Методичні вказівки
до проведення занять та крітерії оцінювання роботи студентів.

Відповідно до навчальних планів студентів лікувальних факультетів дисципліна «Мікробіологія, вірусологія та імунологія» складається з двох модулів, в кожному з яких 60 годин практичних занять. У з'вязку з цим кожен модуль налічує 20 практичних занять по 3 академічні години кожне. З 20 занять одне відводиться під модульний контроль.

Максимальна кількість балів за поточну діяльність – 120, тому мксимальна оцінка за кожне заняття - 6 балів. Таким чином, за 19 практичних занять студент отримує 114 балів. Щє 6 балів студент отримує за самостійну позааудиторну роботу, темою якої може бути: ”Истоія розвитку мікробіології“, ”Морфологія та систематика найпростіших“, або інші питання, які не війшли до практичних занять.

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

Пропонуємо таку методику оцінювання знань, умінь та практичних навичок студетів. Студенти, які виконали менше 50% тестів, або не представили результатів виконання практичних завдань отримують оцінку „2”, тобто 0 балів. Оцінку „3” (2 бали) студенти отримують при виконанні 50-70% тестів та наявності оформленого протоколу роботи, якщо вони не брали участі в усному опитуванні та обговоренні навчаючих завдань, або давали помилкові відповіді. Оцінку „4” (4 бали) студенти отримують при виконанні не менше 70% тестів, наявності оформленого протоколу роботи, якщо вони дають правильну розгорнуту відповідь на одне з обговорюваних питань. Оцінку „5” (6 балів) студенти отримують при виконанні не менше 80% тестів, безпомилковому виконанні практичних завдань та оформленні їх результатів, а також за умов активної участі у обговоренні теоретичних та практичних питань.

Практична робота № 1

Тема: Організація бактеріологічної лабораторії. Мікроскопія.

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

1. Дотримуватись правил безпеки в бактеріологічній лабораторії.

2. Характеризувати призначення підрозділів та основного обладнання бактеріологічної лабораторії.

3. Пояснювати принцип дії різних видів мікроскопів.

4. Розраховувати збільшення мікроскопу.

5. Мікроскопувати готові мазки за допомогою імерсійної системи.

Вихідний рівень знать – умінь:

1. Трактувати основні фізичні характеристики світлових хвиль (кафедра фізики).

2. Пояснювати залежність коефіцієнту заломлення світлових хвиль від оптичних властивостей середовища (кафедра фізики).

3. Будувати схеми ходу променів в оптичних приладах **(**кафедра фізики**).**

4. Готувати до роботи світловий мікроскоп, пояснювати призначення окремих елементів його оптичної та механічної системи (кафедра медичної біології).

5. Пояснювати фізичні принципи роботи електронного мікроскопу (кафедра фізики).

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

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

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

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

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

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

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

1. Н.М. Ливенцев. Курс физики для медвузов. М.:Медицина, 1974. С. 435-450

2. А.Н. Ремизов. Курс физики, электроники и кибернетики для медицинских институтов. М.:Медицина 1982. С.336-350

3. Медична і біологічна фізика /Під ред. проф. О.В. Чалого. Київ: Вища школа, 2005. С.520-558

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

1. Побудова біологічного мікроскопу з імерсійним об'єктивом. Порядок роботи з мікроскопом, розрахунок збільшення та роздільної здатності.

2. Відмінності темнопольної мікроскопії, її призначення.

3. Принцип фазово-контрасної мікроскопії, необхідне обладнання. Для чого використовується цей метод мікроскопії?

4. Принцип дії люмінісцентної мікроскопії, для чого використовується люмінісцентна мікроскопія.

5. Будова електронного мікроскопу і принципи електронної мікроскопії.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С. 3-30 .

2. Воробьев А.А.и др. Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 3-7.

3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 3-19.

4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.– М.:ООО "Медицинское информационное агенство", 2008 - С.310-316.

5. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С.24-30, 56-69, 83-93.

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи

1. Оглянути підрозділи мікробіологічної лабораторії, які існують на кафедрі (ознайомлення може бути також за допомогою таблиць або відеофрагментів),

звернути увагу на наявне устаткування, з‘ясувати його призначення. Уважно оглянути робоче місці лаборанта-мікробіолога, роздивитися найбільш використовувані інструменти та лабораторний посуд.
У протоколі відмітити підрозділи бактеріологічної лабораторії, основне обладнання, вказати призначення.
2. Ретельно вивчити правила техніки безпеки при роботі у мікробіологічній лабораторії за наведеною інструкцією

Техніка безпеки у бактеріологічній лабораторії:

а) заборонено – палити, приймати їжу.
б) робоче місце повинно бути чистим. Особисті речі зберігати в спеціальних місцях.
в) в разі потрапляння зараженого матеріалу на стіл, підлогу та ін. ці місця обробити дезинфікуючим розчином.
г) реєстрація, зберігання, нагляд та знищення патологічних мікробів повинно бути зроблено за спеціальною інструкцією.
д) по закінченню роботи необхідно старанно вимити руки, а при необхідності обробити дезинфікуючим розчином.
Зіставити вивчені правила із своїми спостереженнями під час виконання попереднього завдання. У протокол записати основні чинники небезпеки, що мають місце у бактеріологічній лабораторії.
3. Ознайомитися з основними видами мікроскопії:
а) темнопольна мікроскопія заснована на явищі дефракції світла при великому боковому освітленні виважених в рідині найдрібніших частинок. Це досягається за допомогою параболоїд або кардіоїд – конденсатора.
б) фазово - контрастна мікроскопія заснована на перетворенні змін по фазі, які виникають при проходженні світової хвилі через фазові (прозорі) об’єкти, в зміні по амплітуді які видимі оком. Позитивним фазовим контрастом називають темне забарвлення об’єктів в світлому полі зору, негативним фазовим контрастом – світле забарвлення об’єкту на темному фоні. Для фазово-контрасної мікроскопії використовують звичайні мікроскопи і фазово – контрастні пристрої КФ-1 або КФ-4.
в) люмінесцентна (флюорисцентна) мікроскопія основана на явищі фотолюмінесценції.
(Futen-світло). Люмінесцентне випромінювання речовин виникає після дії на них якихось джерел енергії: світла, електричних променів, іонізуючого випромінювання, фотолюмінісценція - люмінісцюючого об’єкту під впливом світла.
Первинна люмінісценція – без пофарбування об’єктів, вторинна – (наведено) після фарбування препаратів спеціальними фарбами флюорохромами.
Переважно - можливо виявлення живих бактерій в невеликих кількостях.
г) електронна мікроскопія дозволяє виявити об’єкти, розміри яких лежать за межами роздільної можливості світлового мікроскопа (0,2 мкм).
Електронний мікроскоп використовується для вивчення вірусів, макромолекулярних структур і інших субмікроскопічних об’єктів. Світлові промені в таких мікроскопах замінюють потоком електронів, які мають прискорення, довжину хвилі біля 0,005 нм., тобто в 1000000 разів коротше довжини хвилі

видимого світла. Окрім цього використовують скануючі електронні мікроскопи які дозволяють рельєфно зображати поверхні об'єкту.
Відмітити у протоколі основні види мікроскопії та вказати фізичні принципи, на яких вони базуються.
4. Розглянути під мікроскопом готові фіксовані препарати мікроорганізмів. Мікроскопія мазків за допомогою імерсійної системи : на підготовлений мазок наноситься крапля імерсійного масла, який ставиться на предметний столик, після чого повернути револьвер до відмітки імерсійного об'єктиву *90, потім опускати тубус мікроскопа до поглиблення об'єкту в краплю масла; встановити орієнтировочний фокус при допомозі макрогвинта; провести завершуюче фокусування предмета макрогвинтом, повертаючи його в межах тільки одного оберту. Не припускаючи сплющення об'єктиву з препаратом, так як це може визвати пошкодження препарату або фронтальної лінзи. Після закінчення роботи з мікроскопом спеціальною ганчіркою протерти масло з імерсійного об'єктиву і привести револьвер на малий сухий об'єктив *8. Записати до протоколу етапи мікроскопії при використанні мікроскопу з імерсійною системою.

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

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

Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 1

Тема: Організація бактеріологічної лабораторії. Мікроскопія.

Завдання № 1. Організація бактеріологічної лабораторії.

а). основні підрозділи бактеріологічної лабораторії:
1._____
2._____
3._____
4._____
5._____
6._____

б) обладнання бактеріологічної лабораторії та його призначення:

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

Завдання № 2. Техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії

Основні небезпечні чинники при виконання мікробіологічних досліджень:

А._____
Б._____
В._____
Г._____

Завдання № 3. Види мікроскопії

А._____
Б._____
В._____
Г._____

Завдання № 4. Порядок мікроскопії готових фіксованих препаратів:

А._____
Б._____
В._____
Г._____
Д._____
Е._____

Дата_____ _____Підпис викладача

Додаток № 1

Граф логічної структури теми:
“Обладнання та режим роботи в бактеріологічній лабораторії. Мікроскопічні методи дослідження”

Практична робота № 2

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

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

Завдання №2. Назвіть основні форми клітин.

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

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

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

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

5. Цитоплазматична мембрана та мезосоми.
6. Рибосоми прокаріотів, їхня роль.
7. Характеристика цитоплазми, нуклеоїда.
8. Прості методи фарбування.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

Матеріали та обладнання: готові мазки з різними культурами мікроорган**і**змів (стафілококки, діплококки, сарцини, палички, вібріони), предметне скло, стерильний фіз.розчин, набір фарб для фарбування (генцианвіолет, розведений фуксин, фільтрувальний папір), мікроскоп, бактеріологічні петлі, стерильні пробирки зі скошеним агаром.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

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

2. Фарбування мазків простим методом.

Фіксований мазок фарбують якою-небудь однією фарбою, наприклад фуксином водним (1-2 хв) або метиленовим синім (3-5 хв), промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсіонним об'єктивом світлового мікроскопу. Пофарбувати готовий мазок одним з наявних барвників, промікроскопувати його, малюнок занести до протоколу. За допомогою таблиць визначити морфологічну групу бактерій, що спостерігається, підписати малюнок.

