збудники інфекції виділяються хворою людиною або бактеріоносієм з його кишковим вмістом, потрапляють в навколишнє середовище. Потім, за посередництвом зараженої води, харчових продуктів, ґрунту, брудних рук, предметів обіходу збудник проникає в організм здорової людини через шлунково-кишковий тракт (дизентерія, холера, сальмонельоз та ін.).

Гематогенний механізм зараження відрізняється тим, що основним фактором поширення інфекції в таких випадках служить інфікована кров, що різними шляхами проникає в кров'яне русло здорової людини. Зараження може відбутися при переливанні крові, в результаті некваліфікованого застосування медичних інструментів багаторазового користування, внутрішньоутробним (вертикальним) шляхом від вагітної до її плоду (ВІЛ-інфекція, вірусний гепатит, сифіліс). До цієї ж групи захворювань віднесені трансмісивні інфекції, що поширюються через укуси комах (малярія, кліщовий енцефаліт, кліщовий бореліоз, чума, туляремія, геморагічні лихоманки та т.п.).

Контактний механізм зараження може здійснюватися як шляхом прямого, так і шляхом опосередкованого (непрямого) контакту - через інфіковані предмети повсякденного життя (різноманітні шкірні захворювання та хвороби, що передаються статевим шляхом).

Деякі інфекційні хвороби відрізняються вираженою сезонністю (кишкові інфекції в жарку пору року).

Ряд інфекційних захворювань має вікову специфіку, наприклад, дитячі інфекції (кашлюк).

Основні напрямки протиепідемічних заходів.

Епідемічний процес виникає та підтримується тільки за наявності трьох ланок: джерела інфекції, механізму передачі збудника, чутливого населення. Отже, усунення однієї з ланок неминуче призведе до припинення епідемічного процесу.

Основні протиепідемічні заходи включають:

1. Заходи, спрямовані на усунення джерела інфекції: виявлення хворих, бактеріоносіїв, їх ізоляція та лікування; виявлення контактних осіб для подальшого спостереження за станом їх здоров'я, щоб вчасно встановити нові випадки захворювань і своєчасно ізолювати хворих людей.

2. Заходи, спрямовані на блокування шляхів поширення інфекції та на запобігання розширенню кордонів вогнища:

а) режимні обмежувальні заходи - обсервація і карантин. Обсервація - спеціально організоване медичне спостереження за населенням у вогнищі інфекції, що включає ряд заходів, спрямованих на своєчасне виявлення й ізоляцію хворих з метою запобігання поширенню епідемії. Одночасно за допомогою антибіотиків проводять екстрену профілактику, роблять необхідні щеплення, ведуть спостереження за суворим виконанням правил особистої та громадської гігієни. Термін обсервації визначається тривалістю максимального інкубаційного періоду для даного захворювання й обчислюється з моменту ізоляції останнього хворого та закінчення дезінфекції у вогнищі. Карантин – це система найбільш суворих ізоляційно-

обмежувальних протиепідемічних заходів, що проводяться для попередження поширення інфекційних захворювань;

б) дезінфекційні заходи, що включають не тільки знезараження, але також дезінсекцію, дератизацію (знищення комах і гризунів);

3. Заходи, спрямовані на підвищення несприйнятливості населення до інфекції, серед яких найбільш важливе значення мають методи екстреної профілактики виникнення захворювання:

а) імунізація населення за епідемічними показаннями;

б) використання протимікробних засобів з профілактичною метою (бактеріофаги, інтерферони, антибіотики).

Зазначені протиепідемічні заходи в умовах епідемічного вогнища обов'язково доповнюються проведенням цілого ряду організаційних заходів, спрямованих на обмеження контактів серед населення. В організованих колективах проводиться санітарно-освітня та виховна робота, залучаються засоби масової інформації. Важливе значення набуває виховна та санітарно-освітня робота педагогів з учнями.

Методи дезінфекції в епідемічному осередку.

Дезінфекція – це комплекс заходів, спрямованих на знищення збудників та усунення джерел інфекції, а також запобігання подальшого поширення.

Дезінфекційні заходи включають:

1) дезінфекцію (методи знищення хвороботворних мікроорганізмів),

2) дезінсекцію (методи боротьби з комахами - переносників збудників інфекційних хвороб),

3) дератизацію (методи знищення гризунів – джерел і розповсюджувачів інфекції).

Крім дезінфекції є й інші способи знищення мікроорганізмів: 1) стерилізація (кип'ятіння інструментів протягом 45 хвилин попереджає зараження епідемічним гепатитом), 2) пастеризація - нагрівання рідин до 50-60 градусів з метою їх знезараження (наприклад, молока). Протягом 15-30 хвилин гинуть вегетативні форми кишкової палички.

Способи дезінфекції. Для дезінфекції застосовують фізичні та хімічні методи знезараження. До фізичних методів відносять кип'ятіння, автоклавування, термічну обробку в сухожарових шафах, у дезінфекційних камерах, ультрафіолетове опромінення. Хімічні методи дезінфекції здійснюються із застосуванням хімічних препаратів, що мають високу бактерицидну активність (хлорне вапно, хлорамін, гіпохлорити кальцію та натрію, лізол, формалін, карболова кислота). Дезінфікуючу дію мають також мило й синтетичні миючі засоби. Біологічні методи дезінфекції – це знищення мікроорганізмів засобами біологічної природи (наприклад, за допомогою мікробів-антагоністів). Застосовується для знезараження стічних вод, сміття та відходів.

Для проведення осередкової поточної та заключної дезінфекції в осередках кишкових інфекцій використовують 0,5% розчин хлорвмісних деззасобів, при повітряно-крапельних інфекціях - 1,0 %, в осередках активного туберкульозу - 5,0 %. При роботі з дезінфікуючими препаратами необхідно дотримуватися обережності (користуватися захисним одягом, окулярами, маскою, рукавичками).

Експериментальна інфекція. Цілі та способи зараження тварин. Етика експериментальних досліджень.

Біологічний метод (експериментальний або біопроба) полягає в зараженні досліджуваним матеріалом чутливих лабораторних тварин або інших біологічних об'єктів

(курячі ембріони, культури клітин). Його використовують для виділення чистої культури збудника, визначення типу токсину, активності антимікробних хіміотерапевтичних препаратів.

При проведенні мікробіологічної діагностики інфекційних хвороб у бактеріологічних та вірусологічних лабораторіях часто вдаються до зараження піддослідних тварин. Зараження тварин проводять з метою виділення патогенних мікроорганізмів, які повільно або зовсім не ростуть на поживних середовищах. Часто цим способом користуються для виділення збудника з досліджуваного матеріалу, який сильно забруднений іншими мікробами (наприклад, при виділенні паличок чуми з трупів людей і тварин). Так виділяють стрептококи з мокротиння, туберкульозні палички з осаду сечі та т.п.

Експериментальне зараження тварин використовують також для відтворення інфекційного захворювання на біологічній моделі тоді, коли збудник захворювання невідомий, для вивчення факторів вірулентності, дії токсинів, визначення мінімальних смертельних доз виділених чистих культур. За його допомогою вивчають ефективність лікувальної дії антибіотиків та інших хіміотерапевтичних препаратів. Моделювання експериментальної інфекції має важливе значення для оцінки якості живих вакцин, ефективності імунологічних препаратів.

З цією метою найчастіше використовують таких лабораторних тварин, як кролики, гвінейські (морські) свинки, білі щури та миші, рідше - котів, собак, голубів, хом'яків, мавп. Зараження тварин проводиться або природним шляхом через дихальні шляхи та рот, або штучним способом через ін'єкції.

В даний час моделювання інфекційного процесу проводиться відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях (Страсбург, 18 березня 1986 року).

До виконання експериментальних досліджень на тваринах допускаються особи, які мають вищу медичну, біологічну, фармацевтичну, ветеринарну, зоотехнічну освіту, після того як вони освоїли правила поводження з лабораторними тваринами та набули практичних навичок.

В даний час зусиллями дослідників багатьох країн світу методом тісного інбридингу (всередині родинного схрещування) вдалося вивести понад 200 ліній мишей, понад 20 ліній щурів, 7 ліній морських свинок, кілька ліній кроликів. Серед диких тварин чистих ліній не існує. На виведення ліній витрачається не менше 8-10 років ретельно виконуваної роботи. Кожній лінії притаманні свої спадокі особливості та властивості (підвищена або знижена чутливість до збудників інфекційних захворювань, пухлин і т.п.). Лінійні (інбредні) тварини, подібно однояйцевих близнюків гомозиготні. Вони цінні тим, що є генетично однорідними і відрізняються від нелінійних тварин постійними реакціями на вплив фізіологічних, хімічних і патогенних факторів.

Лінійних тварин отримують методом безперервного тісного інбридингу, тобто при спарюванні близьких родичів. З метою виведення певної лінії лабораторних мишей, щурів або інших тварин здійснюють братерсько-сестринське схрещування протягом більше 20 послідовних поколінь і лише тоді досягають 100 % гомозиготності. Такі лінійні тварини є генетично контрольованими.

За рекомендацією міжнародного комітету зі стандартизації генетичної номенклатури назви ліній пишуться головними латинськими буквами. У заголовку лінії закладено її походження, рік створення будь-якої особливості тварин даної лінії. Так серед білих мишей найбільш поширені A, CBA, BALB, BAJJ, C57BL, C57BR, C58, C3H.

Лінійні лабораторні тварини дуже чутливі до несприятливих факторів навколишнього середовища тому умови утримання їх повинні бути кращими, ніж нелінійних тварин.

Як лінійні, так і нелінійні тварини є носіями збудників багатьох вірусних, бактеріальних, грибкових захворювань, які ускладнюють виконання точних досліджень. В процесі експерименту, особливо тривалого, присутні в організмі тварини збудники можуть активуватися і перекрутити характер реакції на випробуваний агент. У зв'язку з цим виникла потреба отримання лабораторних тварин, позбавлених мікроорганізмів або тих , що мають контрольовану мікрофлору. Сучасна технологія дозволяє отримувати, вирощувати й утримувати в стерильних умовах протягом усього їхнього життя лабораторних тварин, зовсім позбавлених мікроорганізмів, так званих гнотобіотів. Їх отримують від вагітних самок, яким проводять кесарів розтин в певний період перед пологами. Новонароджених поміщають на утеплені підстилки в клітини. Корм, воду, підстилку та інші матеріали, необхідні для забезпечення життєдіяльності безмікробних тварин, піддають стерилізації в автоклавах. В даний час у стерильних умовах в гнотобіотичних ізоляторах отримані безмікробні миші, щури, морські свинки, хом'ячки, кролики.

Піддослідних тварин слід підбирати однорідними за віком, статтю, масою та генетичними характеристиками. Відібраних тварин необхідно ретельно оглянути й вибракувати підозрілих або хворих. Вибір виду, лінії, віку та статі тварин диктується цілями досліджень. Існує цілий ряд маркування лабораторних тварин, основними з яких є наступні:

-татуювання вух у тварин, що мають великі непігментовані вушні раковини (кролики, свинки, щури, миші). Для татуювання застосовують туш і спеціальні щипці.

-нанесення мітки мишам і щурам фарбами, кращими з яких вважаються насичений розчин пікринової кислоти, 0,5 % розчин генціанвіолета, фуксин, еозин.

-використання у якості мітки для лабораторних тварин, в тому числі й новонароджених, кілець, жетонів з м'якої білої жерсті, які закріплюють на вухах або лапках.

Методи зараження лабораторних тварин.

Найбільш широко лабораторні тварини використовуються в бактеріологічній і вірусологічної практиці, як з метою діагностики, так і для відтворення експериментальних інфекцій. Застосовують наступні методи зараження тварин: накожний, внутрішньошкірний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньопорожнинний (черевна порожнина, грудна, передня камера ока), внутрішньоорганний (мозок, легені), введення мікроорганізмів у травний або дихальний тракт.

Ділянку шкіри, де відбувається та чи інша маніпуляція, безпосередньо перед її виконанням або заздалегідь, обробляють в такій послідовності:

-вищіпують або вистригають (виголюють) шерсть;

-видаляють залишки вовни депілятором;

-дезінфікують ділянку спиртом, спиртом в суміші з ефіром 1:1, 10 % настоянкою йоду.

1. Накожний метод. На шкіру спини або живота, звільнену від шерсті, наносять подряпини скаріфікаційною голкою. Матеріал беруть скляною паличкою та втирають насухо.

2. Внутрішньошкірний метод. Місцем введення зазвичай обирають шкіру спини або живота. Шерсть на цьому місці за два дні до експерименту видаляють. Використовують дуже тонкі та гострі голки з пологим скосом. Голку вводять у шкіру під дуже гострим кутом скосом вгору. Вводять до 0,1 мл розчину. Утворене здуття спостерігають 3-5 хвилин.

6. Підшкірний метод. Голку шприца вводять у основу шкірної складки передбачуваного місця ін'єкції. Після проколу шкіри напрямок голки змінюють і повільно вводять рідину - мишам не більше 1,0 мл, морським свинкам і щурам - 1,5 мл, кроликам - 3,0 мл, місце введення обробляють. Стежать за тим, щоб введений матеріал не витікав назовні.

3. Внутрішньом'язовий метод. Кращим місцем введення вважається ділянку з розвиненим м'язовим шаром в області верхньої третини задньої лапи тварини. Голку направляють майже перпендикулярно ділянці.

4.Внутрішньовенний метод. Ін'єкцію проводять у крайову вену вуха кроликів, яремну вену морських свинок, хвостову вену щурів або мишей. Обробляють шкіру над веною. Для кращого наповнення вени її віджимають нижче майбутнього введення або шкіру обігрівають теплою (55 °С) водою. Матеріал вводять повільно.

5. Внутрішньобрюшинний метод. Ін'єкцію роблять у задній третині живота. Місце введення обробляють до та після ін'єкції. Тварину розташовують догори дригом або в похилому положенні. Відступивши від середньої лінії, черевну стінку проколюють, вводять голку під тупим кутом до стінки. Голка повинна бути з притупленим кінцем щоб уникнути пошкодження внутрішніх органів.

7. Оральний метод. Матеріал вводять примусово за допомогою тонкого еластичного зонда. Кроликів і морських свинок сповивають і тримають у положенні, близькому до вертикального. Перед введенням зонда тварині вставляють роторасширювач з отвором в середині; просування зонда стравоходом зазвичай не викликає труднощів, якщо його кінець змазаний вазеліном, а у тварини викликають ковтальні рухи закапуванням в рот декількох крапель води. Через воронку або шприц рідину вливають в шлунок. Щурів або мишей помічник фіксує в вертикальному положенні. Рідину можна вводити двома способами: а) шприцом зі спеціальною вигнутою голкою, кінець якої потовщений у вигляді кульки з боковим отвором; б) шприцом зі звичайною голкою, на яку насаджений тонкий еластичний зонд. Тваринам відкривають рот браншами пінцета. Процес введення зонда вимагає навичок. Обсяг рідини залежить від виду та віку тварини.

8. Інтраназальний метод.

Розтин лабораторного тварин.

Експериментальні тварини підлягають виведенню з експерименту гуманним методом (евтаназії): шляхом декапитации з використанням спеціальних гильотин, шляхом передозування наркотичних речовин (ефіру, хлороформу, барбітуратів), повітряної емболії - внутрішньовенним введенням повітря, повним знекровленням при використанні різних методів знеболення. Розтин починають з грудної порожнини, видаляючи грудину. Якщо в грудній порожнині є ексудат, з нього роблять мазки та посів. Кров із серця забирають проколом пастерівською піпеткою з витягнутим капілярним кінцем. Проводять огляд органів грудної порожнини та за необхідності забирають з них шматочки тканини. Далі розкривають черевну порожнину. При наявності ексудату його засівають у живильне середовище. Потім ретельно оглядають і досліджують органи черевної порожнини. Взяття матеріалу з паренхіматозних органів проводять наступним чином: поверхню органу припікають нагрітим в полум'ї спиртівки скальпелем відповідного розміру; припечену ділянку органу проколюють стерильної пастерівською піпеткою з витягнутим кінцем або стерильною петлею; взятий матеріал засівають.

Всі етапи роботи з лабораторними тваринами повинні бути зареєстровані у відповідному журналі з графами (протокол дослідження):

Вид лабораторної тварини.

Мета зараження.

Час зараження.

Матеріал, застосований для зараження.

Зміна поведінкових реакцій тварини після зараження.

Час загибелі тварини.

Зміни, виявлені при розтині.

Матеріал, взятий для посіву.
Властивості мікроорганізму.
Вид мікроорганізму.
(Джерело: http: //www.studfiles).

Теоретичні питання:

1. Визначити поняття «інфекція», «інфекційний процес», «інфекційне захворювання».
2. Роль мікроорганізмів в інфекційному процесі. Патогенність мікробів, визначення.
3. Вірулентність, визначення, одиниці вимірювання. Фактори патогенності бактерій.
4. Фази та динаміка розвитку інфекційної хвороби.
5. Форми інфекції та механізм передачі інфекції.
6. Поняття про патогенез інфекційного захворювання.
7. Біологічний метод дослідження. Його застосування при вивченні етіології, патогенеза. імуногенеза, діагностики, терапії і профилактики інфекційних захворювань.