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

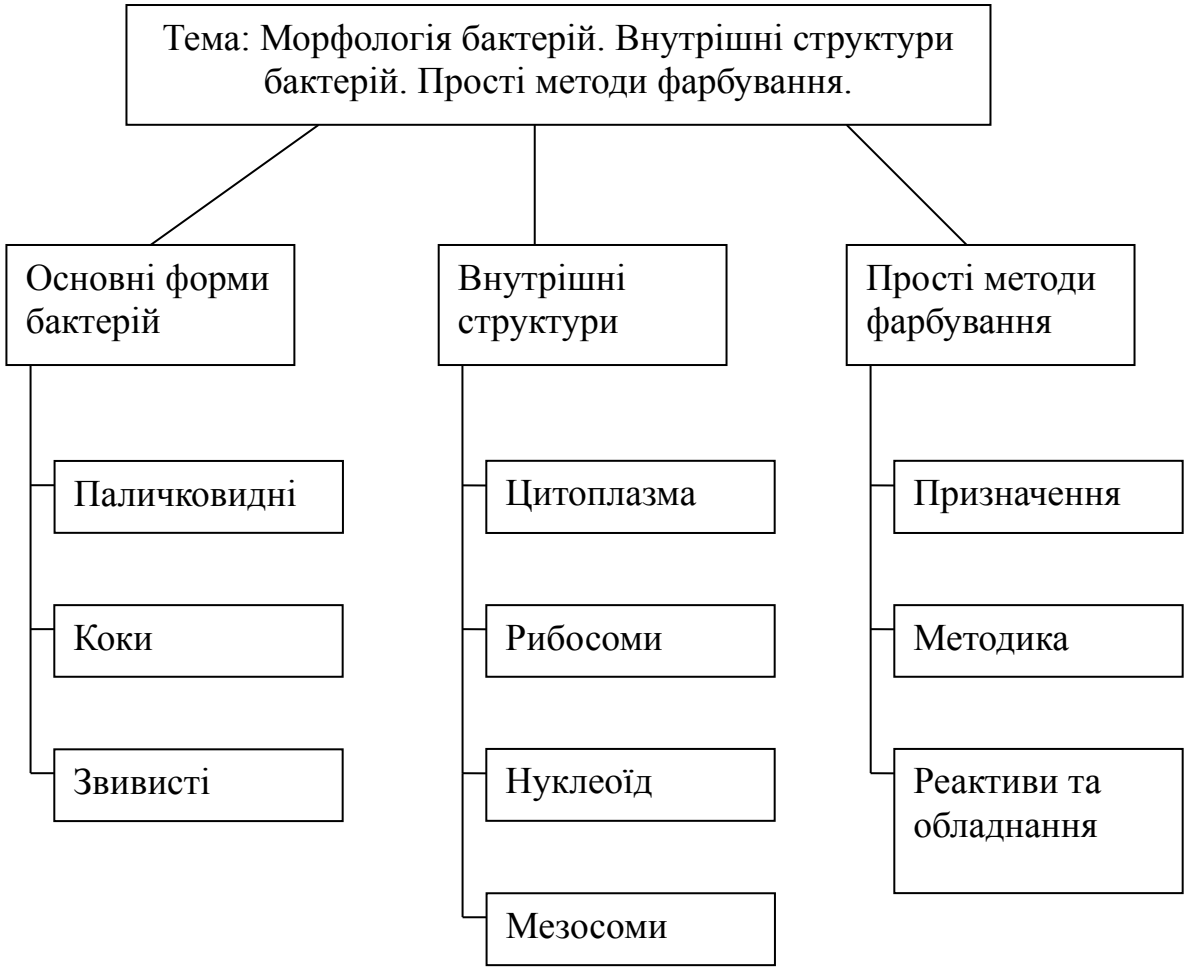
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати навчальні завдання.

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

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

Граф логічної структури теми:

Морфологія бактерій. Внутрішні структури бактерій. Прості методи фарбування.



Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 2

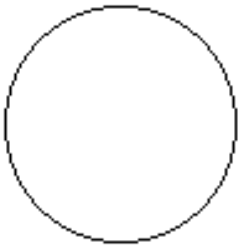
Тема: Морфологія і структура бактерій. Барвники і прості методи фарбування.

Завдання №1. Виготовлення фіксованих мазків

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

Призначення
_____
_____

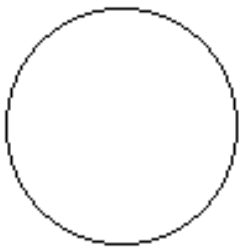
Завдання №2. Прості методи фарбування



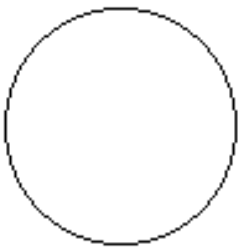
Мал.1

Завдання №3. Морфологія бактерій

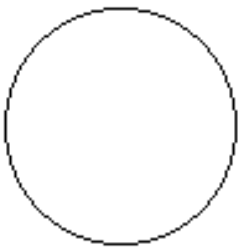
Кокові форми



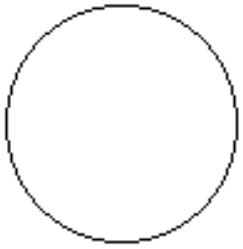
Мал 2.Стафілококи



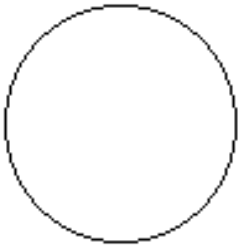
Мал 3.Стрептококи



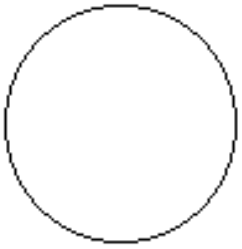
Мал 4..Мікрококи



Мал 5.Диплококи

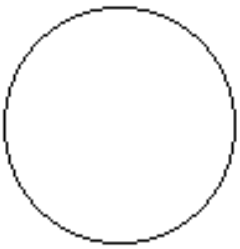


Мал 6.Тетракоки

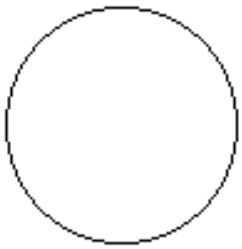


Мал 7. Сарцини

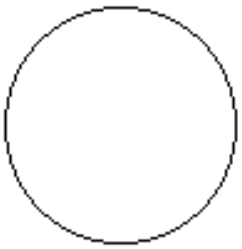
Паличковидні форми



Мал.8. Дрібні палички

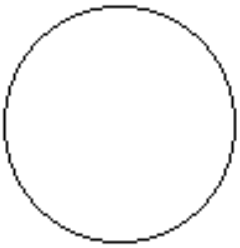


Мал.9. Середні палички.

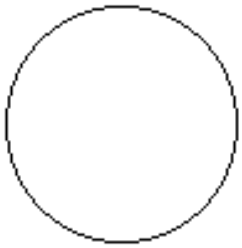


Мал.10. Великі палички

Звивисті форми



Мал.11. Вібріони



Мал.12. Спірили

Дата_____ _____ Підпис виладача

Практична робота № 3

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

Завдання 1. Назвіть органоїди руху еукаріотичних клітин.

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

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

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

Завдання 5. У яких випадках використовують хімічні методи фіксації?

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

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

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

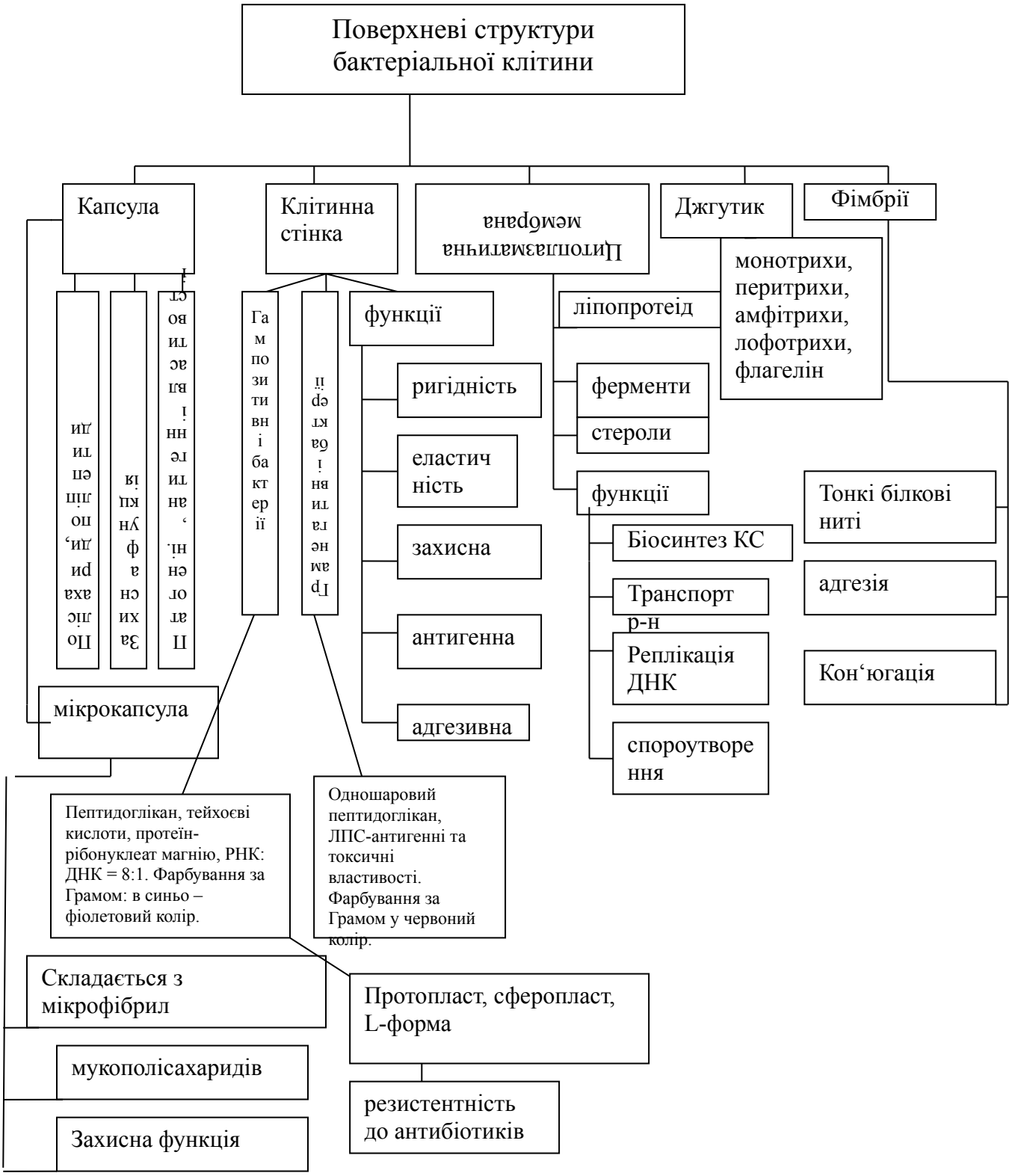
1. З перитонеальної рідини був приготовлений і пофарбований мазок. При мікроскопії мазка спостерігаються пофарбовані у фіолетовий колір коки, що розташовані неправильними скупченнями, і палички середніх розмірів із закругленими кінцями, розташованими хаотично і пофарбовані в рожевий колір. Що ви можете сказати про мікрофлору перитонеального ексудату? Який метод фарбування був використаний у даному випадку і які його основні етапи?

2. Для фарбування харкотиння хворого з підозри на крупозну пневмонію були використані такі реактиви: розчин генціанвіолету, розчин Люголя, 96^{o} спирт, водний фуксин . Який засіб фарбування використаний у цьому випадку?

Додаток № 1

Граф логічної структури теми:

Поверхневі структури бактеріальної клітини. Фарбування за Грамом.



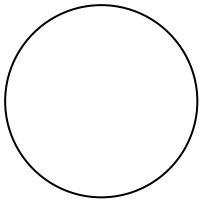
Додаток № 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 3

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

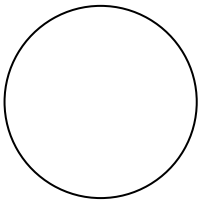
Завдання 1. Етапи приготування препарату за методом Грама

Завдання 2. Фарбування суміші бактерій за Грамом

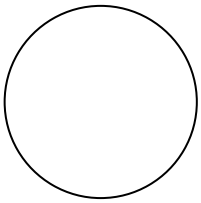


Мал.1

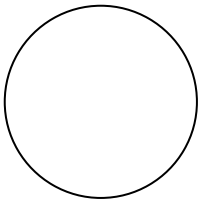
Завдання 3. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми.



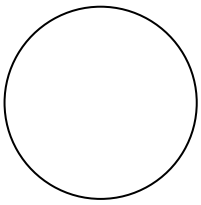
Мал. 2



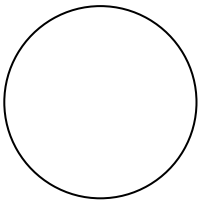
Мал. 3



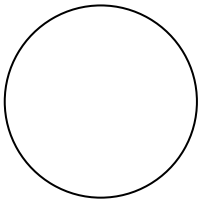
Мал. 4



Мал. 5



Мал. 6



Мал. 7

Завдання 4. Відмінності грампозитивних та грамнегативних бактерій.