Протокол №16

Тема: ***Вчення про імунітет. Реакція аглютинації та преципітації.***

Мета: ***Оволодіти технікою постанови реакції аглютинації та реакції преципітації для діагностики інфекційних захворювань.***

1. Постанова розгорнутої реакції аглютинації для виявлення антитіл в сироватці хворого.

СХЕМА ПОСТАНОВИ РЕАКЦІЇ

Інгредієнти реакції	Номери пробірок			
	1	2	3	контроль
Фізіологічний розчин (в мл)	1,0	1,0	1,0	2,0
Сироватка хворого у розведенні 1:50 (в мл)	1,0	1,0	1,0	–
Діагностикум (в мл)	0,1	0,1	0,1	0,1

Висновок: _____
_____
_____

2. Постанова реакції мікроаглютинації на склі для визначення антигенного типу мікроорганізму.

Висновок:
_____
_____
_____
_____

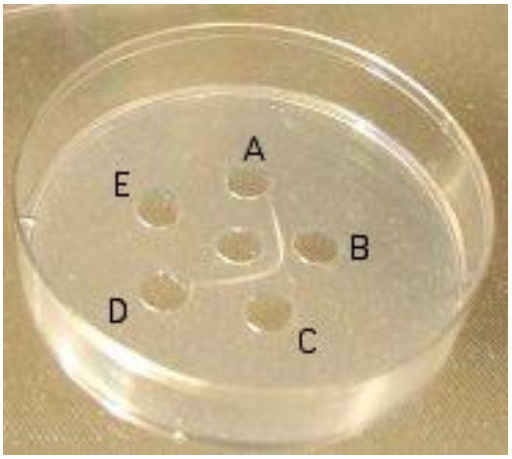
3. Постанова реакції преципітації.

СХЕМА ПОСТАНОВИ РЕАКЦІЇ

Інгредієнти реакції	Номери пробірок					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Сироватка, що містить антитіла (преципітини)	0,5	0,5	0,5			
Нормальна сироватка				0,5	0,5	0,5
Екстракт, що потребує діагностики		0,5			0,5	
Нормальний екстракт			0,5			0,5
Екстракт, що містить антигени	0,5			0,5		
Результат реакції	+	+ або –	–	–	–	–

Висновок:_____
_____
_____

4. Вивчення принципу постанови реакції преципітації в гелі.



Позитивна реакція: _____

Негативна реакція: _____

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Реакція аглютинації - проста за постановкою реакція, при якій відбувається зв’язування антитілами корпускулярних антигенів (бактерій, еритроцитів або інших клітин, нерозчинних частинок з адсорбованими на них антигенами, а також макромолекулярних агрегатів). Вона протікає за наявності електролітів, наприклад при додаванні ізотонічного розчину хлориду натрію. Застосовуються різні варіанти реакції аглютинації: розгорнута, орієнтовна, непряма і т.п. Реакція аглютинації проявляється утворенням пластівців (клітини, «склеєні» антитілами, що мають два або більше антигензв'язуючих центрів); використовується для:

1) визначення антитіл у сироватці крові хворих, наприклад, при бруцельозі (реакції Райта, Хеддельсона), черевному тифі та паратифах (реакція Відаля) й інших інфекційних хворобах;

2) визначення збудника (антигену), виділеного від хворого;

3) визначення груп крові з використанням моноклональних антитіл проти алоантігенів еритроцитів.

Для визначення у хворого антитіл ставлять розгорнуту реакцію аглютинації: до разведень сироватки крові хворого додають діагностикум (суспензія вбитих мікробів) і через декілька годин інкубації при 37 ˚С визначають найбільше розведення сироватки (титр сироватки), при якому сталася аглютинація, тобто утворився осад. Характер і швидкість аглютинації залежать від виду антигену та антитіл. Прикладом є особливості взаємодії діагностикумів (О- і Н-антигенів) зі специфічними антитілами. Реакція аглютінаціі з О-діагностикумом (бактерії, убиті нагріванням, зберегли термостабільний О-антиген) відбувається у вигляді мелкозернистої аглютинації. Реакція аглютинації з Н-діагностикумом (бактерії, убиті формаліном, зберегли термолабільний джгутиковий Н-антиген) - крупнопластивцева і протікає швидше.

Якщо необхідно визначити збудник, виділений від хворого, ставлять оріентовну реакцію аглютинації, застосовуючи діагностичні антитіла, тобто проводять серотипування збудника. Орієнтовну реакцію проводять на предметному склі. До краплі діагностичної сироватки в розведенні 1:10 або 1:20 додають чисту культуру збудника, виділеного від хворого. Поруч ставлять контроль: замість сироватки наносять краплю розчину натрію хлориду. При появі в краплі з сироваткою та мікробами осаду у вигляді пластівців ставлять розгорнуту реакцію аглютинації в пробірках зі зростаючими разведеннями сироватки, до яких додають по 2-3 краплі суспензії збудника. Аглютинацію обліковують за кількістю осаду та ступенем просвітління рідини. Одночасно враховують контролі: сироватка, розведена ізотонічним розчином хлориду натрію, повинна бути прозорою, суспензія мікробів у тому ж розчині - рівномірно каламутною, без осаду. Найчастіше користуються адсорбованими аглютинуючими сироватками, з яких видалені перехресно реакційні антитіла шляхом адсорбції їх родинними бактеріями. У таких сироватках зберігаються антитіла, специфічні тільки до даної бактерії.

В основі реакції гемаглютинації є феномен склеювання еритроцитів, що відбувається під впливом різних факторів. Розрізняють пряму і непряму гемаглютинацію.

При реакції прямої гемаглютинації відбувається склеювання еритроцитів при адсорбції на них певних антигенів, наприклад вірусів.

В серологічних дослідженнях застосовують реакцію гальмування гемаглютинації, коли виділений у хворого вірус нейтралізують специфічною імунною сироваткою, а потім з'єднують з еритроцитами. Відсутність гемаглютинації говорить про відповідність вірусу та використовуваної імунної сироватки.

Реакція непрямої гемаглютинації (пасивна гемагглютинация) спостерігається в тих випадках, коли до еритроцитів, заздалегідь оброблених (сенсибілізованих) різними антигенами, додають імунну сироватку або сироватку хворого, що має відповідні антитіла. Відбувається специфічне склеювання еритроцитів, їх пасивна гемаглютинація.

Реакція непрямої, або пасивної, гемаглютинації за чутливістю та специфічністю перевершує інші серологічні методи, і її використовують при діагностиці інфекцій, викликаних бактеріями, рикетсіями, найпростішими.

Методика постанови реакції непрямої гемаглютинації складається з декількох етапів. Спочатку еритроцити відмивають фізіологічним розчином хлориду натрію, потім за необхідності (при використанні антигенів білкової природи) їх обробляють розчином таніну 1:20000 та сенсибілізують розчинними антигенами. Після відмивання буферним фізіологічним розчином хлориду натрію еритроцитарний антиген готовий до вживання. Досліджувані сироватки розводять фізіологічним розчином хлориду натрію в пробірках або спеціальних пластмасових пластинках з луночками, потім до кожного розведення сироватки додають еритроцитарний діагностикум. Результати реакції непрямої гемаглютинації враховують за характером осаду еритроцитів, що утворився на дні пробірки. Позитивним вважають результат

реакції, при якому еритроцити рівномірно покривають усе дно пробірки. При негативній реакції еритроцити у вигляді маленького диска або «гудзика» розташовуються в центрі дна пробірки. (Джерело: http://microbiology.ucoz.org/index)

На відміну від реакції аглютинації антигеном для реакції преципітації служать розчинні сполуки, величина частинок яких наближається до розмірів молекул. Це можуть бути білки, комплекси білків з вуглеводами та ліпідами, бактеріальні екстракти, різні лізати або фільтрати бульйонних культур мікробів. Антитіла, які беруть участь в реакції преципітації, називають преципітіни. Утворений дрібнодисперсний комплекс антиген-антитіло виявляється при певних методах постановки реакції преципітації.

Реакція кольцепреципітаціі запропонована вперше Асколі. Її використовують при діагностиці сибірки, чуми, туляремії, менінгіту. Метод простий і доступний. У вузькі преципітаційні пробірки розливають специфічну імунну преципітуючу сироватку та на неї дуже обережно нашаровують антиген. В якості антигену беруть, наприклад, при діагностиці сибірки шматочки шкіри, вовни тварин. Їх кип'ятять, рідину фільтрують і використовують як антиген. Поява на межі двох рідин кільця - преципітату свідчить про наявність відповідного антигену.

Реакція преципітації в агаровому гелі, або метод дифузійної преципітації, дозволяє детально вивчити склад водорозчинних антигенних сумішей. Для постановки реакції використовують гель (напіврідкий або більш густий агар). Кожен компонент, що входить до складу антигену, дифундує назустріч відповідному антитілу з різною швидкістю. Тому комплекси різних антигенів і відповідних антитіл розташовуються в різних ділянках гелю, де і утворюються лінії преципітації. Кожна з ліній відповідає тільки одному комплексу антиген-антитіло. Реакцію преципітації ставлять зазвичай при кімнатній температурі.

Метод імуноелектрофорезу набув широкого поширення в останні роки при дослідженні антигенної структури бактерій. Комплекс антигенів розміщують у луночці, яка знаходиться в центрі агарного гелю. Потім через агаровий гель пропускають електричний струм, в результаті чого різні антигени, що входять до комплексу, переміщаються в полі електричного струму в залежності від їх електрофоретичної рухливості. Після закінчення електрофорезу в траншею, розташовану по краю пластинки, вносять специфічну імунну сироватку та поміщають у вологу камеру. У місцях утворення комплексу антиген-антитіло з'являються лінії преципітації.

Реакція преципітації є дуже чутливим методом, її застосовують при дослідженні різних білкових і полісахаридних антигенів в судово-медичній практиці для визначення видової приналежності плям крові, сперми, сироватки, наявних на білизні і різних предметах. Цю реакцію можна також використовувати для виявлення різних домішок у молоці, рибних і м'ясних продуктах, визначення природи білків, що входять до складу фарб старовинних майстрів живопису.

Радіальна імунодифузія за Манчіні.

У 1965 р Джульєтта Манчіні і співавтори й незалежно від них - Д.Л. Фей і Е.М. МакКелві розробили методику радіальної імунодифузії (РІД) в тому ж агаровому гелі для кількісного визначення вмісту в крові (в сироватці) імуноглобулінів класів А, G і М.

Радіальна іммунодіффузія по Манчіні дозволяє використовувати моноспеціфічну антисироватку та еталон з відомим вмістом антигену. Тест-антиген і розведення розчинів, досліджуваних на наявність даного антигену, поміщають у лунки, вирізані рядами в пластині гелю, куди попередньо внесена відповідна моноспецифічна антисироватка. Антиген дифундує в гель і, з'єднавшись зі специфічними антитілами, формує кільця преципітації, діаметри яких залежать від концентрації антигену в лунках. Отримані результати використовують для побудови калібрувальної кривої, що виражає залежність діаметрів преципітатов від концентрації антигену в досліджуваних розчинах.

Принцип радіальної дифузії покладено в основу методу, застосовуваного для вивчення токсигенності бактеріальних культур і відбору з бактеріальної популяції клонів з високим ступенем токсичності. В цьому випадку досліджувані культури засівають в чашки з агаром, що містить антитоксичну сироватку. Навколо окремих колоній утворюються кільця преципітації, діаметр яких є прямо пропорційним ступеню токсичності штаму, тобто діаметр кілець преципітатів тим більший, чим вище концентрація імуноглобулінів в досліджуваній біопробі. Хоча метод РІД розроблений півстоліття тому, його нерідко використовують в лабораторіях клінічної імунології до теперішнього часу в силу простоти виконання, відносно невисокій вартості реагентів і незалежності від приладів.

Метод РІД застосовуємо тільки для названих ізотипів імуноглобулінів (M, A і G), бо їх фізіологічні концентрації в сироватках крові потрапляють в межі чутливості методу (мг/мл).

Ізотипи IgD і IgE присутні в нормальних сироватках у таких низьких концентраціях, які метод РІД не охоплює. Концентрації IgE визначають за допомогою високочутливих варіантів імуноферментного аналізу - ІФА.

Теоретичні питання:

1. Визначити поняття ‘антигени’, ‘антитіла’.
2. Роль антигенів як індукторів імунної відповіді.
3. Структура антитіл (різних класів імуноглобулінів).
4. Механізм взаємодії антитіл з антигенами.
5. Реакції імунітету, їхня роль в імунній відповіді і діагностиці інфекційних хвороб.
6. Механізм реакції аглютинації.
7. Механізм реакції преципітації.

Протокол №17

Тема: ***Вчення про імунітет. Реакція зв'язування комплементу. Реакція лізису.***

Мета: ***Оволодіти технікою постанови реакції зв'язування комплементу і реакції лізису.***

1. Постанова та облік реакції гемолізу.

Схема постанови реакції гемолізу (визначення титру комплементу)

Інгредієнти* (мл.)	Номери пробірок								
	1-а	2-а	3-а	4-а	5-а	6-а	7-а	8-а	9-а
Гемолітична кроляча сироватка	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	–	0,5
5% суспензія баранячих еритроцитів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент 1:10	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	–	0,5	–
Фізіологічний розчин	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	2,0	1,5	1,5
Результат (гемоліз)	–	–	+	+	+	+	–	–	–

Примітка: *всі сироватки, що беруть участь у здійсненні реакції гемолізу, повинні бути звільнені від власного комплементу.

(+) – лізис еритроцитів, (-) – лізису еритроцитів немає.

Реакція гемолізу в лабораторній практиці використовується для визначення титру комплементу, а також для обліку результатів діагностичних реакцій зв'язування комплементу (реакція Борде-Жангу і реакція Вассермана. Титр комплементу – це найменша його кількість, що зумовлює лізис еритроцитів протягом 30 хвилин у гемолітичній системі в об'ємі 2,5 мл.

Висновок: _____

_____

_____

2. Постанова та облік реакції зв'язування комплементу.

СХЕМА ПОСТАНОВИ РЕАКЦІЇ БОРДЕ-ЖАНГУ

Інгредієнти (мл.)	Номери пробірок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Досліджувана інактивована сироватка	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-
Діагностична інактивована сироватка	-	0,5	-	-	0,5	-	-	-
Інактивована нормальна сироватка	-	-	0,5	-	-	-	-	-
Антиген	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-	-
Комплемент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Фізіологічний розчин	-	-	-	0,5	0,5	0,5	1,0	1,5
Пробірки ставимо в термостат при 37^{o}С на 1 год.								
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Пробірки ставимо в термостат при 37^{o}С на 1 год.								
Результат (гемоліз)	?	-	+	+	+	+	+	+

Примітка: (-) – немає гемолізу, (+) – гемоліз

Висновок:_____
_____
_____

Комплемент – _____
_____

Шляхи активації комплементу

1._____
2._____
3._____

РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

Цю реакцію застосовують для виявлення антитіл у сироватці крові при різних інфекціях, а також для ідентифікації збудника за антигенною структурою.

Реакція зв'язування комплементу належить до складних серологічних реакцій.

Особливістю цієї реакції є те, що зміна антигену під впливом специфічних антитіл відбувається тільки в присутності комплементу. Комплемент адсорбується лише на комплексі "антитіло-антиген". Адсорбція комплементу на комплексі "антиген-антитіло" може по-різному відбитися на долі антигена в залежності від його особливостей.

Деякі з антигенів піддаються за цих умов різким морфологічним змінам, аж до розчинення (гемоліз, феномен Ісаєва-Пфейфера, цитолітична дія). Інші змінюють швидкість пересування (іммобілізація трепонем). Треті гинуть без явних деструктивних змін (бактерицидна або цитотоксична дія). Нарешті, адсорбція комплементу може і не супроводжуватися змінами антигену, легко доступними для спостереження (реакція Борде-Жангу, реакція Вассермана).

Реакція зв'язування комплементу відрізняється високою чутливістю і специфічністю.

За механізмом дії реакція зв'язування комплементу протікає двома фазами:

а) перша фаза – це утворення комплексу "антиген – антитіло" і адсорбція на цьому комплексі комплементу;

б) друга фаза – це зміна антигену під впливом специфічних антитіл у присутності комплементу.

У випадку, коли зміни антигену залишаються недоступними для візуального спостереження, доводиться використовувати другу систему, яка виконує роль індикатора, що дозволяє оцінити стан комплементу і зробити висновок про результат реакції.

Друга система представлена двома інгредієнтами, – гемолітичною кролячою сироваткою і баранячими еритроцитами, і називається "гемолітичною системою".

Якщо реакція зв'язування комплементу позитивна, то утворюється комплекс "антитіло-антиген", що адсорбує на собі комплемент. Оскільки лізис еритроцитів може відбутися тільки в присутності комплементу, то за його адсорбції на комплексі "антитіло – антиген" лізис еритроцитів у гемолітичній (індикаторній) системі не відбудеться. Якщо реакція зв'язування комплементу негативна, комплекс "антиген-антитіло" не утворюється, комплемент залишається вільним, і при додаванні гемолітичної системи наступає лізис еритроцитів.