Властивості Гр+ бактерій	Властивості Гр- бактерії

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 4

Тема: **Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів. Складні методи фарбування**

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Базовий рівень знань – умінь:

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

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

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

Завдання 2. Яке значення мають спори для мікроміцетів та бактерій?
Завдання 3. Назвіть структури спороутворення у грибів.
Завдання 4. Який зв'язок та значення мають структури бактеріальної клітини, та хімічний склад?
Завдання 5. У клітинній стінці мікобактерій міститься багато ліпідів, тому при фарбуванні звичайними методами барвники не потрапляють всередину клітини. Як можна обробити мазок з мікобактерій, що підвищити проникність клітинної стінки цих мікроорганізмів?

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

1. У лабораторію надійшла сеча хворого з підозрою на туберкульоз нирок. Які методи фарбування можна рекомендувати для виявлення M. tuberculosis в осаді сечі?
2. При мікроскопії мазків харчового продукту (крохмалю) виявлені великі Гр+ палички, подібні Bacillus cereus. Які структурні компоненти клітин можуть

це підтвердити? Який метод фарбування варото використати для їх виявлення?

3. В баклабораторію надійшов з хірургічного відділення кетгут з направленням, де міститься прохання перевірити кетгут на стерільність. В отриманій відповіді зазначено, що кетгут забруднений бацилами. Що було знайдено у мікробів, виділених з кетгуту?

4. Назвіть: Включення мікробної клітини: a) Краплі жиру, в) Зерна волютину, c) Вакуолі, d) Гранули глікогену і крохмалю, e) Рібосоми.

5. Назвіть умови спороутворення: a) несприятливе навколишнє середовище, в) потрапляння в організм людини або тварини, c) висушування, d) низька температура, e) потрапляння до грунту.

6. Значення спор у бацил: a) для розмножування, в) для збереження виду в несприятливих умовах, c) для накопичення резервних живильних речовин, d) захисна реакція при потраплянні в макроорганізм, e) ознака старіння клітини.

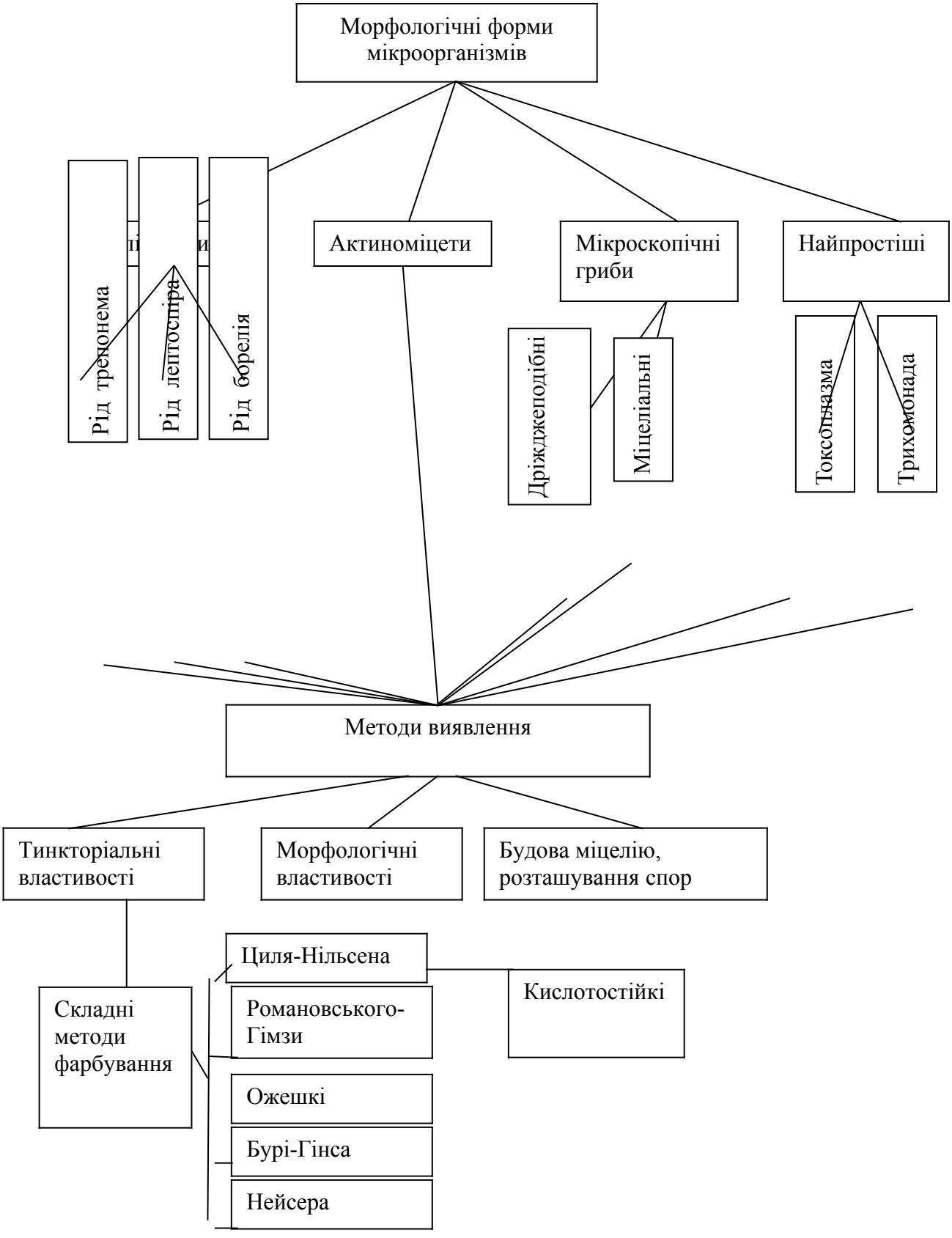
7. Спроможністю до спорооутворення володіють: a) клостридії, в) бацили, c) спірохети, d) найпростіши, e) рикетсії

8. Кислотостостійкість мікроорганизмів пов‘язана з присутністю: a) нуклеїнових кислот, в) жиро-воскових речовин, c) капсул, d) вуглеводів, e) білків.

Додаток 1.

Граф логічної структури теми:

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



Додаток 2.

Зразок протоколу до практичного заняття № 4:

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

Завдання 1. Морфологія спірохет.

Мал. 1 Мал. 2. Мал. 3

Завдання 2. Морфологія рикетсій, актиноміцетів, мікоплазм.

Мал. 4 Мал. 5 Мал. 6

Завдання 3. Виявлення кислотостійких бактерій.

Мал.7

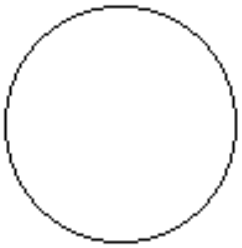
Методика фарбування за Цилем-Нільсеном:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

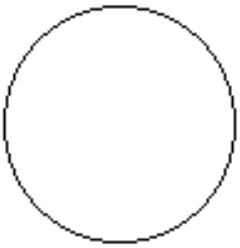
Завдання 4. Структури бактеріальної клітини.

Мал. 8 Мал. 9 Мал. 10

Завдання 5. Морфологія грибів.



Мал. 11



Мал. 12

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 5

Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення чистих культур аеробних бактерій.

Актуальність теми. Мікроорганізмам як всьому живому властиві три основні фізіологічні функції: живлення, дихання і розмноження.
Живлення необхідне для синтезу в клітині всіх органічних структур, воно здійснюється з поглинанням енергії. Основним джерелом енергії є окислювально-відновні процеси (дихання). За типом живлення мікроби діляться на аутотрофів і гетеротрофів. Аутотрофи засвоюють азот і вуглець з неорганічних речовин (СО2 і ін.), а гетеротрофи — з складних органічних сполук (амінокислоти, моноцукру та ін.), синтезованих раніше іншими живими організмами. Гетеротрофи у свою чергу діляться на сапрофітів і паразитів**.**
Дихання мікроорганізмів — біологічне окислення субстрата з виділенням необхідної для метаболізму енергії. За типом дихання мікроорганізми діляться на три основні групи: аероби, анаероби, факультативні анаероби/аероби.
Розмноження бактерій відбувається шляхом простого поперечного ділення клітини.

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

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

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

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати хімічний склад клітини: вода, хімічні елементи та мінеральні речовини, нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи. Особливості хімічного складу еукаріотичних клітин (кафедра біології).

2. Інтерпретувати дві сторони обміну речовин та енергії клітини: конструктивний і енергетичний обмін, їх взаємозв'язок (кафедра біохімії).

3. Пояснювати роль азоту, вуглецю, мінеральних речовин і ростових факторів у живленні клітин (кафедра біохімії).

4. Характеризувати джерела та шляхи одержання енергії клітиною (кафедра біології).

5. Трактувати біологічну роль ферментів, давати їх класифікацію (кафедра біохімії).

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

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

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

Завдання 2. Яка властивість характерна для речовин - амфіболітів?

Завдання 3. Розподіл живих організмів за джерелом енергії.

Завдання 4. Що таке фактори росту клітин?

Завдання 5. Як відбувається дихання на клітинному рівні?

Завдання 6. Роль ферментів у живій клітині.

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

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

2. Афанасьев Ю.И., Юріна Н.А. Гістологія, цитологія і ембріологія.- М.: Медицина.- 1999.

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

1. Хімічний склад бактеріальної клітини: вода, хімічні елементи та мінеральні речовини, нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи. Особливості хімічного складу бактерій порівняно з еукаріотичними клітинами.

2. Особливості обміну речовин та енергії у бактерій (інтенсивність обміну речовин, різноманітність типів метаболізму, метаболічна пластичність, надлишковий синтез метаболітів та енергії). Конструктивній та енергетичний обмін, їх взаємозв'язок.

3. Живлення бактерій. Джерела азоту, вуглецю, мінеральних речовин і ростових факторів. Аутотрофи та гетеротрофи. Голофітний спосіб живлення. Механізми перенесення поживних речовин у бактеріальну клітину: енергонезалежний (проста та полегшена дифузія), енергозалежний (активний транспорт), значення ферментів периплазми та пермеаз. Класифікація бактерій за типами живлення.

4. Дихання бактерій. Енергетичні споживи бактерій. Джерела та шляхи одержання енергії у фотоаутотрофів, хемоаутотрофів.

5. Типи біологічного окислення субстрату і способи одержання енергії у гетерохемоорганотрофів: окислювальний метаболізм; гниття – як сукупність анаеробного і аеробного розщеплення білків; бродильний метаболізм та його продукти; нітратне дихання. Аероби, анаероби, факультативні анаероби, мікроаерофіли, капничні бактерії.

6. Ферменти бактерій та їх класифікація. Конститутивні та індуктивні ферменти, генетична регуляція. Специфічність дії ферментів. Екзо- та ендоферменти. Використання мікробів та їх ферментів у біотехнології для одержання амінокислот, пептидів, органічних кислот, вітамінів, гормонів, антибіотиків, кормового білка, для обробки харчових та промислових продуктів, біологічної очищення стічних вод, одержання рідкого та газоподібного палива.

7. Вікористання мікробів та їх ферментів у біотехнології.

8. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005.-С.46-55.

2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. - М.: Медицина, 1984.- С.96-104.

3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. О.В.Бухарина. -М.: Медицина.-2002.-С.32-40.

4. Скеля Л.З., Нехорошева Н.Г., Лукин И.Н., Груднина С.А. Практические аспекты современной клинической микробиологии.-М. : Медицина -2004. - С.9 – 18.

5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С. 52-53, 55-62.

6. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 96-100, 115-118.

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити типи живильних середовищ (демонстрація) та апаратуру для культивування мікроорганізмів. У протоколі відмітити основні вимоги до поживних середовищ та умови культивування, сприятливі для більшості патогенних мікроорганізмів. Розглянути та описати у протоколі ознаки росту

мікроорганізмів на різних поживних середовищах.