СХЕМА ПОСТАНОВИ РЕАКЦІЇ ВАССЕРМАНА

Інгредієнти (мл.)	Номери пробірок			
	1	2	3	4
Інактивована досліджувана сироватка	1,0	1,0	1,0	1,0
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4
Антиген 1 (неспецифічний, ліпоїдна фракція бичачого серця)	0,5	-	-	-
Антиген 2 (специфічний, виготовлений з культури трепонем)*	-	0,5	-	-
Антиген 3 (специфічний, виготовлений з культури трепонем)	-	-	0,5	-
Комплемент	0,5	0,5	0,5	0,5
Пробірки ставимо в термостат при 37° С на 1 год				
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0
Пробірки ставимо в термостат при 37° С на 1 год				
Результат (гемоліз)**	+ + + +	+ + + +	+ + + +	-

Примітка: *специфічний антиген виготовляється з тканинного штаму трепонем, **(++++) – повна затримка гемолізу, реакція позитивна, (-) – гемоліз, реакція негативна.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Система комплементу – комплекс складних білків, постійно присутніх у крові. Це каскадна система протеолітичних ферментів, призначена для гуморального захисту організму від дії чужорідних агентів, вона бере участь в реалізації імунної відповіді організму. Є важливим компонентом як вродженого, так і набутого імунітету.

Біологічні функції:

- опсонізуюча функція. Відразу слідом за активацією системи комплементу утворюються опсонізуючі компоненти, які покривають патогенні організми або імунні комплекси, залучаючи фагоцити. Наявність на поверхні фагоцитуючих клітин рецептора до C3b підсилює їх прикріплення до опсонізованих бактерій і активує процес поглинання. Таке тісніше прикріплення C3b-пов'язаних клітин або імунних комплексів до фагоцитуючих клітин отримало назву феномена імунного прикріплення.

- солюбілізація (тобто розчинення) імунних комплексів (молекулою C3b). При недостатності комплементу розвивається імунокомплексна патологія (СКВ-подібні стани). [СКВ = системний червоний вовчак]

- участь у запальних реакціях. Активація системи комплементу призводить до виділення з тканинних базофілів і базофілів крові біологічно активних речовин (гістаміну, серотоніну,

брадикініну), які стимулюють запальну реакцію (медіатори запалення). Біологічно активні компоненти, які утворюються при розщепленні С3 і С5, призводять до вивільнення вазоактивних амінів, таких як гістамін, з тканинних базофілів і базофілів крові. У свою чергу це супроводжується розслабленням гладкої мускулатури та скороченням клітин ендотелію капілярів, посиленням судинної проникності. Фрагмент С5а й інші продукти активації комплементу сприяють хемотаксису, агрегації та дегрануляції нейтрофілів і утвореню вільних радикалів кисню. Введення С5а тваринам призводило до артеріальної гіпотонії, звуження легеневих судин і підвищення проникності судин через пошкодження ендотелію.

Функції С3а:

- виступає в ролі хемотаксичного фактора, викликаючи міграцію нейтрофілів у напрямку до місця його вивільнення;
- індукує прикріплення нейтрофілів до ендотелію судин і один до одного;
- активує нейтрофіли, викликаючи в них розвиток респіраторного вибуху та дегрануляцію;
- стимулює продукцію нейтрофілами лейкотрієнів.

- цитотоксична, або літична функція. У кінцевій стадії активації системи комплементу утворюється мембраноатакуючий комплекс (МАК) з пізніх компонентів комплементу, який атакує мембрану бактеріальної або будь-якої іншої клітини та руйнує її.

Фактор С3е, що утворюється при розщепленні фактора С3b, має здатність викликати міграцію нейтрофілів з кісткового мозку, і в такому випадку бути причиною лейкоцитозу.

Активація системи комплементу

1. Класичний шлях

Класичний шлях запускається активацією комплексу С1 (він включає одну молекулу С1q та по дві молекули С1r і С1s). Комплекс С1 зв'язується з допомогою С1q з імуноглобулінами класів М і G, пов'язаними з антигенами. Гексамерний С1q за формою нагадує букет нерозкритих тюльпанів, «бутони» якого можуть зв'язуватися з Fc-ділянкою антитіл. Для ініціації цього шляху досить єдиної молекули IgM, активація молекулами IgG менш ефективна й вимагає більше молекул IgG.

С1q зв'язується прямо з поверхнею патогена, це веде до конформаційних змін молекули С1q, і викликає активацію двох молекул серінових протеаз С1r. Вони розщеплюють С1s (теж серинову протеазу). Потім комплекс С1 зв'язується з С4 і С2 і потім розщеплює їх, утворюючи С2а і С4b. С4b і С2а зв'язуються один з одним на поверхні патогена, і утворюють С3-конвертазу класичного шляху, С4b2a. Поява С3-конвертази призводить до розщеплення С3 на С3а і С3b. С3b утворює разом з С2а і С4b С5-конвертазу класичного шляху. С5 розщеплюється на С5а і С5b. С5b залишається на мембрані і з'єднується з комплексом С4b2a3b. Потім з'єднуються С6, С7, С8 і С9, яка полімеризується і виникає трубочка всередині мембрани. Тим самим порушується осмотичний баланс і в результаті бактерія лопається. Класичний шлях діє більш точно, оскільки так знищується будь-яка чужорідна клітина.

2. Альтернативний шлях

Альтернативний шлях запускається гідролізом С3 прямо на поверхні патогена. В альтернативному шляху беруть участь фактори В і D. З їх допомогою відбувається утворення ферменту С3bBb. Стабілізує його і забезпечує його тривале функціонування білок Р. Далі РС3bBb активує С3, в результаті утворюється С5-конвертаза і запускається формування мембраноатакуючого комплексу. Подальша активація термінальних компонентів комплементу відбувається так само, як і класичним шляхом активації комплементу. Коли мікроорганізми потрапляють в організм, комплекс С3bBb починає накопичуватися на мембрані, каталізує реакцію розщеплення С3 на С3b і С3а, значно збільшуючи концентрацію С3b. До комплексу

пропердин+C3bBb приєднується ще одна молекула C3b. Утворений комплекс розщеплює C5 на C5a і C5b. C5b залишається на мембрани. Відбувається подальша збірка МАК з почерговим приєднанням факторів C6, C7, C8 і C9. Після з'єднання C9 з C8 відбувається полімеризація C9 й утворюється трубочка, яка пронизує мембрану бактерії, починається закачування води табактерія лопається.

Альтернативний шлях відрізняється від класичного наступним: при активації системи комплементу не потрібно утворення імунних комплексів, він відбувається без участі перших компонентів комплементу - C1, C2, C4. Він також відрізняється тим, що спрацьовує відразу ж після появи антигенів - його активаторами можуть бути бактеріальні полісахариди і ліпополісахариди, вірусні частинки, пухлинні клітини.

3. Лектиновий (манозний) шлях активації системи комплементу

Лектиновий шлях є гомологічним до класичного шляху активації системи комплементу. Він використовує лектин, що зв'язує манозу, (MBL) - білок, подібний C1q класичного шляху активації, який зв'язується з манозними залишками й іншими цукрами на мембрані, що дозволяє розпізнавати різноманітні хвороботворні мікроорганізми. MBL - сироватковий білок, що належить до групи білків колектинів, який синтезується переважно в печінці та може активувати каскад комплементу, безпосередньо зв'язуючись з поверхнею патогена.

У сироватці крові MBL формує комплекс з MASP-I і MASP-II (Mannan-binding lectin Associated Serine Protease, що зв'язують MBL серинові протеази). MASP-I і MASP-II дуже схожі з C1r і C1s класичного шляху активації і, можливо, мають загального еволюційного попередника. Коли кілька активних центрів MBL зв'язуються певним чином с орієнтованими маннознимі залишками на фосфоліпідний бішарі хвороботворного мікроорганізму, MASP-I і MASP-II активуються і розщеплюють білок C4 на C4a і C4b, а білок C2 на C2a і C2b. Потім C4b і C2a об'єднуються на поверхні хвороботворного мікроорганізму, формуючи C3-конвертазу, а C4a і C2b діють як хемоаттрактанти для клітин імунної системи.

Регуляція системи комплементу

Система комплементу може бути дуже небезпечною для тканин господаря, тому її активація повинна добре регулюватися. Більшість компонентів активні тільки в складі комплексу, при цьому їх активні форми здатні існувати дуже короткий час. Якщо протягом цього часу вони не зустрінуться з наступним компонентом комплексу, то активні форми втрачають зв'язок з комплексом і стають неактивними. Якщо концентрація якогось з компонентів нижче порогової (критичної), то робота системи комплементу не призведе до фізіологічних наслідків. Система комплементу регулюється спеціальними білками, які знаходяться в плазмі крові навіть у більшій концентрації, ніж самі білки системи комплементу. Ці ж білки представлені на мембранах власних клітин організму, оберігаючи їх від атаки з боку білків системи комплементу.

Система комплементу відіграє велику роль у багатьох хворобах, пов'язаних з імунітетом.

При хворобах імунних комплексів фермент провокує запалення головним чином двома шляхами:

1. с C3b і C4b, фіксованими на імунних комплексах, зв'язуються лейкоцити, що активуються і залучені в місця відкладення цих комплексів, утворюючи тут анафілатоксин. Так починається пошкодження тканин при синдромі Гудпасчера. Для придушення запальної реакції на експериментальних моделях цього захворювання досить зменшити вміст в крові комплементу або нейтрофілів.

2. МАК (мембраноатакуючий комплекс), проникаючи в мембрану власних клітин організму, пошкоджує мембрану. При цьому відбувається вивільнення метаболітів арахідонової

кислоти - простагландинів. Цим обумовлено пошкодження тканин при мембранозному нефриті, який в експерименті вдається викликати антитілами до субепітеліальних антигенів. Запальну реакцію в цьому випадку не пригнічує усунення нейтрофілів, проте вона повністю відсутня у тварин, дефіцитних по С5.

Теоретичні питання:

1. Сутність РЗК. Необхідність використання індикаторної системи.
2. Характеристика і підготовка інгредієнтів РЗК.
3. Механізм РЗК.
4. Практичне використання РЗК, реакції бактеріолізу.
5. Комплемент і шлях його активації.

Протокол №18

Тема: ***Реакції імунітету: серологічні реакції з міткою. Полімеразна ланцюгова реакція.***

Мета: ***Вивчити механізм постанови серологічних реакцій з мітками і ПЛР для експрес-діагностики інфекційних хвороб.***

Ознайомлення з постановою серологічних реакцій з міткою:
1. Розбір схеми постанови ІФА.
2. Розбір схеми постанови ІХА.
3. Оцінка результатів реакції.
4. Розбір схеми постанови імуноблотинга.
5. Розбір схеми постанови РІА і РІФ.
6. Оцінка результатів реакції.
7. Розбір схеми постанови ПЛР.

Імунохімічні методи аналізу, основані на специфічному зв'язуванні певної сполуки відповідними антитілами, широко ввійшли в аналітичну практику і використовуються у різних областях медицини, сільського господарства, мікробіологічної і харчової промисловості, для охорони навколишнього середовища. Індикація утвореного комплексу антиген-антитіло може бути здійснена, якщо в один із вихідних компонентів реакційної системи вести мітку, яка легко детектується відповідним високочутливим фізико-хімічним методом. Вельми зручними для цієї мети виявилися ізотопні, ферментні, флуоресцентні, парамагнітні та ін. мітки, використання яких дало можливість збільшити чутливість класичних імунохімічних методів аналізу в мільйони разів, а час аналізу зменшити до кількох хвилин.

Радіоімунологічний аналіз (РІА) є найбільш інформативним, він заснований на дослідженні характеру взаємодії антитіл з утворенням імунного комплексу, в один із компонентів якого (антиген або антитіло) введена радіоактивна мітка. Найбільше поширення отримав *метод конкуренції за специфічні антитіла* міченого радіоактивним ізотопом антигена і такого ж антигена, але вільного від радіоактивної мітки, кількість якого необхідно визначити у дослідному біологічному середовищі. З цією метою в дослідну рідину, в якій передбачена наявність антигена, додають відому кількість такого ж міченого антигена і стандартну кількість антисироватки з відповідними антитілами. Коли в дослідній рідині відсутній іскомий специфічний антиген, то біля 70-80% міченого антигену зв'язується з антитілами, обумовлюючи високу радіоактивність утвореного преципітату. Коли у біологічному середовищі присутній іскомий антиген, він конкурує з міченим антигеном і зв'язує частину антитіл. У наслідку радіоактивність преципітата падає у порівнянні з контролем. На цьому принципі основано кількісне визначення антигенів або антитіл. Оскільки мічений антиген додається у визначеній дозі, то можна з'ясувати, яка його частина зв'язалася з антитілами, а яка залишилася незв'язаною в наслідку конкуренції з виявленим немміченим антигеном. При визначених концентраціях кількість міченого антигена, зв'язаного з антитілами, зворотньо пропорційна кількості досліджуваного антигена.

Імуноферментний метод заснований на обліку реакції антиген-антитіло, причому у якості мітки, що дозволяє виявити імунний комплекс, використовують ферменти, наприклад пероксидазу, лужну фосфатазу. Одним із поширених варіантів тесту ІФА є твердофазний 'Сендвич-метод': спочатку на стінках полістиролових пробірок сорбують антитіла проти визначенного антигена. В цю пробірку вносять дослідний біологічний зразок. Коли там

містяться іскомі антигени, вони взаємодіють з антитілами і разом з ними фіксуються на стінках пробірки. Після цього в пробірку вводять антитіла до даного антигена, мічені ферментом, які також приєднуються до утвореного імунного комплексу і залишаються на стінках пробірки. Для виявлення і кількісної оцінки цих комплексів в пробірку додають пероксид водню (H_2O_2) і хромогени. Фермент (пероксидаза) розщеплює H_2O_2 з виділенням кисню. Останній окислює хромоген, який набуває жовтого кольору. Інтенсивність фарбування і, відповідно, кількість іскомого антигена оцінюють фотометрично.

Етапи проведення ІФА:

1. Інокуляція біоматеріала і реактивів в лунки полістиролових планшетів мікротест системи (на яких сорбовані Ат проти визначенного Аг і фермент).

2. Термостатування і встряхування на шейкері для равномірного перемішування реакційної суміші у лунках планшета.

3. Промивання лунок планшета на вошері (автоматичний промивник планшетів) – для відмивки незв'язавшихся субстанцій (Ат, кон'югата та ін.).

4. Додавання фарбованного субстрата (хромогена).

5. Реєстрування результатів на ридері (спектрофотометрі, фотоколориметрі для визначення оптичної щільності дослідженного розчина у лунках планшету).

Реакція імунофлюоресценції (РІФ) – люмінисценція в ультрафіолетовому світлі мікроскопа біологічного об'єкта, що містить випромінюваємий антиген після його попередньої обробки специфічними антитілами, міченими флюорохромом.

Суть метода заключається в тому, що локалізація антигена у препараті виявляється за специфічною флюоресценцією у місті реакції антиген-антитіло. Метод заснований на використанні явищ люмінисценції для виявлення реакції антиген-антитіло, відбувається на

поверхні клітин або на зрізах тканини. При цьому антитіла, зв'язані з фарбою, наприклад флюоресцеїнізотіоцианатом. Велика перевага метода заключається в його простоті, високій чутливості, а також у швидкості одержування результатів. Метод був запропанован у 1942 р. Кунсом. Специфічний білок мітять флюорохромами – це такі фарби, які здатні поглинати світло і випромінювати його через короткий проміжок часу (10^{-6} - 10^{-9} сек.) Інтенсивність флюоресценції пропорціональна інтенсивності випромінювання, і при малих концентраціях речовини можливо кількісно визначити флюоресцируючі речовини на мікроскопічному або цитологічному препараті.

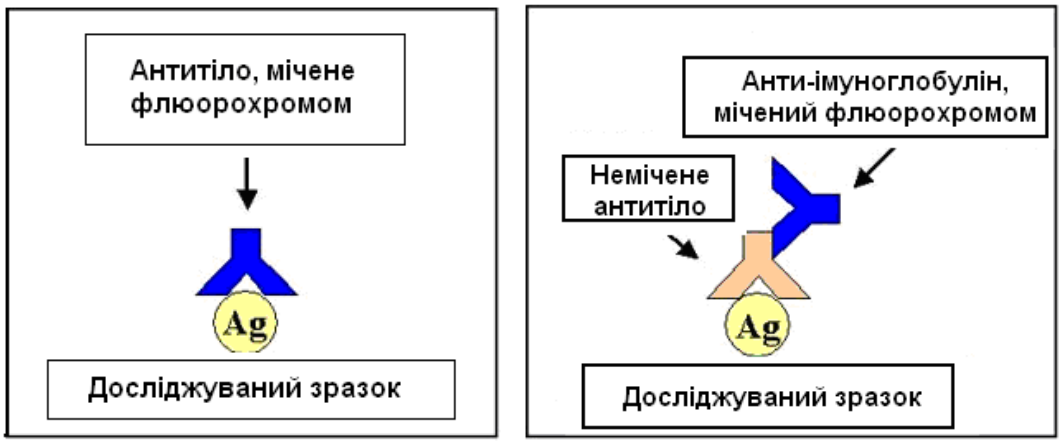
Механізм реакції: відбувається кон'югація білка з флюорохромом, яка є за своєю суттю хімічною реакцією, у результаті чього утворюється нова сполука, у якій фарба приєднується до білка ковалентним зв'язком. У реакції беруть участь в основному аміногрупи лізина і кінцеві аміногрупи білкової молекули.

Метод застосовується в трьох основних модифікаціях:

1. При прямому методі (Кунса і Каплана) на препарат, що має іскомий антиген, наносять специфічну люмінисцентну сироватку (антитіло). Після реакції препарат промивають і вивчають в люмінисцентному мікроскопі. Таким чином, реакція відбувається одноетапно.

2. При непрямому варіанті РІФ (Уеллера і Кунса) розчин немічених антитіл наносять на зріз (тканина різних органів тварин, що містить відомі антигени), а потім виявляють їх за допомогою мічених флюорохромом антиімуноглобулінових антитіл.

3. Непрямий метод з комплементом (Гольдвасер, Шепард). Цей варіант методу розроблений для визначення комплемент-зв'язуючих антитіл. Після обробки зріза антитілами на нього наносять в якості джерела комплемента свіжу сироватку. Комплемент зв'язується в участках, де фіксовані антитіла. В результаті ефекта підсилення при активації комплемента за класичним шляхом одна молекула антитіл може викликати зв'язування багатьох С3-молекул на зрізі; іх виявляють, обробляючи зріз флюоресцентно міченими антитілами анти-С3. Препарати вивчають у люмінисцентному мікроскопі (ЛЮМАМ).



Пряма РІФ **Непряма РІФ**

Імунохроматографічний аналіз (ІХА) – метод одноетапного швидкого якісного визначення наявності антитіл до збудників захворювань in vitro у біологічних матеріалах (сеча, кров, сироватка або плазма крові, слюна, кал та ін.). Даний вид аналізу здійснюється за допомогою індикаторних смужок, паличек, панелей або тест-касет, які забезпечують швидке проведення тестування. ІХА-метод має назви методу сухої імунохімії, стрип-тест, експрес-тест або експрес-аналіз. Ці назви пов'язані зі швидким проведенням цього методу аналіза. Принцип дії ІХА за допомогою **смужок** складається в тому, що при занурюванні теста у фізіологічну рідину вона починає мігрувати уздовж полоски за принципом тонкошарової хроматографії.

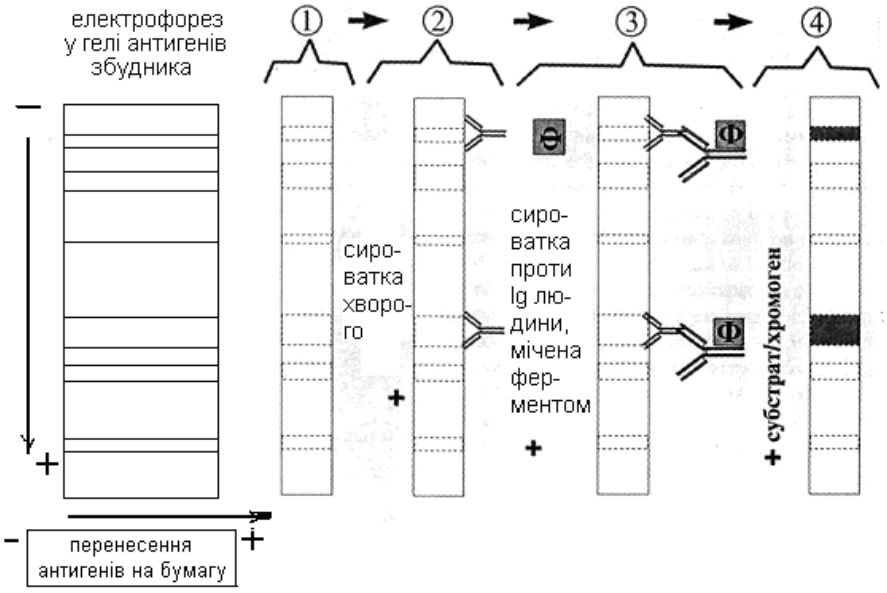
Рухливою фазою у даному випадку є фізіологічна речовина. Разом з речовиною рухаються і антитіла з фарбою. Коли в цій рідені присутній досліджуваний антиген (гормон, інфекційний або онкологічний маркер), то відбувається його зв'язування, як з першим, так і з другим типом антитіл, що виявляється вже імунологічним методом аналіза. При цьому відбувається накопичення антитіл з фарбуванням навколо антитіл, імобілізованих в тест-зоні ІХА-смужки, що виявляється у вигляді яскравої темної смужки. Незв'язані антитіла з фарбою мігрують далі уздовж смужки і взаємодіють з подвійними антитілами в контрольній зоні, де і спостерігається друга темна смуга. Взаємодія (і темна смуга) в контрольній зоні мають виявлятися завжди (коли аналіз проведений вірно), незалежно від присутності досліджуваного антигена в фізіологічній рідині. Результати визначаються візуально або при комп'ютерній обробці відсканованого зображення.

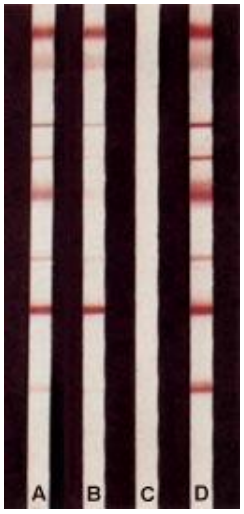
Імуноблотинг (Вестерн-блотинг), за допомогою якого проводиться ідентифікація досліджуваних антитіл після електрофоретичного їх розділення і наступного тестування за допомогою міченних антивидових антитіл:

1. Імуноблотинг з РІА (блотинг- від англ. blot – пляма). Антигени збудника (досліджувані антигени) спочатку розділяють за допомогою електрофорезу у поліакріламідному гелі. Отримані фракції переносять електрофоретичним чином на нітроцелюлозну мембрану, яку розташовують у спеціальній камері. Потім ці блоти обробляють спеціальними Ат до специфічного Аг, відмивають і додають радіоактивно мічений кон'югат для визначення зв'язавшихся з Аг Ат. Блоти поміщають у касету з рентгенівською плівкою і на проявленій плівці при позитивній реакції видні полоси локалізації Аг, зв'язаного міченими Ат.

2. Імуноблотинг з ІФА. Фірми пропонують комерційні полоски з 'блотами' антигенів. На ці полоски наносять сироватку хворого. Потім після інкубації, відмивають від незв'язавшихся Ат хворого і наносять сироватку проти імуноглобулінів людини, мічену ферментом. Утворений на смужці комплекс (антиген+антитіло хворого + антитіло проти Ig людини) виявляють доданням хромогенного субстрата, змінюючого колір під дією фермента.

При наявності у досліджуваній сироватці крові специфічних антитіл до індивідуальних білків збудника утворюється видимий преципітат. Позитивні реакції виглядають у виді ІФА-плям, кожна з яких відповідає дискретній парі антиген-антитіло. Єдина пляма дозволяє засумніватися у справжності результатів.





Облік результатів реакції імуноблотинга:

- Смужка А – Позитивний контроль
- Смужка В – Слабопозитивний контроль
- Смужка С – Негативний контроль
- Смужка D – Позитивний зразок

(виявлена присутність антитіл до ВІЛ-1)

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це ампліфікація специфічних послідовностей нуклеїнових кислот, за допомогою яких протягом кількох годин можна розмножувати потрібну послідовність у мільйони разів. ПЛР дозволяє здійснювати таку ампліфікацію у пробірці за допомогою фермента термостабільної ДНК-поліміразі із 4-дезоксирібонуклеозидтрифосфатів, що є структурними елементами будь-якої ДНК, і коротких олігонуклеотидних 20-30-членних затравок (праймерів), комплементарних 3-кінцевим послідовностям антипаралельних ДНК генів.

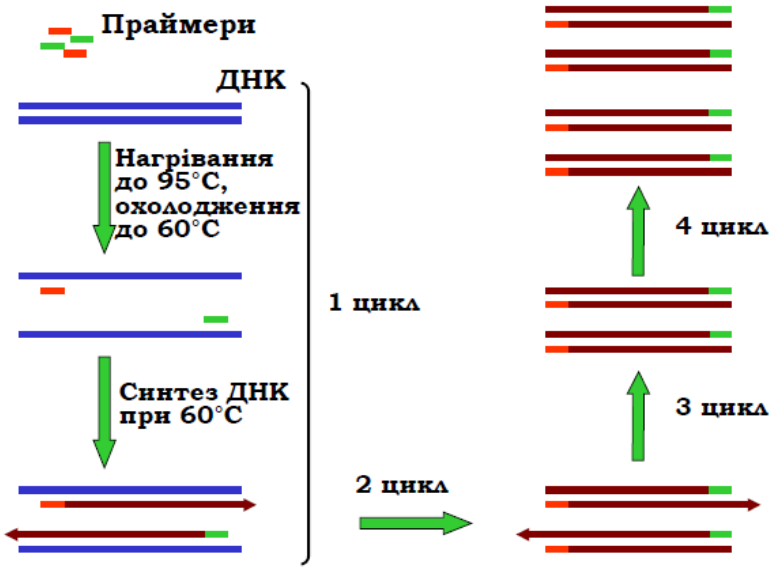
Стадії метода ПЛР:

1. Виділення ДНК збудника із біологічного матеріалу.
2. Ампліфікація ДНК (багаторазове копіювання специфічного фрагменту ДНК) – проходить у термоциклерах ‘Терцик-Україна’ – спеціальний прилад з певним температурним режимом для проведення циклів ПЛР, кожний із яких складається із 3-х етапів:

1. **Денатурація** – нагрівання реакційної суміші до 93-95 ºС, унаслідок чього дволанцюгові молекули ДНК розділюються з утворенням двох одноланцюгових молекул.

2. **Віджиг (приєднання)** – при наявності іскомої ДНК-мішені праймери віджигаються (приєднуються) до ДНК- мішені при температурі 60 ºС.

3. **Синтез (Елонгація)** – доводять температуру в реакційній суміші до оптимума роботи фермента (72 ºС). Синтез другого ланцюга продовжується з максимальною ефективністю. У подальшому етапи денатурації, віджига і елонгації многоразово повторюються до 30 і більше разів. На кожному температурному циклі кількість синтезованих копій фрагмента ДНК подвоюється.



Таким чином, даний метод заснований на здатності ДНК-полімерази добудовувати одноланцюгову ДНК з утворенням дволанцюгової молекули.

Теоретичні питання:

1. Визначення поняття ‘серологічні реакції з міткою’.
2. Реакція імунофлюоресценції. Механізм, компоненти, застосування.
3. Імуноферментний аналіз, імуноблотинг. Механізм, компоненти, застосування.
4. Механізм проведення радіоімунного аналізу.
5. Імунохроматографічний аналіз. Принципи проведення.
6. Механізм поліміразної ланцюгової реакції. Етапи проведення. Облік.

Протокол №19

Тема: ***Імунні сироватки. Антитоксини і реакція нейтралізації. Одержання та титрування антитоксичних сироваток.***

Мета: ***Вивчення імунобіологічних препаратів, які використовують з лікувальною, профілактичною і діагностичною метою. Освоєння методики постанови реакції флокуляції для титрування антитоксичних сироваток.***

ІМУННІ СИРОВАТКИ

Імунні сироватки – це імунобіологічні препарати, виготовлені із сироватки крові людини чи тварин, що застосовуються для лікування, профілактики і діагностики інфекційних захворювань. Імунобіологічну основу імунних сироваток становлять антитіла, що належать до гама-глобулінів (імуноглобулінів – IgG, IgM, IgA, IgE і IgD). У захисті людини від патогенних мікроорганізмів найбільш важлива роль належить імуноглобулінам G, M і A.

Лікувально-профілактичні сироватки – _____

_____

Діагностичні сироватки – _____

_____

РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ ЕКЗОТОКСИНУ АНТИТОКСИНОМ

Реакція заснована на здатності антитоксичної сироватки нейтралізувати дію екзотоксину. Вона застосовується для титрування антитоксичних сироваток і визначення екзотоксину. При титруванні сироваток до різних розведень антитоксичної сироватки додається певна доза відповідного токсину. При повній нейтралізації антигену і відсутності невитрачених антитіл настає ініціальна флокуляція.

Реакцію флокуляції можна застосовувати не тільки для титрування сироватки (наприклад, дифтерійної), але і для титрування токсину й анатоксину. Наприклад, якщо необхідно визначити кількість імуногенних одиниць (ІО) у 1 мл анатоксину (1 ІО анатоксину – це та його кількість, що у суміші з 1 АО сироватки зумовлює ініціальну флокуляцію), роблять таким чином. У ряд пробірок розливають по 2 мл анатоксину й у кожну пробірку додають у зростаючих кількостях антитоксичну сироватку відомої сили. Пробірки витримують при 45^{o}C і відзначають ту пробірку, у якій раніше, ніж в інших відбулася флокуляція.

СХЕМА ТИТРАЦІЇ АНАТОКСИНУ (ВИЗНАЧЕННЯ ІО В 1 МЛ)

Інгредієнти	Номери пробірок					
	1-а	2-а	3-а	4-а	5-а	6-а
Анатоксин	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Антитоксична сироватка	0,1мл	0,2мл	0,3 мл	0,4 мл	0,5 мл	0,6 мл
Результат (флокуляція):	-	-	-	+	-	-

Висновок:_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Знаючи кількість антитоксичних одиниць сироватки в даній пробірці, легко розрахувати кількість імуногенних одиниць анатоксину.

Приклад розрахунку. Якщо ініціальна флокуляція наступила в пробірці, куди внесено 0,4 мл антитоксичної сироватки, що містить 800 АО в 1 мл, то виходячи з отриманого результату, у 0,4 мл антисироватки міститься 320 АО. Пам'ятаючи про те, що 1 АО відповідає 1 ІО, можна сказати, що в 4-й пробірці в 2 мл анатоксину міститься 320 ІО, а в 1 мл анатоксину – 160 ІО.

Реакція нейтралізації токсину антитоксином має велике практичне значення як метод визначення активності антитоксичних лікувальних сироваток. Антигеном у цій реакції є істинний екзотоксин.

Сила антитоксичної сироватки визначається умовними (імуногенними) одиницями ІО. При титрації антитоксичної сироватки необхідно знати кількість DLM, що міститься в 1 мл токсину і кількість DLM, що нейтралізує 1 АО антитоксичної сироватки. Методика титрації антитоксичної сироватки аналогічна титрації анатоксину.

Припустимо, що треба протитрувати антитоксичну дифтерійну сироватку. У 1 мл токсину міститься 5000 DLM. Діють за схемою, представленою в таблиці.

1. Облік реакції флокуляції і розрахунок титру сироватки в поставленому досліді.

СХЕМА ТИТРАЦІЇ АНТИТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ
(визначення кількості АО в 1 мл сироватки)

Інгредієнти	Пробірки					
	1-а	2-а	3-а	4-а	5-а	6-а
Токсин	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
Антитоксична сироватка	0,1 мл	0,2 мл	0,3 мл	0,4 мл	0,5 мл	0,6 мл
Результат (флокуляція):	-	+	-	-	-	-

Ініціальна флокуляція наступила в другій пробірці, куди було додано 0,2 мл сироватки, що титрується. Виходячи з цього визначаємо, що 10000 DLM дифтерійного токсину нейтралізовані 0,2 мл дифтерійної сироватки. З цього витікає, що 1 мл досліджуваної сироватки може нейтралізувати токсину в п'ять разів більше – 50000 DLM токсину. Знаючи, що 100 DLM дифтерійного токсину нейтралізується 1 АО дифтерійної сироватки (це стандарт), можемо визначити кількість АО в 1 мл досліджуваної дифтерійної сироватки:

1 АО нейтралізує 100 DLM токсину.
Х АО нейтралізує 50000 DLM токсину
Х = 500 АО.

Моноклональні антитіла

З початку 70-х років молодий німецький імунолог Георг Келер і Цезар Мільштейн розробили спосіб отримування гібридів нормальної антитілоутворюючої клітини (АУК) і пухлинної клітини. Такий гібрид (гібридома) успадкував від нормальної клітини здатність до синтезу антитіл, а від пухлинної – безсмертя і здатність до необмеженного і безконтрольного росту. Для досягнення цієї мети використовували відбір клітин в селективному середовищі. Спочатку був одержаний особливий мутант мишачої плазмоцитоми, ріст якого можна було контролювати складом живильного середовища. Для одержання мутанта використовували особливості синтезу нуклеїнових кислот (ДНК і РНК). Відомо, що існують два шляхи синтезу попередників нуклеїнових кислот: основний і резервний. Основний – це шлях утворення нуклеотидних кілець, що входять до складу нуклеїнових кислот. Цей шлях має декілька етапів і блокується протипухлинним препаратом аміноптерином (А). Проте клітини не гинуть від цього препарату, які володіють резервним шляхом – здатністю синтезувати нуклеотиди і нуклеїнові кислоти, шляхом реутилізації продуктів розпаду раніше синтезованих нуклеїнових кислот: гіпоксантина (Г) і тимідина (Т). Додавання Г і Т в живильне середовище, що містить А, знімає токсичний ефект останнього.