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

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

а) бактеріологічною петлею;

б) тампоном;

в) шпателем

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

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

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

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

На третю добу чисту культуру, що виросла, ідентифікують за основними видовими ознаками. Вивчають морфологію при мікроскопії мазка з чистої культури. Здійснюють посів чистої культури на диференціально-діагностичні тест-системи (стафітест, ентеротест) для вивчення біохімічної активності. Для цього готують 1-мільярдну суспензію бактерій у фізіологічному розчині, потім дозаторними або пастерівськими піпетками вносять 0,1 мл суспензії до лунок тест-системи. Планшет відносять в термостат на добу. Цей 3-й етап бактеріологічного дослідження під час практичної роботи не виконується.

4. Провести ідентифікацію виділеної культури. Для цього розглянути демонстраційні посіви на тест-системах, оцінити наявність біохімічної активності за зміною кольору індикатора в лунках та відмітити у таблиці

протоколу. Зіставити результат з диференціюючими таблицями тест-системи та визначити вид бактерій. Біохімічна ідентифікація виділеної чистої культури складає 4-й етап (4-й день) бактеріологічного дослідження.

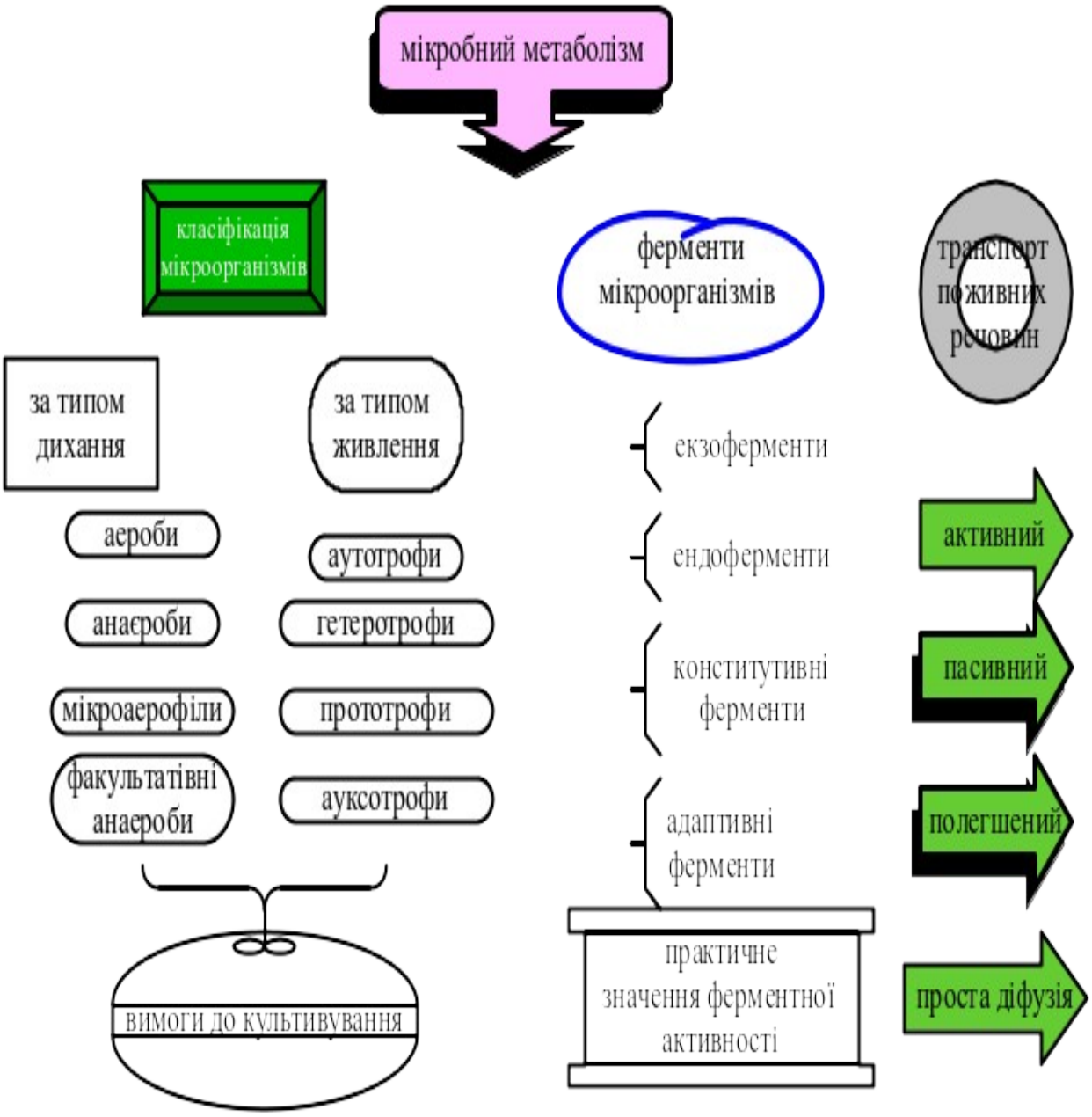
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

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

Додаток 1

Граф логічної структури теми:

Фізіологія мікроорганізмів



Додаток 2.

Зразок протоколу до практичного заняття № 5

Фізіологія мікроорганізмів. Виділення чистих культур аеробних бактерій.

Завдання №1. Поживні середовища та умови культивування мікроорганізмів

.

а) вимоги до поживних середовищ

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

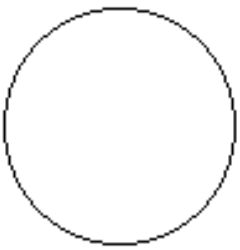
б) умови культивування

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

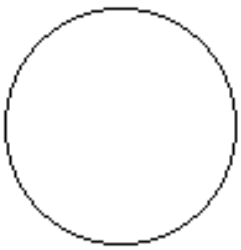
в) Облік зростання мікроорганізмів на різних середовищах

Назва середовища	МПА	Ендо	Кров'яний агар	ЖСА
Облік зростання				

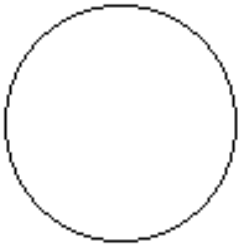
Завдання № 2. Механічне розсівання патологічного матеріалу (суміш мікробів) на щільне живильне середовище з метою отримання ізольованих колоній.
Розсів петлею, шпателем, тампоном.



Мал. 1



Мал. 2



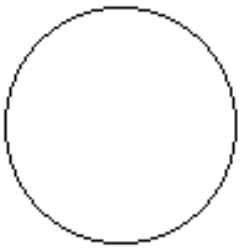
Мал. 3

Відмітити призначення кожного способу посіву:
а) тампоном – _____
б) шпателем – _____
в) петлею – _____

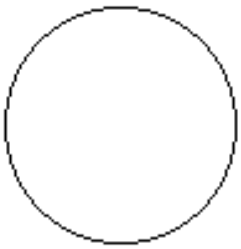
Завдання №3. Облік посіву. Виявлені колонії:

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

Мікроскопія половинок ізольованих колоній різного типу.



Мал. 4.



Мал..5

Завдання №4. Ідентифікація виділеної культури.
Облік біохімічних властивостей. Біохімічна ідентифікація культури.

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

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 6

Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення та ідентифікація чистих культур анаеробних бактерій.

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

Мета(загальна): вивчити методи культивування анаеробів.

Загальна мета – уміти:

а) вибирати придатні середовища для анаеробів;

б) враховувати культуральні та біохімічні ознаки анаеробів.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати види розмноження мікроорганізмів.

2. Трактувати статистичні закономірності зростання бактерійної культури на рідкому живильному середовищі.

3. Використовувати спеціальні методи культивування анаеробних бактерій.

4. Пояснювати особливості культивування рикетсій, хламідій, спірохет у зв'язку з їх біохімічними властивостями.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Характеризувати види розмноження клітин еукаріотів (кафедра біології)

2. Трактувати клітинне дихання як окислювально-відновлювальний процес (кафедра біохімії).

3. Використовувати індикатори pH (кафедра біохімії).

4. Розраховувати відсоткові концентрації розчинів (кафедра біохімії).

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

Завдання **1.** Які існують способи поділу клітин у еукаріотів?

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

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

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

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. За таблицями та демонстраційними зразками вивчити основні типи поживних середовищ. Приклади записати до протоколу, вказати сферу їх застосування. Розглянути зростання різних бактерійних культур на щільних і рідких живильних середовищах.
2. Ознайомитися з технікою приготування живильних середовищ. Визначити pH МПБ. Коротко описати необхідне обладнання та отриманий результат. Розрахувати кількість агар-агару для приготування щільного та напіврідкого середовища.

3.На демонстраційних матеріалах вивчити метод виділення чистої культури анаеробних бактерій, живильні середовища і апаратуру, які використовують для культивування анаеробів. Стислу характеристику середовищ і устаткування занести до протоколу.
Розглянути прилад - анаеростат і ознайомитись з принципом його роботи. Анаеростат — прилад для створення безкисневого середовища — є товстостінною металевою місткістю для розташування чашок Петрі або пробірок. Система газовід-відних трубок і вакуумметр дозволяють відкачувати з місткості повітряну суміш, одночасно заміщаючи її інертним газом (гелієм) і заміряти тиск (малий. 2.4.*)*.

Ознайомитись з умовами створення анаеробіозу в ексікаторі (свічка, тіогліколієва кислота). Ексикатор — товстостінна скляна ємність з притертою кришкою і підставкою для чашок Петрі. На дно ексикатору ставиться свічка, що горить, або наливається кислота (хімічний редуцент кисню), потім кришка притирається .
4.Розглянути чашку з культивуванням аеробів і анаеробів (спосіб Фортнера). У чашку Петрі на поверхню живильного агару, розділеного навпіл посередині чашки, проводять посів: на одній половині — аеробів, на іншій — анаеробів. Чашку герметизують парафіном і поміщають в термостат. При залишковому кисні ростуть аероби, після його утилізації починають рости анаероби.
Розглянути і вивчити склад спеціальних середовищ для культивування анаеробів. Середовище Кіта—Тароці — це живильний бульйон з глюкозою і шматочками свіжих органів тварин. Глюкоза і шматочки органів володіють редукуючою здатністю. Середовище зверху заливають шаром стерильного масла. Середовище контролю стерильності (СКС) — 0,3 %-й агар з додаванням тіогліколієвої кислоти (редуцент O_2), посів уколом. Середовище Вільсона-Блера — це високий стовпчик живильного агару з додаванням солей натрію і заліза, посів уколом. Анаероби утворюють чорні колонії в глибині стовпчика за рахунок хімічної реакції з солями металів.

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

1. У яку фазу розвитку бактеріальної культури мікроорганізми мають найбільшу біохімічну активність?

2. Чи можна отримати чисту культуру анаеробних бактерій шляхом механічного розсіву петлею на поверхні поживного середовища?

3. Чому поживні середовища, навіть із факторами росту, непридатні для культивування рикетсій?

1. Основні процеси, які є складовими фізіології мікрорганізмів:

- Живлення, дихання, розмноження, мінливість

2. Групи бактерій за типом дихання:

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

3. Живильні середовища для культивування облігатних анаеробів:
- Кіта-Тароці, Вільсона-Блера, СКС

4. Групи бактерій по здатності утилізувати вуглець і азот:
- Аутотрофі
- Гетеротрофи

5. Класифікація груп гетеротрофів:
- Сапрофіти і паразити

6. Класифікація груп паразитів:
- Облігатні і факультативні

7. Облігатні паразити (визначення):
- Мікроорганізми, повністю позбавлені здібності жити поза клітинами живого організму (віруси, рикетсії, хламідії)

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

9. Типи живильних середовищ за призначенням:
1. Прості
2. Елективні
3. Диференціально-діагностичні

10. Спосіб розмноження у бактерій:
- Поперечне ділення

11. Колонія (визначення):
- Потомство однієї клітини при розмноженні на твердому живильному середовищі

12. Чиста культура (визначення):
- Популяція мікроорганізмів, що складається з особин одного виду

13. Принципи виділення чистих культур бактерій:
1. Механічне роз'єднування мікроорганізмів при посіві
2. Використання біологічних властивостей бактерій

14. Етапи бактеріологічного методу діагностики:
- Виділення чистої культури
- Ідентифікація чистої культури

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

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

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

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

Зростання — це збільшення розмірів окремої особини.

Розмноження — здібність організму до відтворення.

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

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

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

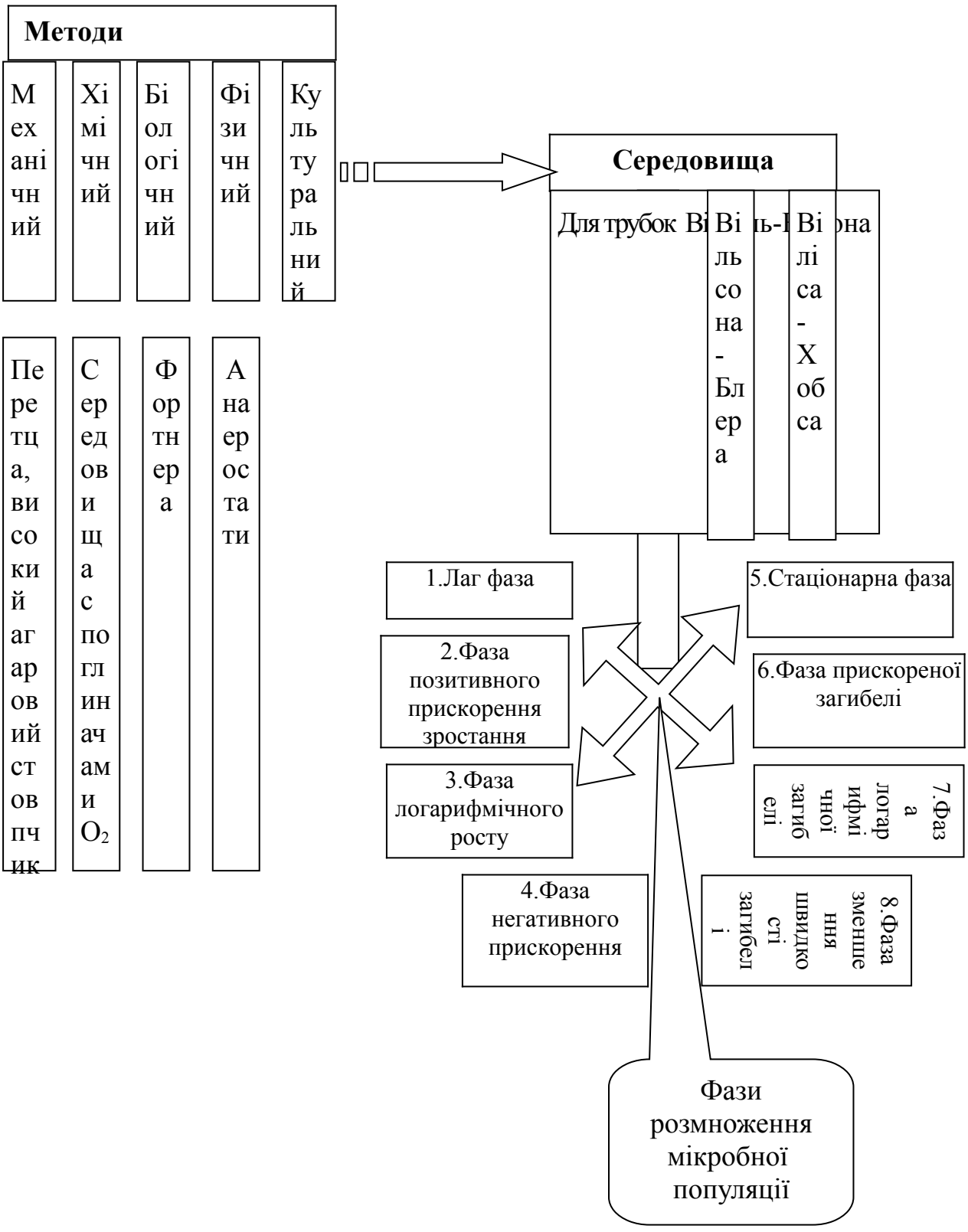
1. Фаза підсумкова (латентна) — мікроби адаптуються до живильного середовища, збільшується розмір клітин. До кінця цієї фази починається розмноження бактерій.
2. Фаза логарифмічного інкубаційного зростання — йде інтенсивне ділення клітин. Триває ця фаза близько 5 годин. За оптимальних умов бактерійна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

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

Додаток 1

Граф логічної структури теми:

Фізіологія мікроорганізмів. Культивування анаеробів



Додаток 2.

Зразок протоколу
до практичного заняття № 6

Фізіологія мікроорганізмів. Культивування анаеробів

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

Середовища	Приклади мікрорганізмів	Назва середовища
елективні		
диференціально-діагностичні		
основні		

Завдання 2. Техніка приготування поживних середовищ.
а) pH МПБ визначається за допомогою _____
перевірка показала pH _____, що означає МПБ (придатний/непридатний) для використання
pH можна виправити _____
б) для приготування щільного (5%) поживного МПА на _____ чашок Петрі (по 20 мл на чашку) потрібно _____ г агар-агару, та _____мл МПБ
в) для приготування напіврідкого (0,5%) середовища Гіса на _____пробірок (по 2 мл на пробірку) потрібно г агар-агару, та _____мл пептоної води

Завдання 3. Виділення чистої культури анаеробів:
а) Таблиця 2. Середовища та методи культивування анаеробів

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

б) умови посіву анаеробів_____

в) ознаки росту, вигляд колоній _____

Дата _____ Підпис викладача _____

Практична робота № 7

Тема: Мікробіологічні основи стерилізації та дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації.

Актуальність теми: Виконання правил асептики й антисептики, стерильність використовуваного інструмента і матеріалів є одним з найважливіших вимог у роботі лікаря будь-якої спеціальності. Застосовувані в кожнім випадку методи асептики, антисептики, дезінфекції і стерилізації будуть ефективні, якщо вони обрані з урахуванням механізму впливу фізичних і хімічних факторів на мікроорганізми, стійкості бактерій до цих факторів.
Мета(загальна):уміти використовувати методи асептики, антисептики і дезінфекції, пояснювати принципи роботи апаратури для стерилізації, визначити ефективність стерилізації та дезінфекції.
Конкретні цілі - уміти:
1.Пояснювати дію фізичних та хімічних факторів на мікроорганізми.
2. Вибирати оптимальні методи знезараження для інструментів, поживних середовищ, лабораторного посуду тощо.
3. Пояснювати устрій та принципи роботи автоклаву, сухожарової шафи, бактеріальних фільтрів.
4. Пояснювати суть та призначення дрібних методів стерилізації.
5. Контролювати якість стерилізації за допомогою плавких індикаторів, тест - культур та контрольних посівів.
Вихідний рівень знань — умінь:
1. Пояснювати залежність температури кипіння рідини від тиску (кафедра фізики).
2. Пояснювати зміни у структурі білків під дією високої температури. Дію ультрафіолету на ДНК (кафедра біохімії).
3. Вміти розраховувати концентрацію розчинів (кафедра хімії).
Для, того щоб ви могли уяснити, чи відповідає вихідний рівень Ваших знань -умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:
Завдання 1. Яка залежність температури кипіння рідини від тиску? А.Лінійна В.Квадратична С.Обернено-пропорційна залежить Е.Немає вірної відповіді
Завдання 2. Чи зміниться структура білків під дією високої температури?
А.Так,крім первинної
В.Так,крім вторинної
С.Ні,крім первинної
Б.Не зміниться
Е.Природну властивість білка повернути неможливо
Завдання 3. Концентрація розчинів це:
А.Маса речовини, яка може розчинитись у 100 г розчинника
В.Скільки грамів розчиненої речовини міститься в 100 гр розчину
С.Скільки молей розчиненої речовини міститься в 1 л розчину
Б.Вміст розчиненої речовини в об'єму розчину або одиниці маси

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

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

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

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

1. Механізм дії на мікроби високих і низьких температур, тиску, ультразвуку, різних видів променистої енергії, pH, pO, pCO_2, осмотичного тиску і різних груп хімічних сполук.
2. Поняття про стерилізацію і її види.
3. Однократні, дрібні і комбіновані способи стерилізації.
4. Сучасна апаратура для стерилізації.
5. Поняття про асептику і її зміст.
6. Поняття про антисептику. Розробка наукових принципів антисептики (І. Земельвейс, Д. Лістер).
7. Поняття про дезінфекції і її зміст.
8. У чому полягає відмінність понять асептики, антисептики, стерилізації і дезінфекції, хоча всі вони спрямовані проти мікроорганізмів?
9. Як визначити ефективність стерилізації, асептики, антисептики і дезінфекції?

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

Матеріали та обладнання: автоклави, пальники, піч Пастера, ульрафіолетові лампи, бактериальні фільтри, індикатори плавління, дезинфікуючи розчини, лабораторний посуд, поживні середовища, дрібний металевий інструмент.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

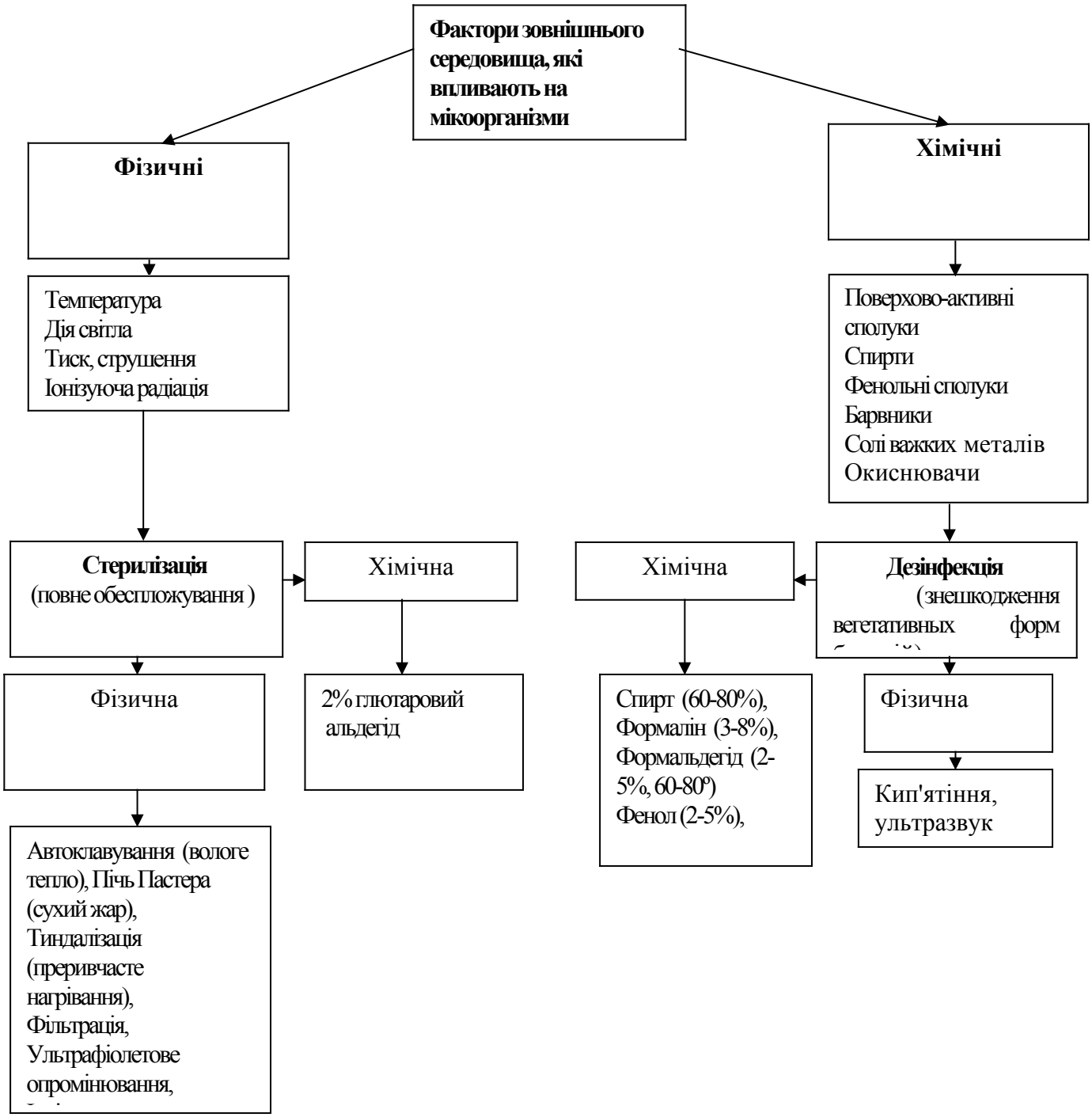
1. Ознайомитися з апаратурою, яка використовується для стерилізації проточним паром, паром під тиском, сухим жаром. Відмітити у протоколі, які саме об'єкти стерилізують кожним з цих методів, як їх готують до стерилізації.
2. Вивчити правила і техніку стерилізації бактеріологічних петель і голок, дрібного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

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

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

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

Граф логічної структури теми:
Мікробіологічні основи стерилізації та дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації.



Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 7

Мікробіологічні основи стерилізації і дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації.

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

_____
_____
_____

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

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

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

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

Завдання № 4. Котроль якості стерилізації та дезинфекції

Назва методу	Приклади

Дата_____ Підпис викладача _____

Практична робота № 8

Тема: **Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів. Бактеріофаги.**

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

1. У класифікації вірусів використовуються такі таксони: порядок, родина, підродині, рід, вид. Таксони більш високого рівня для вірусів не визначені. Які це таксони?

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

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

Матеріали та обладнання: таблиці:"Морфологія вірусних часток", "Схема побудови Т-парного бактеріофага", "Взаімодія вірусу з клітиною", чашки для дослідження по якісному визначенню фагів, суточна бульонна культура E.coli, готові чашки, які засіяні культурою бактерій для титруванню по Граціа, культури стафілококів, типові стафілококові бактеріофаги.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1.Вивчити морфологію й ультраструктуру віріонів за таблицями, як приклад занести до протоколу схему побудови Т-парного бактеріофага та вірусу грипу. Порівняти їхню структуру.

2. Визначити титр бактеріофага за методом Граціа шляхом підрахунку негативних колоній на готових чашках, засіяних 0,5мл культури бактерій та тієй же кількістю розведеннь бактеріофага (до 10^{-7}). Після виявлення та підрахунку кількісті негативних колоній визначити кількість фагових часток у 1 мл досліджуваного матеріалу з урахуванням розведення.

3. Провести дослідження з якісного визначенню фагів, для чого на чашку, яка була засіяна добовою бульйонною культурою E.coli, нанести каплю фага. Чашку нахилити для стікання рідини до протилежного боку. Після інкубації врахувати результати (по наявності зон лізісу бактериальної культури). Схематичний малюнок занести до протоколу, зробити висновок про здатність виділеного фага розмножуватися у клітинах тест-культури.

4. Визначити фаготип культури стафілококів, виділених від хворого з гнійними після-операційними ранями і з носоглотки медсестри перев'язної для встановлення джерела інфікування.

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

1. З випорожнень хворого виділена дизентерійна паличка. З метою підтвердження приналежності культури до шигел необхідно визначити здатність культури лізуватися полівалентним дизентерійної фагом. Як це перевірити?

2. У лабораторію надійшла вода з ріки Дніпро для визначення можливої присутності у воді фекальних кишкових паличок. Необхідно визначити наявність фагів бактерій групи кишкових паличок. Який метод дослідження варто застосувати з цією метою? Які інгредієнти необхідно підготувати для цього?

Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 8

Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів.

Завдання 1. Морфологія та ультраструктура вірусів.

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

Умовні позначення:

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

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

Досліджуваний матеріал_____

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

Висновок : титр бактеріофага _____ .

а) вид збоку

б) вид зверху

Умовні позначення:

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

Завдання 3. Індикація бактеріофагу якісним методом

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

Завдання 4. Визначення джерела стафілококової інфекції методом фаготипування.

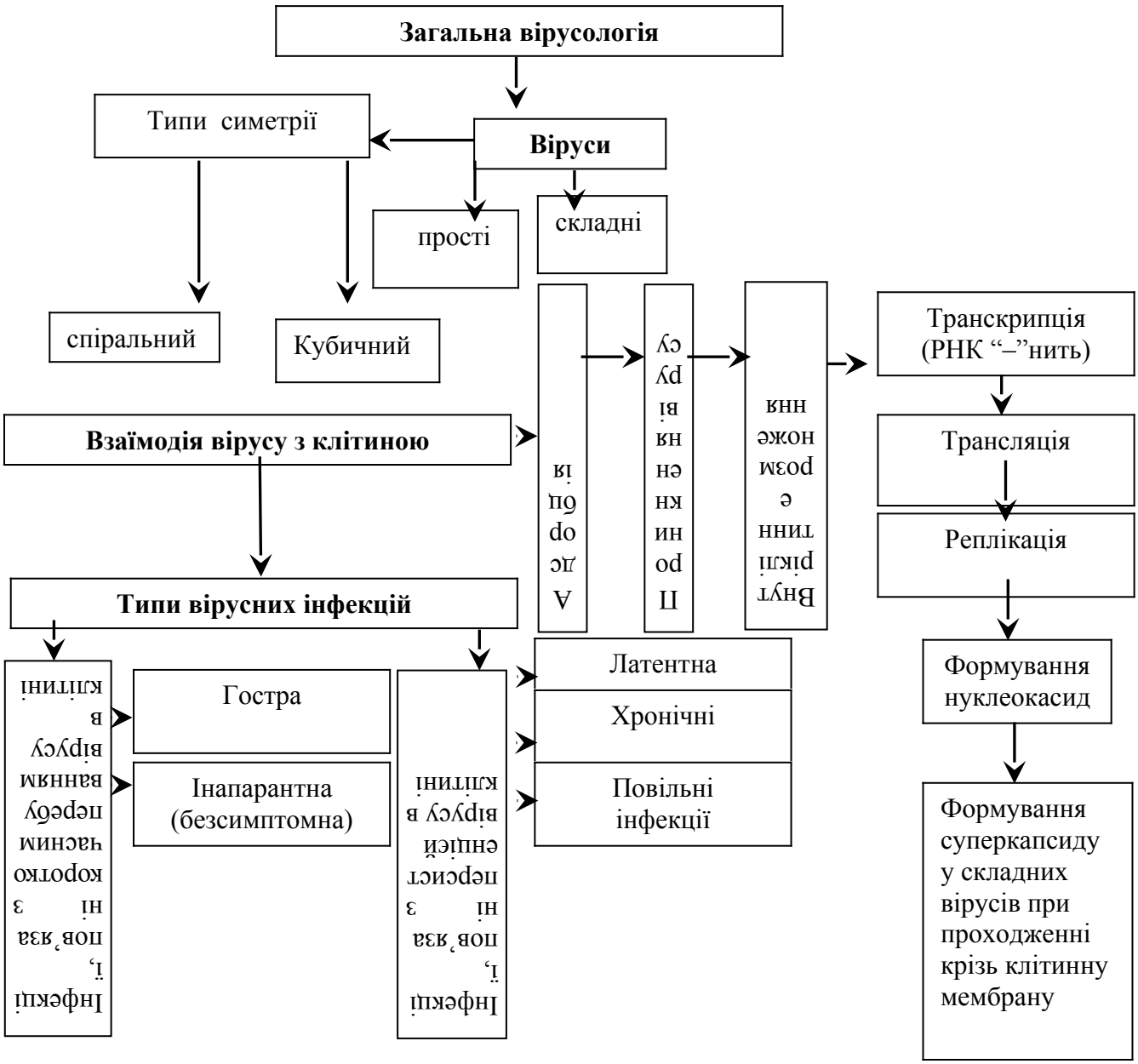
Висновок: культури стафілококів, виділені від хворих мають фаготип _____, культура стафілококів, виділена від медсестри має фаготип_____ . Це означає, що _____ .

Дата_____ Підпис викладача _____

Додаток 2.

Граф логічної структури теми:

Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів.



Практична робота № 9

Тема: **Методи культивування та індикації вірусів**

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

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

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

1. Биология / Под ред.В.Н.Яригина. М. Высшая школа. – 2006., 431с.
2. Биохимия /Под ред. акад. А.Баєва М: Изд.Мир, 1976. С.21-43.
3. Биохимия/ Под ред. А.Николаева. М., 2004. С.118-138.
4. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 1994. С. 68-70, 201-205.
5. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.- М.:Медицина.-2002.-725с.

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Вивчити метод культивування вірусів на курячому ембріоні, способи зараження курячих ембріонів. Схематичні малюнки занести до протоколу. Провести зараження курячого ембріону в хоріоналантоїсну порожнину шляхом введення шприцем вірусутримуючого матеріалу у обємі 0,1-0,2 мл на глибину 2-3 мм нижче границі повітряної камери. Отвір, який було зроблено ножицями (після обеззаражування шкарлупи), з метою внесення матеріалу, по закінченню експерименту заливають парафином. Инкубують 48-72 г, після чого шкарлупу обеззаражують, вскривають, знимають хоріоналантоїсну оболонку та вивчають на наявність пошкоджень – геморагій, білих очагів (бляшок). Хоріоналантоїсну рідину відсмоктують пипеткою для подальших досліджень.
2. Визначити титр вірусу в хоріоналантоїсній рідини зараженого курячого ембріона за допомогою реакції гемаглютинації. Для чого зробити кратні розведення ХАР, розлити по 0,5мл у лунки плексигласових пластин, додавши

по 0,2мл 1% суміши курячих еритроцитів. Врахувати готову реакцію (парасолька - гудзик), результати занести до протоколу.