Для селекції гібридом треба було отримати мутант плазмоцитоми, не здатний використовуватися резервний шлях і, отже, який гине у середовищі, що містить Г, Т і А (ГАТ-середовище). Такий мутант отримали шляхом додавання в середовище токсичних аналогів Г і Т. Усі клітини, здатні засвоювати Г і Т, поглинали їх токсичні аналоги і гинули. Виживали лише ті мутанти, які були нездатні засвоювати Г і Т, тобто були лишені резервного шляху. Із потомства цих клітин додатково відбирали ще і такі мутанти, які загубили здатність до синтезу власних імуноглобулінів. Тепер усе було готово для отримання гібридом, тобто гібридів нормальних АУК і плазмоцитомних клітин. Мишей інтенсивно імунізували досліджуваним матеріалом – білком, бактеріальною клітиною або клітиною тваринного походження. Коли у їх крові з’являлись антитіла, у них брали селезінку і лімфатичні вузли (міста скупчення АУК), і з них готували суміш клітин. До неї додавали у надлишку клітини мутантної плазмоцитоми і поліетиленгліколь (ПЕГ). Після короткої інкубації, потрібної для злиття клітин, їх відмивали від ПЕГ і поміщали у середовище, що містить Г, Т і А (ГАТ-середовище). Тепер у системі були гібриди АУК і АУК, АУК і плазмоцитоми, а також залишились вільними АУК і клітини плазмоцитоми. Із них треба було відібрати тільки гібриди АУК і плазмоцитоми. Після недовгого (декілька днів) культивування поодинокі АУК, а також гібриди АУК і АУК гинули, тому що нормальні клітини швидко гибнуть. Плазмоцитомні клітини і їх гібриди також гинули, так як А блокував основний шлях синтезу попередників нуклеїнових кислот, а Г і Т їх не рятували. Виживали, отже, тільки гібриди АУК і плазматичних клітин, так як безсмертність вони успадкували від плазмоцитоми, а резервний шлях – від нормальної клітини. Такі гібриди, гібридоми, зберігали здатність синтезувати і секретувати антитіла.

Схема отримання гібридом (пояснення у тексті):

А, В, С – багатокомпонентна суміш антигенів, використовувана для імунізації; АУК – антитілоутворюючі клітини селезінки; Пл – клітини плазмоцитоми, що не ростуть у селективному ГАТ-середовищі; ПЕГ – поліетиленгліколь; ГАТ – середовище, що містить гіпоксантин, аміноптерин, тімідин; анти-А, анти-В, анти-С – моноклональні антитіла відповідно до А-, В-, С-антигенів

Наступний етап після отримання гібридом – клонування і відбір потрібних клонів. Клітини, що вижили у ГАТ, засівають у спеціальні пластикові планшети, що містять звичайно 96 лунок ємкістю приблизно по 0,2 $см^3$. В кожну лунку поміщають у середньому по 10 гібридомних клітин, які культивували у присутності ‘годувальних’ клітин, що не мають відношення до гібридом, але здатні їх вирощувати. Після декількох днів культивування вміст кожної лунки провіряють на присутність антитіл потрібної специфічності. Для цього використовують мікрометоди виявлення антитіл до відповідного антигена. Клітини із лунок, що містять потрібні антитіла, клонують, тобто подруге розсівають у ті ж лункі, але із розрахунку 1 клітина на лунку, знову культивують і провіряють на присутність потрібних антитіл. Процедуру повторюють 1-2 рази. Таким чином, відбирають клони, що продукують антитіла тільки одної потрібної специфічності, тобто моноклональні антитіла. Отримані клони можна заморозити при –70 ºС і зберігати до того, доки вони стануть непотрібними. Іх можна культивувати і накопичувати антитіла у культуральному середовищі, а можна привити мишам (так як гібридоми - це пухлинні клітини), де вони будуть рости і накопичувати величезну кількість моноклональних антитіл. Від однієї миші можна отримати антитіл не менш, ніж від кролика. Ці антитіла не містять сторонніх антитіл і настільки однорідні фізико-хімічно, що можуть розглядатися як чисті хімічні реактиви.

Моноклональні антитіла із-за високої специфічності, стандартності і технологічності

отримання успішно витискають і замінюють імунні сироватки. Гібридоми зграли і продовжують грати величезну роль у фундаментальній і прикладній імунології. Вони створені на основі клонально-селекційної теорії імунітета і з'явилися самим яскравим і остаточним доказом цієї теорії. Завдяки гібридомам з'явилися нові методи діагностики багатьох захворювань і відкрилися нові шляхи для вивчення злоякісних пухлин. І хоча гібридоми скоріше відносяться до геніальних винаходжень, а ні до відкриття, вони були відмічені у 1984 році Нобілевською премією, вищою науковою нагородою, яку присуджують за видатні відкриття.

Теоретичні питання:

1. Класифікація імунних сировоток.
2. Лікуальні і профілактичні сироватки і їх застосування.
3. Діагностичні сироватки і їх застосування у серологічних реакціях.
4. Отримання імунних сироваток від тварин і людей.
5. Отримання гамаглобулінів.
6. Антитоксини. Механізм їіх дії.
7. Титрування антитоксічних сироваток.
8. Класифікація реакції гіперчутливості.
9. Ускладнення, які можуть виникати при введені імунних сироваток. Механізм їх виникнення.
10. Отримання моноклональних антитіл.

Протокол №19

Тема: ***Вакцини. Вчення про фагоцитоз.***

Мета: ***Вивчення імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики. Вивчення ролі клітиних факторів захисту організму від інфекційнних агентів.***

Вакцини – _____

_____

_____

Тип вакцини	Бактеріальні	Вірусні	Рикетсіозні
Живі	Для профілактики туберкульозу (БЦЖ), сибірської виразки, чуми, туляремії	Для профілактики грипу, поліомієліту, кору, епідемічного паротиту, сказу, краснухи, поліомієліту (вакцина Себіна)	Для профілактики висипного тифу
Інактивовані	Для профілактики кашлюку і черевного тифу	Для профілактики поліомієліту (вакцина Солка), гепатиту А, грипу, сказу, кліщового енцефаліту	-
Хімічні	Для профілактики холери, черевного тифу і кашлюку	-	Для профілактики висипного тифу
Анатоксини	Для профілактики правця, дифтерії, стафілококової інфекції і холери	-	-
Субкомпонентні	-	Тривалентна вакцина для профілактики грипу	-
Генноінженерні	-	Для профілактики гепатиту А: Комбітекс ЛТД; Енджерикс-В; H-B-Vax II	-
Синтетичні	В даний час не знайшли практичного застосування		
Антиідиотипічні	-	Для профілактики ВІЛ-інфекції (у стадії розробки)	-
ДНК-вакцини	-	Для профілактики гепатиту В	-

Розрізняють вакцини з живих ослаблених мікроорганізмів, з інактивованих

мікроорганізмів, хімічні, анатоксини, субкомпонентні, генно-інженерні, синтетичні, антиідиотипічні і ДНК-вакцини. Після застосування вакцин в організмі людини утворюється штучний активний імунітет.

Живі вакцини використовують для специфічної профілактики бактеріальних, рикетсіозних і вірусних інфекцій. Живі вакцини повинні бути представлені штамами зі стійко зниженою вірулентністю, але такими, що зберегли імуногенні властивості. Вірулентність є генетично детермінованою ознакою. Тому для зниження вірулентних властивостей штаму мікроорганізму, відібраного для створення живої вакцини, необхідно впливати на його генотип. Цей процес одержав назву атенуація. Для одержання атенуйованих штамів застосовують фізичний, хімічний, біологічний методи.

До недоліків вакцин, виготовлених з живих ослаблених мікроорганізмів, варто віднести:

1. Імовірність реверсії вірулентних властивостей вакцинного штаму за рахунок зворотних мутацій.

2. Серед мікробної популяції можуть зустрітися мікроорганізми, що не втратили своєї вірулентності.

3. Складності стандартизації кількості мікробних клітин в одиниці об'єму (деякі мікроорганізми, які зберегли життєздатність, продовжують ділитися).

4. Обмеження показань і розширення протипоказань стосовно їх застосування при використанні комплексної вакцинації (живі вакцини, як правило, з іншими вакцинами не комбінують і ін.).

Хімічні вакцини – імунобіологічні препарати, що виготовлені з протективних антигенів мікробної клітини після її попереднього руйнування (дезінтеграції). Протективні антигени мікробної клітини можуть являти собою нуклеїнові кислоти (див. ДНК або РНК-вакцини), рибосоми, білки і (або) ліпополісахариди, а також “обривки” мікробної клітини (див. субкомпонентні вакцини). До засобів одержання хімічних вакцин слід віднести фізико-хімічні методи, які засновані на обробці суспензії мікроорганізмів ультразвуком (так зване “озвучування”), або хімічні методи, які засновані на екстрагуванні з мікробної клітини протективних антигенів (наприклад, за допомогою органічних розчинників і ін.).

Субкомпонентні вакцини готують із субкомпонентів вірусів, що мають імуногенні властивості. У більш широкому розумінні ці вакцини є різновидом хімічних вакцин.

Генно-інженерні вакцини отримують з використанням методів генної інженерії.

Синтетичні (штучні) вакцини готують із синтетичних (штучних) антигенів. Конструювання штучних антигенів базується на знанні хімічної будови поліпептидів вірусів, бактерій і їх токсинів, патогенних найпростіших і ін. Перспективність розробки і застосування цих вакцин обумовлена можливістю використання антигенних детермінантів (активного центру повноцінного антигену) або гаптену (неповноцінного антигену), кон’югованих з ад’ювантами чи імунопотенціаторами іншого роду.

Антиідиотипічні вакцини виготовляють шляхом імунізації тварин ідиотипічними імуноглобулінами з наступним використанням антиідиотипічних антигенів як вакцини. Планується застосування таких вакцин для профілактики СНІДу.

ДНК-вакцини готують шляхом убудовування генів, що визначають синтез імуногенних антигенів, у вектори (плазміди, вірус вісповакцини чи аденовіруси).

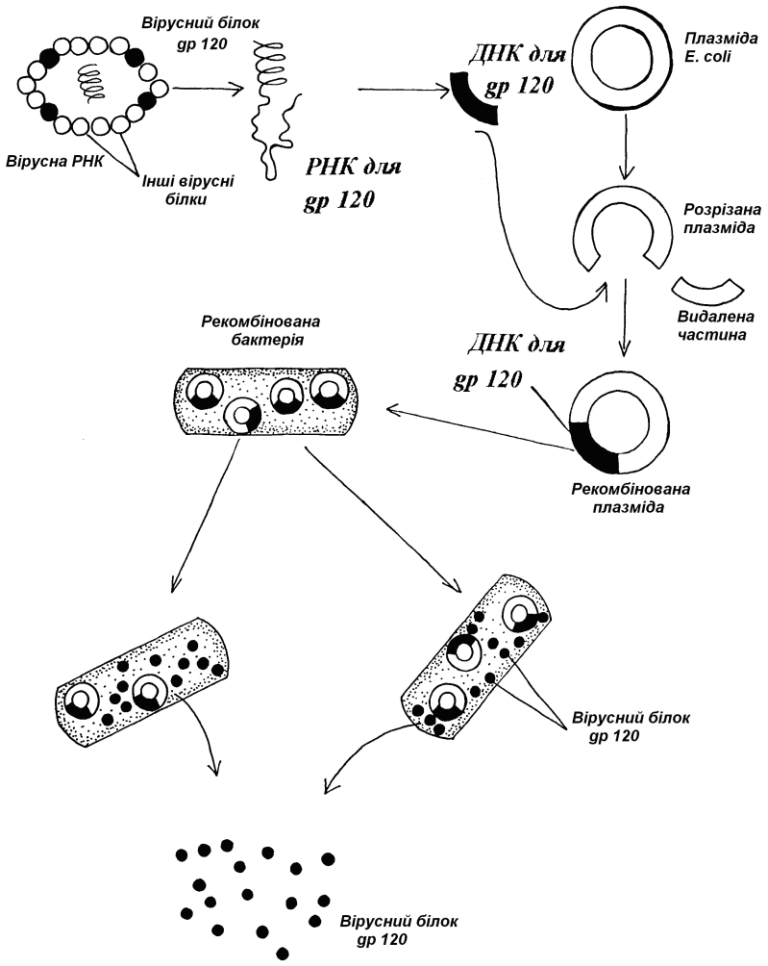
Вакцини розрізняють за кількістю включених в імунопрепарат протективних антигенів так: моновакцини приготовлені з одного виду збудника, дивакцини – містять два антигени різних видів мікробів і т.д. Вакцини, до складу яких входять антигени проти декількох інфекцій, називаються полівакцинами.

Існують асоційовані вакцини, що готують з антигенів різних видів мікроорганізмів і анатоксинів (адсорбована кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина).

Існують аутовакцини – вакцини, виготовлені з мікробів, які виділені від хворого і такі, що вводяться йому ж з лікувальною метою. Найчастіше аутовакцини застосовують для лікування хронічних інфекцій.

Для кожної вакцини існує певний регламент її застосування.

Дози антигену, умови і правила збереження вакцин зазначені в спеціальних інструкціях, доданих до всіх біопрепаратів.



Принцип отримання субодиничних вакцин проти ВІЛ (AIDSVAX, HGP-30)

Фагоцитоз – процес, при якому клітини (найпростіші, або спеціально призначені для цього клітини крові й тканин організму - фагоцити) захоплюють і перетравлюють тверді частинки.

Фагоцитоз, поряд з піноцитозом, є одним з видів ендоцитозу. У деяких клітин він використовується для отримання корисних речовин, і для одноклітинних організмів є гомологічним харчуванню. У багатоклітинних організмів цей процес взяв на себе функцію видалення відходів і патогенів.

Фагоцитоз здійснюється двома різновидами клітин: циркулюючими в крові зернистими лейкоцитами (гранулоцитами) і тканинними макрофагами.

У людини розрізняють два типи професійних фагоцитів:

• нейтрофіли
• моноцити

Основні етапи фагоцитаерної реакції подібні для клітин обох типів. Реакція фагоцитозу можуть бути розділені на декілька етапів:

1. Хемотаксис. В реакції фагоцитозу важливіша роль належить позитивному хемотаксису. Як хемоатрактанти виступають продукти, що виділяються мікроорганізмами і активованими клітинами у вогнищі запалення (цитокіни, лейкотриєн, гістамін), а також продукти розщеплення компонентів комплементу (С3а, С5а), протеолітичні фрагменти факторів згортання крові та фібринолізу (тромбін, фібрин), нейропептиди, фрагменти імуноглобулінів та т.п. Однак, «професійними» хемотаксинами служать цитокіни групи хемокинів.

Раніше інших клітин у вогнище запалення мігрують нейтрофіли, значно пізніше надходять макрофаги. Швидкість хемотаксического переміщення для нейтрофілів і макрофагів однакова, відмінності в часі надходження, ймовірно, пов'язані з різною швидкістю їх активації.

2. Адгезія фагоцитів до об'єкта. Обумовлена наявністю на поверхні фагоцитів рецепторів для молекул, представлених на поверхні об'єкта (власних або зв'язаних з ним). При фагоцитозі бактерій або старих клітин організму господаря відбувається розпізнавання кінцевих цукрових груп - глюкози, галактози, фрукози, манози і т.п., що представлені на поверхні клітини, яка фагоцитується. Розпізнавання здійснюється лектиноподібними рецепторами відповідної специфічності, в першу чергу манозозв’язуючим білком на поверхні фагоцитів.

У тих випадках, коли об'єктами фагоцитозу є не живі клітини, а шматочки вугілля, скла, металу та т.п., фагоцити попередньо роблять об'єкт поглинання прийнятним для здійснення реакції, огортаючи його власними продуктами, в тому числі компонентами міжклітинного матриксу, який вони продукують.

Хоча фагоцити здатні поглинати і різного роду «непідготовлені» об'єкти, найбільшої інтенсивності фагоцитарний процес досягає при опсонізації, тобто фіксації на поверхні об'єктів опсонінів до яких у фагоцитів є специфічні рецептори - до Fc-фрагменту антитіл, компонентів системи комплементу, фібронектину і т.п.

3. Активація мембрани. На цій стадії здійснюється підготовка об'єкта до занурення. Відбувається активація протеїнкінази С, вихід іонів кальцію з внутрішньоклітинних депо. Велике значення відіграють переходи золь-гель в системі клітинних колоїдів і актино-міозинові перебудови.

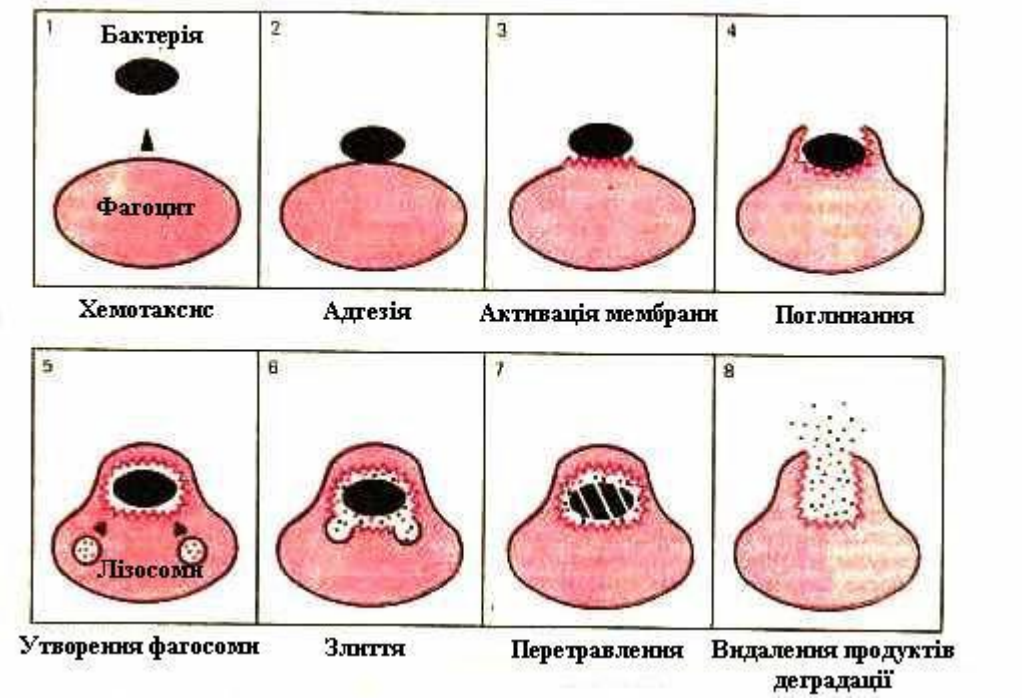
4. Занурення. Відбувається обволікання об'єкта.