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

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

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

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

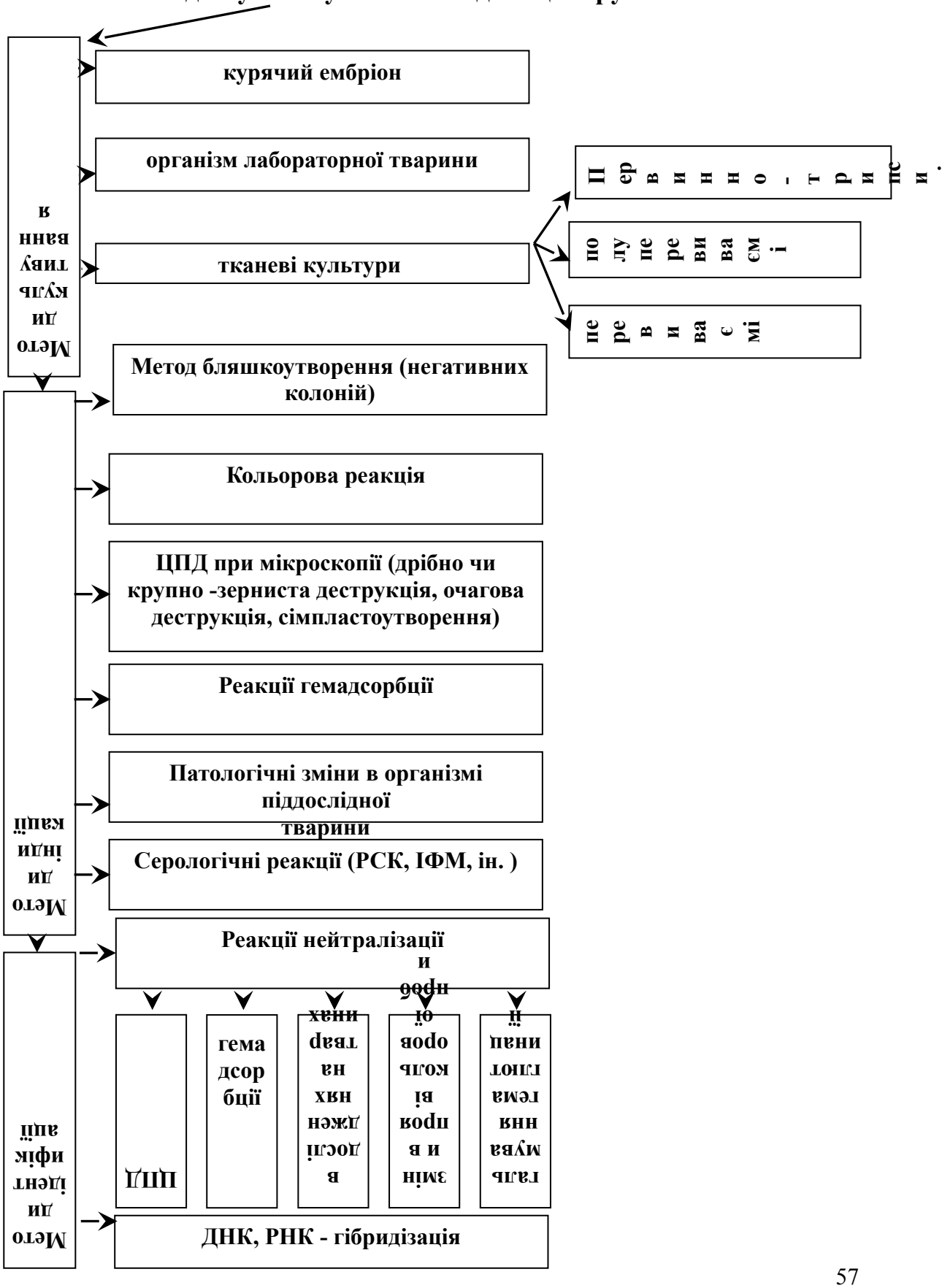
1. Для проведення вірусологічних досліджень в обласному центрі організована вірусологічна лабораторія. Які культури клітин слід підготувати для виділення вірусів?

2. До лабораторії надійшов матеріал (змив з носоглотки) від хворого з підозрою на грип. Який біологічний об'єкт варто використовувати для виділення вірусу? Яке матеріальне оснащення необхідно забезпечити для проведення дослідження?

Додаток 1

Граф логічної структури теми:

Методи культивування та індикації вірусів



Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 9

Методи культивування та індикації вірусів

Завдання 1. Культивування вірусів у курячому ембріоні.

Мал.1. Схема зараження курячого ембріона

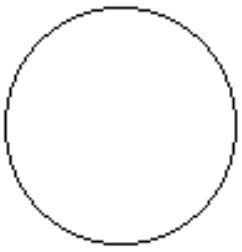
Умовні позначення:

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

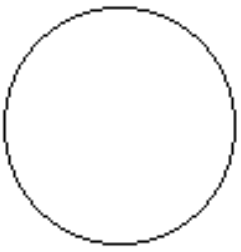
Досліджуваний матеріал	розведення						контроль
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
ХАР							

Висновок: у хоріоналаноїсній рідині виявлено_____ , титр вірусу _____ .

Завдання 3. Клітинні культури для культивування вірусів

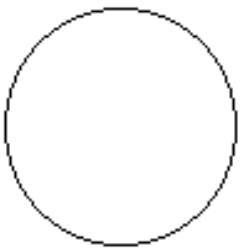


Мал.2. Первинна культура

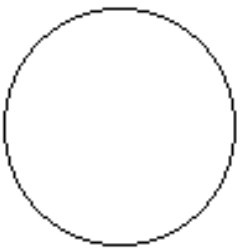


Мал.3. Перещеплювана культура

Завдання 4. Індикація вірусів за ЦПД



Мал 4.



Мал. 5.

Завдання 5. Інші методи індикації вірусів на клітинних культурах:

Назва методу	Ознаки розмноження вірусу

Дата_____ Підпис викладача _____

Практична робота № 10

Тема: Генетика мікроорганізмів.

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

Завдання 1. Які речовини є носіями спадкової інформації у клітинних форм життя? а) нуклеотиди; б) білки – гістони; в) і- РНК, г) ДНК; д) азотисті основи.
Завдання 2. Які з вказаних хімічних сполук є складовими молекул ДНК? 1- лактоза, 2- рибоза, 3-фосфорна кислота, 4- ізолимонна кислота, 5-аденін, 6- цитозин, 7- урацил, 8- лігаза.
Завдання 3. Від чого залежить фенотип будь-якого організму?
Завдання 4. Як відрізнити спадкову мінливість від неспадкової?
Завдання 5. Які з названих фізичних чинників мають мутагенну дію? 1- УФ-випромінювання, 2- альфа- випромінювання, 3- гама- випромінювання, 4- різкі коливання температури, 5- вібрація, 6- високий тиск.

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

1. Биология /под ред. В.Н.Яригина.- М.: Высшая школа.- 2004.
2. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. Биологическая химия.- М.: Медицина.- 1998.

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

1. Генотип і фенотип бактеріальної клітини. Модифікаційна мінливість у мікроорганізмів.
2. Збереження та передача спадкових ознак у бактерій. Генетичний апарат прокаріотної клітини. Карти хромосом, "генетичні маркери".
3. Поняття про плазміди. Їхні види й основні властивості, біологічне значення.
4. Види мутацій. Мутагени. Поняття про репарації в клітинах бактерій. Практичне використання бактерій-мутантів.
5. Поняття "генетична рекомбінація". Фізіологічне значення явища.
6. Трансформація. Механізм. Поняття про стан компетентності.
7. Трансдукція. Механізм. Поняття про трансдукуючі фаги. Лізогенія та лізо-генна конверсія.
8. Кон'югація. Механізм. Поняття про фертильність.
9. Генна інженерія, її методи та досягнення.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005.С. 92-118.
2. Воробьев А.А.и др. Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 81 - 104.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 68-75.
4. Лекція "Генетика мікроорганізмів".
5. Броду П. Плазмиды. М.: Мир, 1984.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 - С.105-123.
7. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 392-404, 415-418.

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

Матеріали та обладнання: таблиці: „Трансформація”, „Кон‘югація”, „Трансдукція”, чашки Петрі з МПА, з елективними середовищами, диски з антибіотиками, диски з фенілаланіном і досліджуваними сироватками, культури S.aureus, B.subtilis, S.sonne, E.coli.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

1. Як довести, що ознака, виявлена у культури бактерій, є спадковою?

2. Як визначити частоту рекомбінацій у дослідах кон'югації і трансдукції?

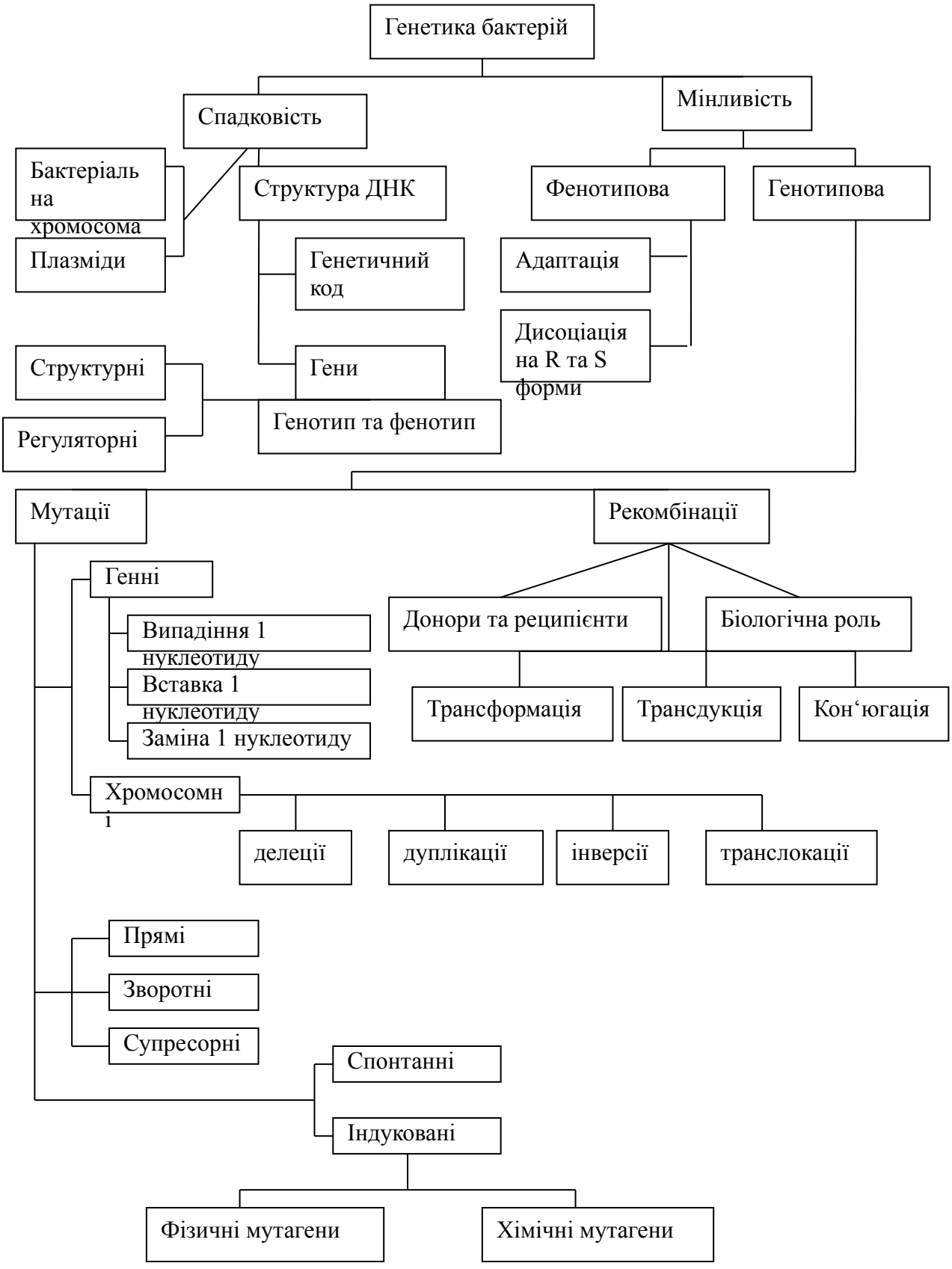
3. Що таке ауксотрофні мутанти і як вони можуть бути використані?

4. Як можна використовувати коліцинотипування з метою епідеміологічного аналізу?

5. Для постановки досліду трансдукції використовувалася культура E.coli lac- і вірулентний фаг, отриманий на культурі E.coli lac+. На живильному середовищі, яке містить лактозу як єдине джерело вуглецю, ріст колоній трансдуктантів не виявлений. Як це можна пояснити?

Додаток 1

Граф логічної структури теми «Генетика бактерій»



Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 10

Генетика бактерій

Завдання 1. Виявлення антибіотикорезистентних мутантів S.aureus.
Врахування чутливості до антибіотиків за діаметром зони затримки росту навколо стандартних дисків, які містять
пеніцилін_____ мм стрептоміцин_____ мм тетрациклін _____ мм
У зоні затримки росту навколо диска з _____ спостерігається ріст одиничних колоній, які є _____ до цього антибіотика.
При відсіві цих колоній на середовище з антибіотиком культура _____. Це означає, що признак стійкості до антибіотика _____ .
Завдання 2. Мікробіологічний метод діагностики фенілкетонурії.