5. Утворення фагосоми. Замикання мембрани, занурення об'єкта до частини мембрани фагоцита всередині клітини.

6. Утворення фаголізосоми. Злиття фагосоми з лізосомами, в результаті чого утворюються оптимальні умови для бактеріолізу та розщеплення вбитої клітини. Механізми зближення фагосоми й лізосом нез’ясовані; ймовірно, відбувається активне переміщення лізосом до фагосом.

7. Кіллінг і розщеплення. Основні речовини, які беруть участь у бактеріолізі: пероксид водню, продукти азотного метаболізму, лізоцим та т.п. Процес руйнування бактеріальних клітин завершується завдяки активності протеаз, нуклеаз, ліпаз та інших ферментів, активність яких оптимальна при низьких значеннях pH.

8. Викид продуктів деградації.



Фагоцитоз може бути:

• завершеним (кіллінг і перетравлення пройшло успішно);

• незавершеним (для ряду патогенів фагоцитоз є необхідним ступенем їх життєвого циклу, наприклад, у мікобактерій і гонококів).

Теоретичні питання:

1. Поняття про активний штучний набутий імунітет.
2. Вакцинопрофілактика інфекційних захворювань.
3. Види вакцин. Вимоги до вакцин і шляхи їх ведення.
4. Вакцинотерапія інфекційних захворювань.
5. Поняття про фагоцитоз.
6. Види фагоцитарних клітин.
7. Стадії фагоцитозу. Завершений і незавершений фагоцитоз.
8. Зв’язок клітинного і гуморального імунітету.
9. Використання фагоцитозу для лабораторної діагностики.

Протокол №20

Тема: ***Основи вчення про антибіотики та хіміотерапевтичні препарати.***

Мета: ***Оволодіти практичними навичками по визначенню чутливості бактеріалної культури до антибіотиків і до складу антибіотикограми.***

Антибіотики – _____
_____
_____
_____

Антибіотики класифікуються за походженням, хімічним складом, механізмами інгібуючої дії на мікробні клітини, антимікробним спектром. За своїм походженням антибіотики розподіляються на три групи.

1. Антибіотики природного (тваринного чи рослинного) походження.
2. Антибіотики синтетичні.
3. Антибіотики напівсинтетичні.

До антибіотиків **тваринного** походження належать лізоцим, еритрин, екмолін, інтерферон і ін. Антибіотики **рослинного** походження розподіляються на такі, що:

а) утворюються вищими і нижчими рослинами – *фітонциди*. До них належать новоіманін, бінан, сальвін, хлорофілипт, евкаван і ін;

б) синтезуються *актиноміцетами* (стрептоміцином, хлорамфеніколом, біоміцином, тераміцином, еритроміцином, альбоміцином і ін.);

в) синтезуються *плісневими грибами* (пеніцилін і пеніциліноподібні препарати: бензилпеніцилін, феноксиметилпеніцилін, метицилін і ін., тетрацикліни, неоміцин, тобраміцин і ін.);

г) утворюються *бактеріями* (граміцидин, поліміксин, продигіозин, піоцианін, тиротрицин).

До **синтетичних** антибіотиків належать синтоміцин, левоміцетин, саназин. Ці антибіотики отримують шляхом хімічного синтезу, що базується на точному знанні хімічної будови потенційних антибіотичних препаратів.

До **напівсинтетичних** антибіотиків можна віднести, наприклад, карбеніцилін. Отримання цих антибіотиків завжди здійснюється в два етапи, синтетичний і природний. Перший варіант одержання напівсинтетичних антибіотиків починається з природного етапу, що в цілому аналогічно отриманню антибіотиків із природних джерел. Другий – синтетичний, що полягає в додаванні до отриманого природним шляхом антибіотичногоу препарату речовин, які вступають у хімічну реакцію з цим препаратом. Новий антибіотик, що утворився таким чином, має більш високі антибіотичні властивості і більш слабкі токсично-алергійні властивості.

За хімічним складом найбільш розповсюджені антибіотики відносять до таких груп:

1. Азотовмісні гетероциклічні сполуки, що мають у своєму складі беталактамне кільце (пеніциліни, цефалоспорини).
2. Ароматичні сполуки, похідні діоксіамінофенілпропану (левоміцетин).
3. Ті, що містять чотири конденсованих шестизначних цикли (тетрацикліни).
4. Аміноглікозиди, до складу яких входять аміноцукри (мономіцин, стрептоміцин, канаміцин, гентаміцин і ін.).
5. Макроліди, що містять макроциклічне лактонне кільце (еритроміцин, ріфампіцини,

олеандоміцини).

6. Хінолони (фторхінолони: офлоксацин, ципрофлоксацин та ін.).

7. Ациклічні сполуки з декількома сполученими подвійними зв'язками (ністатин, леворин і ін.).

За спектром дії антибіотики розподіляють на:

1. Антибактеріальні, що впливають на розвиток бактерій. Ці антибіотики представляють найбільш поширену групу різних за хімічним складом препаратів. Для лікування інфекцій, викликаних бактеріями, найчастіше використовують антибіотики широкого спектра дії (тетрацикліни, левоміцетин, стрептоміцин, гентаміцин, канаміцин, напівсинтетичні пеніциліни, цефалоспорини й ін. препарати).

2. Протигрибкові антибіотики (ністатин, леворин, амфотерицин В, грізеофульвін, флуконазол, кетоконазол, трихоміцин, мікосептин, амфоглекамін та ін.), які впливають на ріст мікроскопічних грибів, тому що порушують цілісність цитоплазматичних мембран цих клітин.

3. Протипухлинні антибіотики (актиноміцини, мітозани, олівоміцин, мітраміцин, рубоміцин, адріаміцин, карміноміцин, брунеоміцин, блеоміцин) пригнічують синтез нуклеїнових кислот у тваринних клітинах і використовуються для лікування різних форм злоякісних новоутворень.

Біологічну активність антибіотиків вимірюють у міжнародних одиницях дії **(ОД).** За одиницю активності антибіотика приймають найменшу кількість препарату, що чинить антимікробну дію на чутливий до нього тест – мікроби (наприклад, для пеніциліну – золотистий стафілокок, стрептоміцину – кишкова паличка і т.д.). У даний час одиниці активності антибіотиків виражають у мікрограмах (1 мкг – 0,000001 г) чистого препарату. Так, за одиницю активності пеніциліну приймають 0,6 мкг, а для більшості антибіотиків 1 ОД відповідає 1 мкг.

ОСНОВНІ ТИПИ ПОБІЧНОЇ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ

До основних типів побічної дії антибіотиків відносять дисбактеріоз, формування стійкості мікроорганізмів до антибіотиків і пряма токсична й алергізуюча дія.

1. Дисбактеріоз – _____

2. Формування стійкості мікроорганізмів до антибіотиків і дезінфікуючих речовин.

3. Пряма токсична й алергізуюча дія може виникати як наслідок тривалого введення в організм людини антибіотиків з лікувальною метою. Так, тетрацикліни можуть викликати ураження печінки, стрептоміцин зумовлює стійке зниження слуху, левоміцетин – ураження органів кровотворення, цефалоспорини – ураження нирок і т.п.

ПРИНЦИПИ РАЦІОНАЛЬНОЇ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ

Сучасна наука висуває певні вимоги до лікарських препаратів, зокрема антибіотиків. Ці вимоги можна підсумувати у вигляді чотирьох основних положень:

1. Висока вибірковість антимікробної дії і нетоксичність для людини.

2. Відсутність або повільний розвиток резистентності збудників до антибіотика в процесі його застосування.

3. Гарне усмоктування, розподіл, виведення з організму людини антибіотика в кількостях, що забезпечують терапевтичні концентрації в критичних органах і тканинах, у першу чергу – у крові.

4. Зручна лікарська форма для різних вікових груп і локалізації процесу, що забезпечує максимальний ефект антибіотикотерапії.

Практично жоден із сучасних антибіотиків не відповідає перерахованим вимогам. Найбільш повно таким вимогам відповідає пеніцилін. Єдиний, але досить істотний його недолік, – це розвиток в основних збудників гнійно-запальних процесів резистентності до цього

антибіотика.

До узагальнюючих вимог щодо раціонального застосування антибіотиків слід віднести:

1. Виділення й ідентифікація мікроба-збудника інфекційного захворювання (постанова лабораторного мікробіологічного діагнозу захворювання).

2. Вивчення даних світової наукової літератури, що стосуються чутливості збудника інфекції, виділеного від хворого, до антибіотиків. Визначення кола потенційних антибіотиків, що можуть бути застосовані для лікування хворої людини.

3. Визначення чутливості збудника до наявних антибіотиків.

4. Визначення індивідуальної чутливості хворого до антибіотику вибора (профілактика можливих алергічних ускладнень антибіотикотерапії).

5. Комбіноване застосування антибіотиків з іншими препаратами: антибіотиками іншого механізму дії, сульфаніламідами, вакцинами, імунними сироватками, вітамінами і імуномодуляторами (Т-активін, тималін і ін.).

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБІОТИКІВ І ДЕЗІНФІКУЮЧИХ РЕЧОВИН

З метою проведення ефективної антибіотикотерапії або антибіотикопрофілактики необхідно знати чутливість виділеного мікроба до антибіотиків.

Для визначення лікарської чутливості оптимальним є використання чистої культури збудника. Виділяти культури мікробів з організму для дослідження на чутливість необхідно до початку лікування антибіотиками. Використовують різні методи для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, але найбільш поширені серед них:

1) метод серійних розведень антибіотику

2) метод дифузії в агар з використанням паперових дисків.

За ступенем чутливості до антибіотиків мікроорганізми підрозділяються на 3 групи:

1. Чутливі.
2. Помірно чутливі.
3. Резистентні.

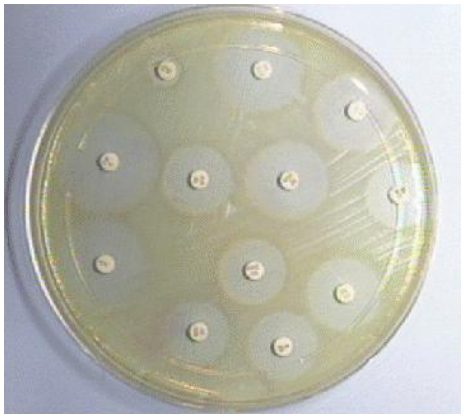
Схема визначення бактеріостатичної і бактерицидної концентрації антибіотику методом серійних розведень

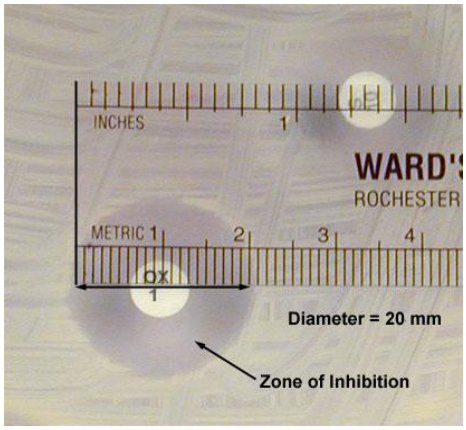
Інгредієнти	Концентрація антибіотику (ОД/мл)						Контроль
	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	
МПБ (мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Антибіотик (500 ОД/мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
Суспензія мікробів (2×10^8 КУО/мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Бактеріостатична доза	Визначається за результатами експерименту						ріст бактерій
Бактерицидна доза	Визначається за результатами експерименту						

Висновок: _____

_____

1. Визначити чутливість виділеної чистої культури мікроорганізму до антибіотиків метод дифузії в агар з використанням паперових дисків.



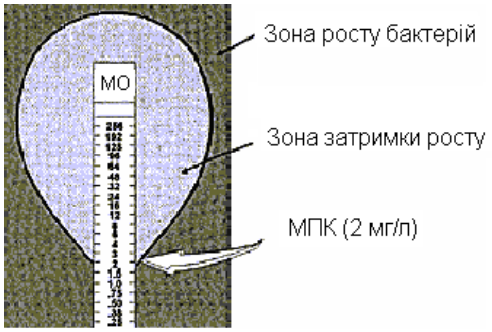


Висновок:_____

_____

_____

2. Вивчення принципа постанови Е-тесту:



Мікробний антагонізм, при якому один вид мікробів пригнічує розвиток інших, досить широко поширений в природі. Антагоністичні стосунки між мікроорганізмами виробилися протягом тривалого періоду еволюції в боротьбі за існування. Такі взаємовідносини особливо виражені у мікроорганізмів, які конкурують з іншими видами в місцях природного проживання. Наприклад, в грунті знаходиться безліч різних видів мікроорганізмів, багато з яких виділяють речовини, що згубно діють на інші види мікробів. Ці речовини назвали антибіотиками. В даний час їх широко використовують для лікування інфекційних захворювань людини, тварин і рослин. Відкриття, вивчення і використання антибіотиків є одним з видатних досягнень нашого часу. Антибіотичні речовини можна не тільки отримати в результаті життєдіяльності мікроорганізмів, але і виділити з тканин тварин, рослин. Тому в даний час антибіотиками називають продукти обміну будь-яких організмів, здатні вибірково вбивати мікроорганізми або пригнічувати їх ріст. З відкриттям протипухлинних антибіотиків сфера їх застосування розширилася: з'явилися антибіотики, що затримують зростання новоутворень.

Класифікація антибіотичних речовин може бути заснована на різних принципах (джерела отримання, хімічні властивості, антибактеріальний спектр і т.п.). Найчастіше їх класифікують за спектром дії на різні мікроорганізми.

Розрізняють: 1) антибіотики, активні відносно грампозитивних мікроорганізмів (група

пеніцилінів і макроліди - еритроміцин і олеандоміцин); 2) антибіотики з широким спектром дії (ампіцилін, левоміцетин, тетрациклін, стрептоміцин, аміноглікозиди); 3) антибіотики з протигрибковим дією (ністатин, леворин, гризеофульвін); 4) протипухлинні антибіотики.

Антибіотики можуть проявляти відносно мікробів бактеріостатичну та бактерицидну дію.

Бактеріостатична дія антибіотиків - затримка росту бактерій або грибів. При використанні таких антибіотиків необхідно забезпечити постійний рівень певної концентрації препарату в крові, так як при її зниженні мікроби починають знову розмножуватися.

Бактерицидна дія антибіотиків пов'язана із загибеллю мікробів. За останні 25 років відкрито безліч антибіотиків з різним спектром дії. Однак для лікування інфекційних захворювань використовують не більше 50, так як багато антибіотиків мають протипоказання до застосування. Антибіотичні речовини отримують з грибів, актиноміцетів, бактерій, вищих рослин, з клітин і тканин різних тварин.

Теоретичні питання:

1. Мікробний антагонізм. Антибіотики. Їх отримання і титрування.
2. Антимікробний спектр хіміотерапевтичної дії антибіотиків.
3. Одиниці дії антибіотиків.
4. Класіфікація антибіотиків за походженням.
5. Класіфікація антибіотиків за хімічним складом.
6. Класіфікація антибіотиків за молекулярним механізмом дії.
7. Визначення чутливості культури до антибіотиків методом серійного розведення, диско-дифузійним методом.
8. Механізм дії антибіотиків на мікробну клітину.
9. Вплив антибіотиків на організм.
10. Лікувальна стійкість мікроорганізмів.
11. Методи подолання лікарської стійкості патогенних мікробів.
12. Принципи раціональної антибіотикотерапії.
13. Синергізм і антагонізм антибіотиків.
14. Правила застосування антибіотиків.

Протокол №21

Тема: ***Генетика мікроорганізмів.***

Мета: ***Ознайомлення з генетичними методами дослідження і їх практичним використанням в мікробіології і біотехнології.***

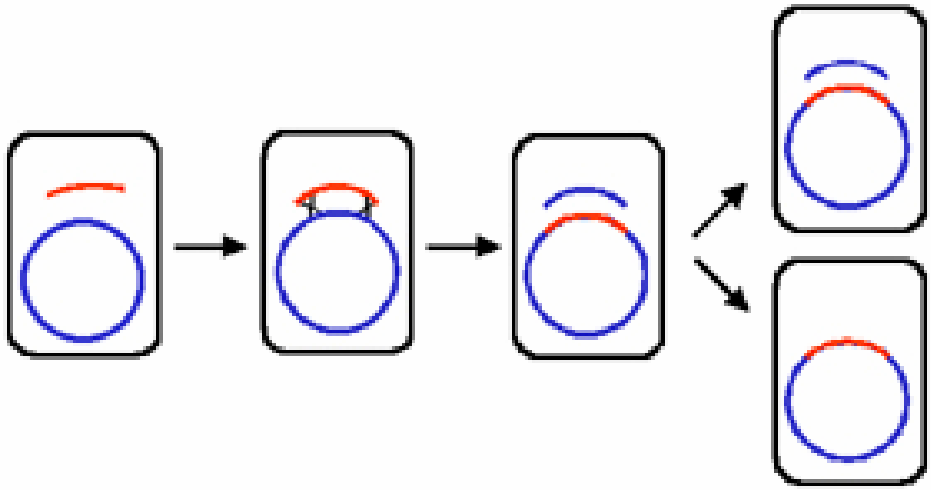
1. Трансформація – це _____

_____

_____

_____

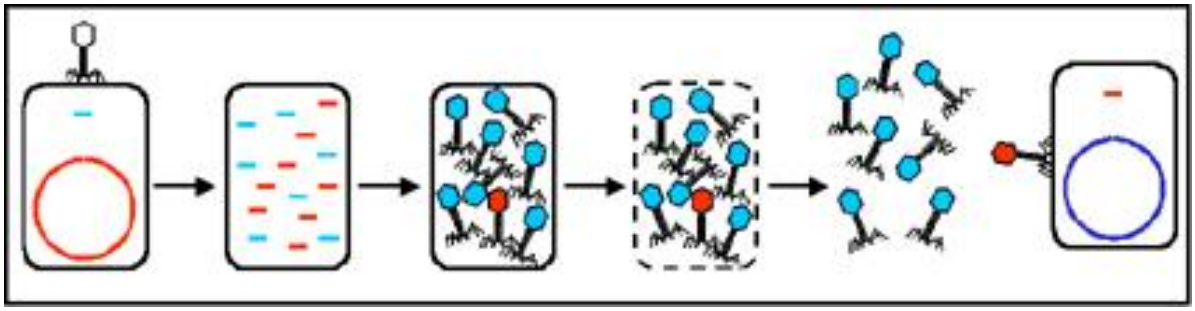
Механізм трансформації



Замалювати схему досліда трансформації

2. Трансдукція – це _____

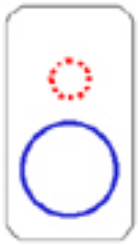
Механізм трансдукції



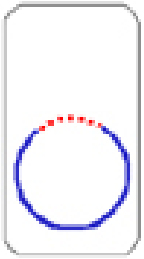
Замалювати схему досліда трансдукції

3. Плазміда – це _____

Розташування плазмід у бактеріальній клітині



F+



Hfr

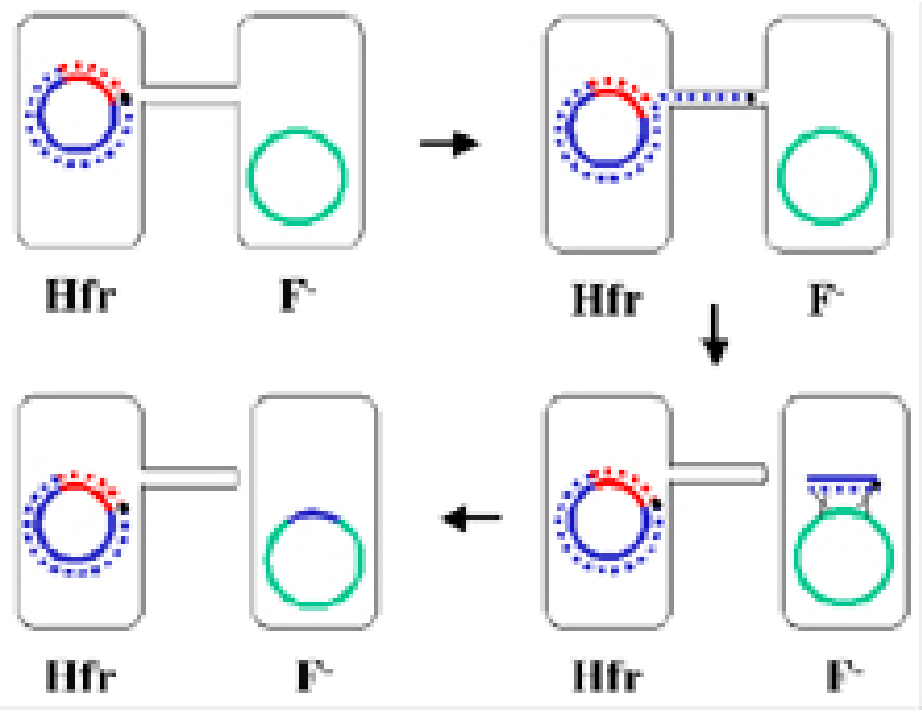
Кон’югація – це _____

_____

_____

_____

Механізм кон’югації



Замалювати схему досліда кон’югації

Мінливість властива всім мікроорганізмам і вірусам. У процесі вивчення мінливості мікроорганізмів була виявлена особлива форма мінливості – дисоціація. Цей вид мінливості виражається в тому, що при посіві деяких культур на щільні живильні середовища відбувається поділ колоній на два типи: 1) гладкі, круглі, блискучі колонії з рівними краями – S-форма (smooth – гладкий) і 2) плоскі, непрозорі колонії неправильної форми, з нерівними краями – R-форма (rough – жорсткий).

Існують також перехідні форми: M-форми (слизуваті) і N-форми (карликові).

Колонії, що належать до гладкої S-форми, можуть за певних умов переходити в R-форму і навпаки. Однак перехід R-форми в S-форму відбувається важче.

Хвороботворні бактерії частіше бувають у S-формі. У деяких хвороботворних бактерій колонії представлені R-формою (збудники туберкульозу, чуми, сибірки).

Зміни, що виникають у бактеріальних клітинах, можуть бути не успадковані – фенотипічна мінливість і успадковані – генотипічна мінливість.

Фенотипічна мінливість представлена модифікацією – це відповідна реакція клітини на несприятливі умови її існування. Модифікації можуть стосуватися морфологічних, культуральних, біохімічних властивостей мікробів. Морфологічна модифікація змінює форму та розмір мікробної клітини.

Культуральна модифікація полягає в зміні культуральних властивостей (пігментоутворення, розміри колоній і т.п.). Біохімічна модифікація виявляється у виникненні адаптивних ферментів, що дозволяють існувати мікробним клітинам у певних умовах.

Стійкість до антибіотиків еукаріотів – грибів і найпростіших – також виникає в результаті мутацій у хромосомних генах, що контролюють утворення структурних компонентів клітини.

Механізми формування антибіотикорезистентності мікроорганізмів складні і різноманітні. Вони залежать від особливостей механізму дії антибіотиків чи хіміопрепаратів на чутливі клітини, від метаболічних властивостей мікробів, а також від хромосомної чи плазмідної локалізації маркерів резистентності.

Поряд із пригніченням процесів життєдіяльності мікробних клітин антибіотики, як і інші хіміотерапевтичні препарати, є могутніми селективними агентами, що сприяють відбору і розмноженню резистентних до них особин. Навіть якщо в чутливій до антибіотика чи хіміотерапевтичного препарату бактеріальній популяції міститься тільки одна резистентна клітина, вона в присутності даної речовини протягом дуже короткого часу може стати родоначальницею нової популяції резистентних мікроорганізмів.

Масовій селекції і поширенню антибіотикорезистентних мікробних популяцій сприяють багато факторів. Наприклад, широке і часто безконтрольне застосування антибіотиків для лікування й особливо для профілактики різних захворювань без достатніх на те підстав, а також широке застосування антибіотиків у ветеринарії як добавки до кормів для прискорення росту тварин, використання антибіотиків як консервантів харчових продуктів, для профілактики різних захворювань у тварин.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

У мікроорганізмів, як і у інших живих істот, спостерігається успадкування ознак, властивих певному виду. У дослідах було показано, що, якщо тримати бактерії в певних постійних умовах, вони довго зберігають свої властивості. Це говорить про стабільність ознак, притаманних кожному виду бактерій. Потомство мікробної клітини в основному успадковує її властивості, що дозволяє визначити, ідентифікувати, будь-який вид мікроорганізмів. Однак відомо, що у одного і того ж виду бактерій можливі відхилення морфологічних і фізіологічних властивостей, що виникають під впливом факторів зовнішнього середовища. Наприклад,

Л.Пастер штучним шляхом отримав незворотні зміни у збудників сибірки та сказу й створив вакцини, що оберігають від цих захворювань. Н.Ф. Гамалія спостерігав зміни морфології холерного вібріона при додаванні в живильне середовище хлориду літію. Це свідчить про те, що мікроорганізми можуть змінювати свої властивості в залежності від умов існування.

Збереження певних специфічних властивостей організму протягом ряду поколінь називається спадковістю. Однак у кожного наступного покоління є якісь ознаки, що відрізняють його від попереднього, – це мінливість. Спадковість і мінливість - два нерозривно пов'язаних між собою процеси, які є основою всього живого.

Вивченням закономірностей успадкування та передачі спадкових ознак від батьків потомству займається наука генетика (від грец. Genesis - народження, походження). До мікроорганізмів генетика вивчала спадкування ознак у результаті статевого розмноження. Однак простежити успадкування і зміну ознак, які нащадки отримали від батьків, було дуже важко при вивченні цих явищ серед тварин і рослин через нечисленність потомства і термінів його появи. Вивчення законів генетики на мікроорганізмах, зокрема на бактеріях і грибах, внесло важливий і цінний внесок в науку та практику. Швидкість поділу бактерій і численність потомства роблять їх зручним об'єктом для вивчення генетичних процесів. Так, кишкова паличка, розмножуючись, ділиться кожні 15 хв, а потомство однієї клітини через 18-24 год досягає 24 млрд. мікробних тіл в 1 мл. Мінливість і спадковість мікроорганізмів підкоряються законам генетики, загальним для різних організмів, в тому числі і вищих.

У мікроорганізмів розрізняють фенотипічну мінливість - неуспадковану і генотипическую мінливість - успадковану, які пов'язані з двома основними особливостями клітини: її генотипом і фенотипом.

Генотип - загальна сума генів, якими володіє клітина. Він визначає цілу групу властивостей організму, специфічних для даного виду мікроорганізмів, які можуть по різному проявитися в різних умовах зовнішнього середовища. Генотип зберігає відносну сталість в будь-яких умовах, що дає можливість розрізняти види мікроорганізмів між собою.

Фенотип - загальний комплекс морфологічних і фізіологічних властивостей кожного індивідуума. Фенотип служить як би зовнішнім проявом характеру генотипу в певних умовах існування.

Генотип - загальні потенційні можливості клітини, а фенотип - видимий вираз цих здібностей.

Термін «модифікації» використовують для позначення фенотипичних змін мікроорганізму, які не передбачають змін в генетичному апараті клітини. Модифікації виникають під впливом різних факторів зовнішнього середовища та, зазвичай, спостерігаються при зростанні й розмноженні мікроба на поживних середовищах. Ці зміни не успадковуються та втрачаються з припиненням дії фактора, який викликав їх. Модифікації можуть стосуватися багатьох властивостей мікроорганізму.

Морфологічні модифікації. Залежно від складу та якості поживного середовища, температури й часу вирощування у бактерій можуть змінюватися форма, розміри клітин, здатність утворювати капсули та спори. Молоді клітини, тільки що вміщені в живильне середовище, менші, ніж старіші. При старінні культури бактерій виникає поліморфізм клітин, в них з'являються гранули. При додаванні до середовища пеніциліну клітини подовжуються, іноді дуже значно. Утворення спор у бактерій залежить від характеру середовища (щільне або рідке), його складу, температури вирощування. При додаванні до середовища 0,1 % пептона спори виникають через 48 годин, а при додаванні 2 % - спостерігаються лише вегетативні форми.

Культуральні модифікації. Багато бактерії та гриби при зростанні на різних поживних середовищах і при різних температурах змінюють інтенсивність утворення пігменту. Так, серація при кімнатній температурі утворює яскраво-червоний пігмент на поживних

середовищах, а при 37 °С він відсутній. У бактерій спостерігаються також зміни типу колоній, які вони утворюють при зростанні на щільних поживних середовищах. Одні колонії гладкі, округлої форми, з рівними краями, блискучі, однорідні, невеликих розмірів. Це S-форми колоній (від smooth - гладкий). Інші - жорсткі, тьмяні, часто непрозорі, з нерівними краями, неправильної форми, сухі. Це R-форми колоній (від rooth - шорсткий). Гладкі S-форми можуть переходити в шорсткі R-форми і назад. Існують і інші перехідні форми колоній: слизові (M-форми), карликові (G-форми). Освіта різних форм колоній у одного і того ж виду бактерій називається дисоціацією (розщеплення). Дисоціацію колоній можна отримати при зміні складу живильного середовища, під дією дезінфікуючих речовин, деяких солей і т.п.

Модифікації фізіологічних і біохімічних властивостей. Відомо, що стійкість до фізичних і хімічних агентів залежить від віку культури. Наприклад, молоді клітини більш чутливі до дезінфікуючих речовин, ніж старі. Типові фізіологічні властивості даного виду виявляються у культур бактерій, які знаходяться в стаціонарній фазі росту. Одним з найбільш яскравих прикладів зміни біохімічних властивостей мікробів є утворення ними адаптивних ферментів. Зазвичай культура бактерій, розмножуючись на поживних середовищах, виробляє певні ферменти, що дозволяють їй засвоювати живильні речовини. Кожен вид бактерій характеризується виробленням набору ферментів, зумовленого їх генотипом. Але «працюють» зазвичай не всі гени, що визначають цей набір. Вироблення окремих ферментів з усього набору обумовлюється наявністю певних поживних речовин у середовищі. Якщо речовина знаходиться в живильному середовищі, то з'являється і фермент. При відсутності цієї речовини припиняється вироблення ферменту. Такі адаптивні ферменти дозволяють бактеріям пристосуватися, адаптуватися, до певних умов зовнішнього середовища. Отже, фенотипова мінливість залежить від умов середовища, в яких існує даний вид мікроорганізмів. Пристосовуючись до конкретних життєвих умов, мікроб реалізує ту інформацію, яка є в геномі клітини. Це дозволяє йому рости й розмножуватися на різних поживних середовищах. Однак широта змін мікробів має певні межі. Варіабельність різних властивостей мікроорганізмів можлива в основному лише в межах кордонів, характерних для кожного виду.

Виникнення нових властивостей і успадкування їх можливі лише тоді, коли відбудуться зміни в геномі клітини, що зачіпають інформацію, закладену в ДНК, мікроорганізму. Така мінливість носить назву генотипової.

Спадкова інформація клітини укладена в хромосомі і генах, які передаються з батьківської клітини в дочірні.

Хромосоми - нуклеопротеїни (нуклеїнові кислоти + білки), вони є носіями генів, що визначають спадкові властивості організму. Гени невидимі, але відомо, що вони розташовуються в лінійному порядку в хромосомі. При нестатевому способі поділу гени в процесі мітозу розподіляються порівну між двома клітинами. Дочірні клітини отримують повний набір генів вихідної клітини і є однаковими.

Хімічна природа генів - нуклеїнові кислоти. Порядок розташування азотистих основ в ланцюзі нуклеїнової кислоти визначає різний генетичний вид ДНК у різних організмів.

Основною структурою, що зберігає інформацію про синтез необхідних клітині різноманітних молекул білка та передає цю інформацію у спадок, є ДНК. У деяких вірусів цю роль виконує РНК. Інформація, укладена в молекулах нуклеїнових кислот і характеризує кожен вид мікроорганізму, може змінюватися в результаті генотипової мінливості. При цьому обов'язково відбуваються зміни генів у хромосомі.

Генотипова мінливість може виникати в результаті мутацій і генетичних рекомбінацій: кон'югації, трансформації і трансдукції.

Обмін генетичним матеріалом - рекомбінація - може відбуватися у бактерій шляхом кон'югації, при безпосередньому контакті двох клітин. У цьому випадку між двома бактеріями

утворюється місток і хромосома з однієї клітини переходить в іншу. Це явище вперше спостерігали в 1947 р Ледерберг і Тетум в електронному мікроскопі. Надалі в штамах бактерій були знайдені статеві відмінності. Існують культури донори (F +, або чоловічий тип), що віддають генетичний матеріал, і культури-реципієнти (F ~, або жіночий тип), що сприймають його. Передача генетичного матеріалу відбувається тільки односторонньо: від донорів до реципієнтів.

Здатність до передачі генетичного матеріалу залежить від наявності спеціального чинника плодючості, або F-фактора (від англ. Fertility - плодючість), який відноситься до плазміди. F-фактор представляє собою невелику хромосому, яка зазвичай розташовується автономно в цитоплазмі бактерій і тільки іноді може включатися в хромосому бактерій. Фактор плодючості містить гени, відповідальні за утворення на поверхні бактерій спеціальних ворсинок (F-ворсинки, або пілі), через які відбуваються з'єднання бактерій і передача генетичного матеріалу. Якщо фактор плодючості знаходиться в автономному стані в цитоплазмі, він легко передається сам від однієї клітини іншої. В цьому випадку бактерії-реципієнти (жіночий тип), отримавши F-фактор, самі стають донорами (чоловічий тип). Але передачі спадкових ознак, розташованих в хромосомі клітини-донора, в цьому випадку не відбувається. Якщо F-фактор включений в хромосому хазяїна, то гени клітини-донора можуть переходити в клітку, що є реципієнтом. В цьому випадку хромосома бактерії-донора втрачає свою кольцевидную структуру і стає лінійної. При цьому F-фактор розташовується на одному з кінців хромосоми. Передача генетичного матеріалу хромосоми в іншу клітку через утворений місток починається з кінця протилежного F-фактору, з так званої О-точки (від origin - початок). Останнім в клітку-реципієнта надходить F-фактор. Передачу хромосоми можна перервати в будь-який момент, роз'єднавши клітини, наприклад, струшуванням. Тоді реципієнт отримає тільки частину інформації, що містяться в ДНК донора. Існують штами, наприклад у кишкової палички, які мають високу здатність до передачі хромосомної інформації. Вони названі Hfr - штами з високим ступенем рекомбінації.

Явища кон'югації описані у бактерій родини Enterobacteriacae: ешерихій, сальмонел та у вібріонів. Перенесення генетичного матеріалу шляхом кон'югації вивчений поки тільки у родинних бактерій, таких, як ешерихія - шигелла, сальмонела - шигелла, ешерихія - сальмонела. В результаті рекомбінації генів утворюються рекомбінанти, які мають ознаки батьків.

Вивчення кон'югації у бактерій дозволило виявити розташування генів в хромосомі кишкової палички і скласти докладну генетичну карту цієї хромосоми.

Трансформація (перетворення, перебудова) бактерій може статися при передачі ДНК з однієї клітини в іншу без їх безпосереднього контакту. Це можливо при вирощуванні культури бактерій на середовищах з мертвими клітинами, фільтратами або екстрактами інших культур. У цих випадках бактерії набувають ознак тих мікроорганізмів, з матеріалом яких вони були вирощені. Потім вони передають ці властивості потомству. Вперше у 1928 р Гріффіт в дослідах на мишах показав перетворення безкапсульних, що не викликають загибель мишей, пневмококів у пневмококи, що утворюють капсулу і спричиняють загибель тварин. Це сталося, коли дослідник вводив мишам культуру живого безкапсульного пневмокока разом з вбитим капсульним пневмококом. У 1944 р Евері встановив, що трансформуючим фактором, здатним передавати властивості одного мікроба іншому, є ДНК. Після цих робіт було остаточно доведено, що генетична інформація локалізується в ДНК, а не в білку. За допомогою чистих препаратів ДНК можна здійснити передачу різних ознак від одного мікроба іншому, наприклад стійкість до антибіотиків і різних отрут, вірулентність. Клітини, в які здатна проникати ДНК, називають компетентними. Однак включати нову ДНК в геном можуть клітини тільки близькоспоріднених штамів. При включенні генів в хромосому бактерії набувають властивостей тих бактерій, гени яких вони отримали.

Рекомбінація генів можлива також при перенесенні частин генома від однієї клітини до іншої за допомогою бактеріофага. Це явище називається трансдукцією (перенесення). Вперше в 1951 р було показано, що бактеріофаги, що розмножуються в штамі корінебактерій дифтерії, що утворює токсин, можуть перенести цю властивість нетоксігенним штамам збудників дифтерії. В даний час механізм трансдукції вивчений досить детально. Він пов'язаний з наявністю в бактеріальній клітині помірного (невірулентного) фага. У таких лізогенних культурах бактерій помірний фаг включений в генетичний апарат клітини й може нескінченно передаватися потомству бактерії при розмноженні. Під впливом різних причин, наприклад ультрафіолетового опромінення, помірні фаги можуть виходити з хромосоми бактерії в цитоплазму і забирати з її генома різні гени. У цитоплазмі бактерії, стаючи вірулентними, фаги починають розмножуватися та руйнують мікробну клітину. При ураженні нових бактеріальних клітин фаги знову включаються в їх хромосому і приносять до неї нові гени. Ці гени, внесені в клітку, викликають появу нових ознак у бактерії, властивих вихідній бактерії-донору.

Розрізняють загальну трансдукцію, при якій фаги, включаючись у будь-яку ділянку хромосоми, переносять у клітину-реципієнт різні ділянки генів, що контролюють різноманітні властивості бактерії-донора. При специфічній трансдукції помірні фаги постійно локалізуються в певному місці хромосоми. Тому вони переносять тільки певний ген, розташований поруч з профагом. При абортивній трансдукції фрагмент бактеріальної ДНК, захоплений фагом, проникаючи в клітину-реципієнт, функціонує в цитоплазмі клітини. При розподілі бактерії він передається тільки однієї дочірній клітині.

За допомогою фагів можна передати від одних бактерій іншим здатність розкладати цукри, утворювати спори, джгутики, стійкість до пеніциліну.

Крім генів, укладених у хромосомній ДНК, бактерії можуть мати в цитоплазмі невеликі позахромосомних набори генів - так звані плазміди. Багато плазмід мають здатність вбудовуватися в хромосому клітини-господаря - тоді їх називають епісоми.

Бактеріальні плазміди - невеликі кільцеподібні дволанцюжкові молекули ДНК, здатні подвоюватися незалежно від хромосоми господаря. Плазміди, які включені в хромосому бактерії, подвоюються разом з нею. Багато плазмід несуть гени, що впливають на фенотип клітини-господаря, і повідомляють їй нові властивості: стійкість до лікарських препаратів, здатність до утворення токсинів (бактеріоцини), до кон'югації. В останні роки описані приховані плазміди, які не мають фенотипічних виразів. Вони знайдені у багатьох бактерій тільки за допомогою ультрацентрифугування. Виявлення плазмід у різних видів бактерій показує, що присутність їх в бактеріальних клітинах - широко поширене явище.

Типи плазмід. Більшість плазмід класифікують на підставі тих властивостей бактеріальної клітини, за які вони відповідають:

1) F-фактори (fertility - плодючість);

2) R-фактори (resistance - резистентність, стійкість);

3) Col-фактори (colicinogeny - коліциногенність);

4) пеніциліназні плазміди золотистого стафілокока;

5) плазміди деградації псевдомонад і т.п.

Плазміди – необов'язкові автономні елементи клітини. Їх можна отримати (елімінувати) з бактерії нагріванням, акридиновим барвниками, ультрафіолетовими променями, що пригнічують реплікацію (відтворення) плазміди. Видалення плазміди не порушує життєво важливі функції клітини.

F-фактори - плазміди, які визначають появу нових поверхневих структур клітини, - F-ворсинок, або пілей, що дозволяє клітинам вступати в контакт і забезпечувати процес перенесення плазмідної ДНК з однієї клітини в іншу. Усі плазміди, які повідомляють своїм господарям здатність до переносу ДНК хромосоми, називають статевими.

R-фактор - плазміди, які обумовлюють множинну резистентність мікроорганізмів до лікарських речовин. Вперше був виявлений в Японії в 1955 р під час спалаху дизентерії, при виділенні штаму шигел, стійких до чотирьох лікарських препаратів: стрептоміцину, тетрацикліну, хлорамфеніколу та сульфаніламідів. R-фактор зазвичай знаходиться в автономному стані в цитоплазмі, але може вбудовуватися в хромосому і тоді виконує функції статевого фактора, що забезпечує перенесення хромосоми господаря в іншу клітку. Поява штамів, стійких до антибіотиків і сульфаніламідних препаратів, ускладнює лікування інфекційних хворих.

Col-фактор, або фактор коліциногенності, визначає здатність бактерій утворювати особливі речовини, які викликають загибель близькоспоріднених штамів.

Вперше ці речовини були виявлені в культурі кишкової палички, тому їх назвали коліцини. Продукція речовин, подібних коліцини, в подальшому була встановлена і у інших бактерій: холерного вібріона (вібріоцини), бактерій чуми (пестіцини) і т.п. Ці речовини стали називати бактеріоцини. Вони мають білкову природу, здатність адсорбуватися на поверхні бактеріальної клітини, пригнічують в ній обмінні процеси і викликають загибель клітини. Бактеріоцини діють тільки на бактерії, близькоспоріднені з продуцентом. Продукція бактеріоцинів найчастіше летальна для клітин, що продукують їх. Здатність клітини до продукції бактеріоцинів визначає автономна плазмида, названа Col-фактором. У природних умовах тільки поодинокі клітини в популяції (1 на 1000) спонтанно продукують бактеріоцини. При ультрафіолетовому опроміненні число продуцентів збільшується. Здатність бактеріальних клітин продукувати бактеріоцини та специфічність їх дії можуть бути використані для епідеміологічних цілей при типуванні культур, виділених в осередках, з метою виявлення джерела інфекції. Запропоновано схему коліцінотипування збудників дизентерії.

Пеніциліназні плазміди золотистого стафілокока зумовлюють утворення активного ферменту пеніциліназа, який руйнує пеніцилін. Тому антибіотик, ефективний на початку його застосування при лікуванні стафілококових інфекцій, перестав діяти на штами стафілокока, що стали до нього стійкими (джерело: http://microbiology.ucoz.org).

Теоретичні питання:

1. Чим представлений генетичний апарат мікробної клітини.
2. Форми мінливості бактерій.
3. Поняття рекомбінації, трансформації, трансдукції і кон’югації.
4. Матеріальні основи успадкування у бактерій. Хромосомні і позахромосомні фактори. Плазміди, класифікація.
5. Мутації, спонтанні і індуковані. Генез мутації.
6. Значення генетики бактерій у теорії і практиці, у біології і медицині.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ СТУДЕНТІВ

Морфологія та фізіологія мікроорганізмів. Інфекція. Імунітет. Антибіотики. Генетика.

1. Мікробіологія, як область загальної біології, що вивчає закономірності життя і розвитку мікроорганізмів. Завдання медичної мікробіології та вірусології. Значення мікробіології в роботі лікаря.
2. Історія вітчизняної мікробіології, імунології та вірусології та роль її видатних вчених у розвитку світової науки.
3. Основні етапи розвитку мікробіології. Досягнення і проблеми мікробіології в другій половині XX століття.
4. Роботи Луї Пастера і їх роль у розвитку мікробіології.
5. Систематика і номенклатура бактерій. Основні принципи систематики. Класифікація бактерій. Характеристика видів.
6. Основні відмінності прокаріотів та еукаріотів. Форми бактерій з дефектом синтезу клітинної стінки, протопластів, сферопласти. L-форми бактерій.
7. Морфологія і будова бактерій. Роль окремих структур для життєдіяльності бактерій і в патогенезі інфекційних захворювань.
8. Морфологія і класифікація найпростіших.
9. Типи і механізми живлення мікроорганізмів. Механізми потрапляння поживних речовин у бактеріальну клітину. Хімічний склад мікроорганізмів. Значення складових компонентів. Живильні середовища, вимоги до них. Класифікація поживних середовищ, які застосовуються в мікробіології.
10. Дихання мікроорганізмів. Аеробний і анаеробний типи дихання. Ферменти і структури клітин, які беруть участь в процесі дихання.
11. Ферменти мікроорганізмів, їх роль в обміні речовин і використання для диференціації бактерій. Ферменти патогенності.
12. Зростання і способи розмноження бактерій. Механізм клітинного ділення, фази розмноження культури бактерій в стаціонарних умовах. Форми спокою у мікроорганізмів.
13. Класифікація та морфологія грибів.
14. Екологія мікроорганізмів. Поширення мікробів в природі. Значення робіт С.М. Виноградського.
15. Нормальна мікрофлора тіла людини, її роль в фізіологічних процесах і в патології людини. Вікові особливості нормальної мікрофлори носа, шкіри, ротової порожнини, статевих органів, кишечника. Гнотобіологія. Дисбактеріоз і причини його виникнення.
16. Походження та еволюція мікроорганізмів. Сучасна класифікація прокаріотів. Основні таксони. Систематика і номенклатура бактерій. Вид як основна таксономічна одиниця.
17. Методи досліджень в мікробіології. Принципи організації, обладнання та режим роботи бактеріологічної, серологічної і вірус-логічної лабораторій.

18. Бактеріоскопічний метод дослідження. Етапи. Оцінка. Вплив робіт Р. Коха на прогрес мікробіології.
19. Бактеріологічний метод дослідження. Принципи виділення чистої культури бактерій, ідентифікації виділеної чистої культури.
20. Вплив фізичних, хімічних і біологічних факторів на мікроорганізми. Стерилізація, методи, контроль ефективності стерилізації. Асептика. Антисептика.
21. Хіміотерапія і хіміотерапевтичні препарати. Хіміотерапевтичний індекс. Механізм антибактеріальної дії сульфаніламідів. Роль П. Ерліха та Г. Домагка в розвитку вчення про хіміотерапії.
22. Явище антагонізму в мікробів. Роль вітчизняних мікробіологів у розвитку вчення про антагонізм мікробів. Антибіотики, характеристика, принципи отримання, одиниці виміру. Класифікація за механізмом дії на мікроорганізми.
23. Лікарська стійкість мікробів, механізм утворення стійких форм бактерій. Методи вивчення чутливості мікробів до антибіотиків. Мінімальна переважна концентрація (МПК). Практичне значення. Принципи боротьби з лікарською стійкістю мікроорганізмів.
24. Матеріальні основи спадковості у мікроорганізмів. Генотип і фенотип. Види мінливості. Неспадкова мінливість.
25. Спадкова мінливість. Мутації, і їх різновиди. Фізичні, хімічні та біологічні мутагени. Генетичні рекомбінації: трансформація, трансдукція, кон'югація.
26. Позахромосомні фактори спадковості у бактерій. Плазміди, їх основні генетичні функції. Мігруючі елементи. Роль мутацій, рекомбінацій і селекції в еволюції мікробів. Основні фактори еволюції.
27. Значення генетики в розвитку загальної і медичної мікробіології, вірусології, молекулярної біології. Мікробіологічні основи генної інженерії. Схема отримання генетичних структур і спадково змінених організмів. Досягнення генної інженерії, використання генно-інженерних препаратів в медицині.
28. Інфекція. Фактори, які зумовлюють виникнення інфекційного процесу. Роль мікроорганізмів в інфекційному процесі. Патогенність, вірулентність, одиниці виміру, методи визначення. Фактори патогенності мікроорганізмів, їх характеристика.
29. Токсини мікробів (екзо- й ендотоксини). Властивості і хімічний склад, отримання, вимір сили екзотоксинів. Роль в патогенезі та імуногенезі інфекційних захворювань.
30. Роль макроорганізму в інфекційному процесі. Імунологічна реактивність організму дитини. Вплив зовнішнього середовища і соціальних умов на виникнення і розвиток інфекційного процесу у людини. Персистенція бактерій і вірусів. Поняття про рецидив, реінфекції, суперінфекції.
31. Вчення про імунітет. Етапи розвитку імунології. Види імунітету і форми його прояви.

32. Неспецифічні фактори захисту організму від патогенних мікробів. Комплемент, його властивості, шляхи активації. Фагоцитоз, види фагоцитуючих клітин. Стадії фагоцитозу. Завершений і незавершений фагоцитоз.
33. Антигени, їх характеристика. Повноцінні і неповноцінні антигени. Антигенна структура бактерій. Практичне значення вчення про антигени мікробів. Аутоантигени.
34. Антитіла, їх природа. Місце синтезу, динаміка продукції антитіл. Аутоантитіла.
35. Антитоксини, їх властивості, механізм дії. Принципи отримання антитоксичних сироваток. Одиниці виміру, практичне використання.
36. Імунна система організму, її органи. Роль тимуса в імунній відповіді. Клітини імунної системи, їх різновиди, взаємодія Т, В-лімфоцитів і макрофагів. Їх роль в клітинному і гуморального імунітету.
37. Закономірності імунної відповіді організму. Фази імунної відповіді. Імунологічні реакції. Імунологічна толерантність, причини її виникнення. Імунологічна пам'ять, її механізм.
38. Гіперчутливість негайного й уповільненого типів, їх механізми, відмінності. Практичне значення.
39. Серологічні реакції, їх характеристика, основні типи, практичне використання. Реакція аглютинації, її механізм, різновиди. Практичне виконання.
40. Серологічні реакції. Реакція преципітації, її механізм. Використання в медичній практиці. Реакція преципітації в гелі.
41. Серологічні реакції. Реакції лізису. Реакція зв'язування комплементу, її практичне використання.
42. Реакції з міченими антитілами або антигенами. Практичне використання реакції імунофлюоресценції (РІФ), імуноферментного та радіоімунного аналізів. Полімеразно-ланцюгова реакція.
43. Вакцини. Історія відкриття. Живі вакцини, принципи одержання. Контроль. Практичне отримання живих вакцин, оцінка їх виробництва.
44. Вакцини. Класифікація вакцин. Корпускулярні, хімічні, синтетичні, генно-інженерні і антиідиотипічні вакцини.
45. Хімічні вакцини і анатоксини, принципи отримання. Асоціювання вакцини. Адсорбовані вакцини, принцип "депо".
46. Анатоксини, їх отримання, очищення, одиниці виміру, використання, оцінка.
47. Корпускулярні вакцини з вбитих мікробів. Принципи отримання, контроль і оцінка їх ефективності.