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

Мал. 1. Схема постановки досліду

Висновок:_____
Завдання 3. Дослідження трансдукції гену ***lac*** у кишкової палички.
Штам-донор _____
Штам- реципієнт _____
Спосіб переносу донорської ДНК у клітину реципієнта _____
_____
Елективне середовище для виявлення рекомбінантів _____
Колонії реципієнта _____, колонії рекомбінантів _____
Частота трансдукції:_____
Завдання 4. Дослідження переносу гену *ley+* при кон'югації.
Штам-донор _____
Штам- реципієнт _____
Спосіб переносу донорської ДНК у клітину реципієнта _____
_____
Середовище для підрахунку загальної кількості живих клітин _____, кількість колоній _____
Елективне середовище для виявлення рекомбінантів _____
_____ кількість колоній _____.
Штам-донор на ньому не росте, тому що _____ ,
а штам- реципієнт не росте, тому що _____
Частота рекомбінації _____
Завдання 5. Визначення коліцинотипа збудника дизентерії прискореним методом за 3 еталонними коліциногенними штамами кишкової палички.

Умовні позначення:
Посіви еталонних штамів
1).$K_{12,}$ 2).B, 3)G
4)ріст досліджуваної культури навколо еталонних штамів

Мал. 2. Схема постановки досліду

Висновок:_____

Дата_____ Підпис викладача _____

Практична робота № 11

Тема: Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики.

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

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

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

Конкретні цілі:

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

Базовий рівень знань - умінь:

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

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

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

Завдання 2.Поясніть будь ласка характерні морфологічні особливості актиноміцетів.

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

Завдання 4. Різниця будови прокариотичної клітини від еукариотичної.

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

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Познайомилися з основними властивостями хіміотерапевтичних препаратів:

а) нешкідливість (визначається по хіміотерапевтичному індексу)

$$XTI = \frac{\text{min терапевтична доза}}{\text{мах переносима доза}} < 1$$

якщо індекс < 1, препарат може бути використаний для лікування, якщо > 1, то введення препарату буде супроводжуватися токсичними явищами.
Користуючись таблицями, розрахувати XTI для двох антибіотиків. Визначити який з них меньш шкідливий.

б) виборча дія на мікроорганізми (антимікробний спектр).

За допомогою таблиці навести приклади антибіотиків кожної групи (2-3) назви.
- на Гр - бактерії;
- на Гр + бактерії;
- на патогенні гриби і т.і.

в) бактеріостатична дія – пригнічення росту і розмноження мікробів;
бактеріцидна дія – викликає загибель бактерій;

Записати до протоколу назви антибіотиків кожної групи.

г) формування лікарсько-стійких форм мікроорганізмів**.**

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

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

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

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

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

Навчальні завдання:

1. У хворого на підставі огляду встановлений попередній діагноз – „піодермія”. Які попередні дослідження необхідно призначити перед антибіотикотерапією ?

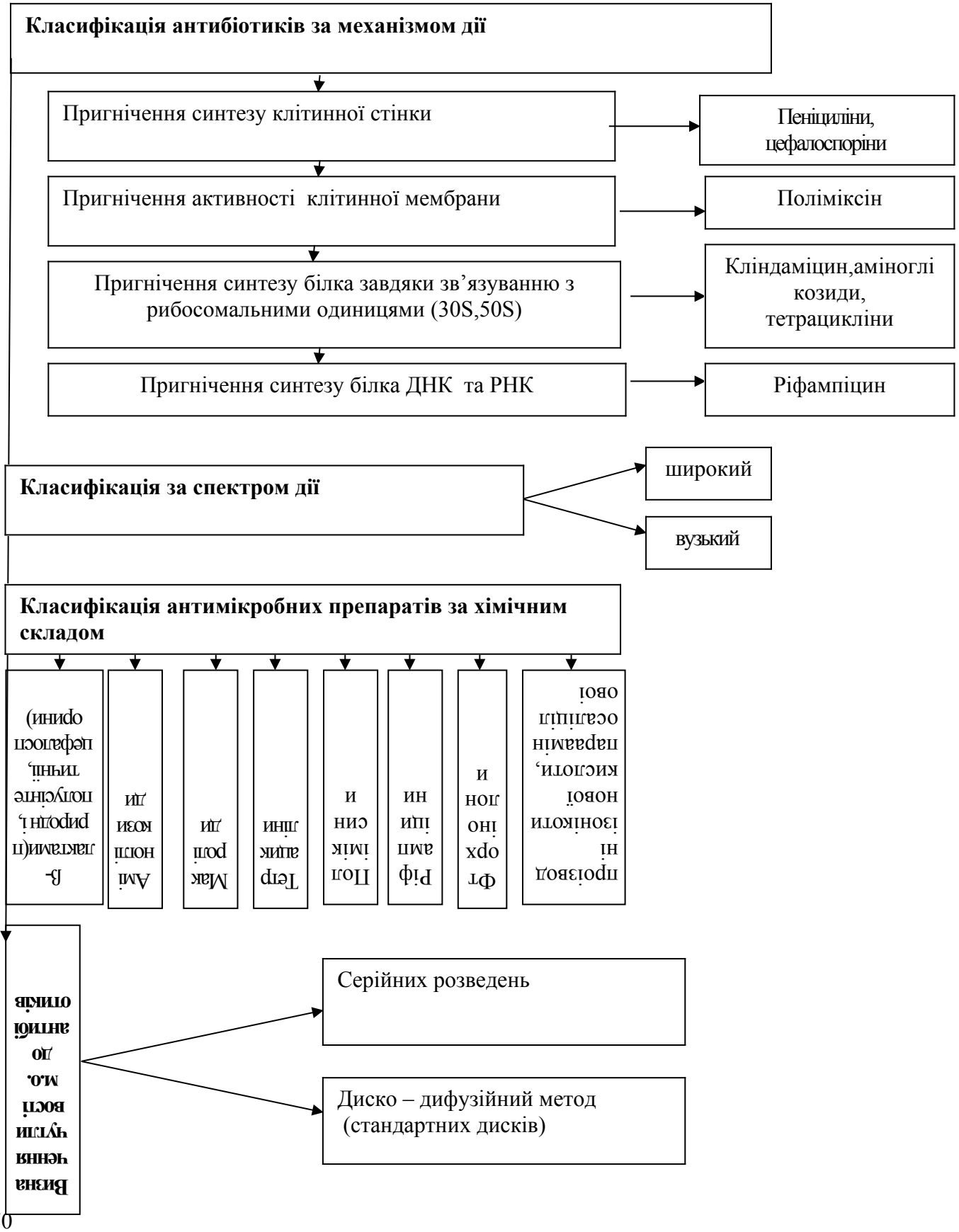
2. З крові хворого з клінічним діагнозом „сепсіс” виділена культура клебсієли. МПК полімексіну у МПБ складає 7 мкг/ мл . Яку дозу антибіотика на добу необхідно вводити хворому?(таблиці у „додатку”).

3. У післяопераційних хворих хірургічного відділення в 55% випадків загоєння ран ускладнюється нагнійними процесами. Які дослідження необхідно провести, щоб виявити джерело захворювання?

Додаток 1.

Граф логічної структури теми:

Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики.



Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 11

Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики

Завдання 1. Познайомилися з властивостями хіміотерапевтичних препаратів
1. Нешкідливість для людини
Назви антибіотиків:
1.
2.
ХТІ (1)= ; ХТЇ(2)= .
Менш шкідливий є -
2. Виборча дія на мікроорганізми (антимікробний спектр):
- на Гр – бактерії_____
- на Гр + бактерії _____
- на патогенні гриби _____
- на найпростіші _____
3. Бактеріостатична дія чи бактеріцидна дія
бактеріостатична _____
бактеріцидна дія _____
4. Формування лікарсько-стійких форм мікроорганізмів _____
_____

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

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

Назва бактерій	Назва антибіотиків				
Зона затримки росту					
S.aureus					

Висновок: для лікування хворого рекомендовано антибіотики
_____
_____ , тому що _____

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

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

(+) – ріст мікробів
(-) – затримка росту
Висновок: затримка росту S.aureus спостерігається при концентрації бензілпеніциліну мкг / мл. Отже, МПК антибіотика.

Завдання 4. Визначення антибіотика (тетрацикліну) у крові

Облік дослідження (тест-мікроб) - S.aureus

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

Облік: (+) – ріст мікробів

(-) – затримка росту

Висновок: _____

Дата _____ Підпис викладача _____

Таблиця 1

Мінімальні пригнічуючі концентрації антибіотиків.

Антибіотики	Вміст антибіотика в диску, мкг	МПК, мкг/мл	
		стійкі	чутливі
Бензілпеніцилі	6	-	0,1
Ампіцилін	10	-	0,2
Карбеніцилін	25	32	16
Метіцилін	10	_	3
Оксацилін	10	-	3
Цефалексін	30	32	10
Цефалотін	30	32	10
Стрептоміцин	30	15	6
Неоміцин	30	-	10
Канаміцин	30	25	6
Мономіцин	30	-	10
Гентаміцин	10	6	4
Рістоміцин	30	-	5
Сизоміцин	10	6	4
Тетрациклін	30	12	2
Доксициклін	10	12	2
Еритроміцин	15	8	2
Лінкоміцин	15	8	2
Левоміцетин	30	15	8
Рифампіцин	5	8	2
Фузидін	10	16	2
Поліміксін	300 ОД	50ОД/мл	

Таблиця 2

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

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

Таблиця 3

Зміна концентрації антибіотиків у крові в залежності від застосованих доз.

Антибіотик	Середньо - добова доза	Метод введення	Концентрація антибіотика в крові, мкг/мл	Максимальна добова доза	Метод введення	Концентрація антибіотика в крові, мкг/мл
Бензілпеніцилін	500000 ОД	**в/м**	0,5 ОД/мл	500000 ОД натрієвої чи калієвої солі	в/м	5 ОД/мл
Еритроміцин	**1,5**	per os	5	1,5	**в/в**	15
Олеандоміцин	2,0		2	2	**-//-**	5
Новобіоцин	1,5	-//-	20	3	per os	40
Тетрациклін	1.0	-//-	2	2	**в/в**	10
Левоміцетин	2,0	-//-	15	-	**-**	-
Стрептоміцин	1,0	**в/м**	10	3	**в/м**	30
Канаміцин	1,0-1,5		20	2	**-//-**	40
Поліміксін В	0.1-1,5	**-//-**	1-2.5	0,2	**-//-**	4-8

Практична робота № 12

Тема: Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробіотики.

Актуальність теми.Організм людини колонізований більш 500 видами мікроорганізмами, що складають його нормальну мікрофлору. Вони знаходяться у стані рівноваги (еубіоз) між собою та з організмом людини. Порушення цієї рівноваги небезпечно для нашого організму тому, що нормальна мікрофлора виконує ряд найважливійших функцій, які забезпечують стабільність внутрішнього середовища організму. Тому знання ролі нормофлори людини є важливим питанням сучасної медицини.

Мета (загальна): уміти оцінювати стан порушень в мікробіоценозах організму людини, вміти корегувати ці порушення за допомогою антибіотиків та пробіотиків.

Конкретні цілі – уміти:

1. Пояснювати роль нормальної мікрофлори організму людини у захисті організму від агресивних агентів зовнішнього та внутрішнього середовища.
2. Описувати мікрофлору різних біотопів організму людини у нормі та при патологічних процесах.
3. Характеризувати методи діагностики та корекції порушень у мікробіоценозах організму людини.
4. Пояснювати механізми дії та сферу застосування пробіотиків.

Базовий рівень:

1. Визначати стерильні та нестерильні порожнини організму людини (кафедра анатомії).
2. Трактувати антагонізм як біологічне явище (кафедра медичної біології).
3. Пояснювати роль ферментів у процесі травлення (кафедра біохімії).
4. Оцінювати роль вітамінів як регуляторів у метаболізмі (кафедра біохімії).

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

Завдання 1. Назвіть порожнини людини, де мікробіоценоз представляє наявність найрізноманітних бактерій.

Завдання 2. На підставі чого роблять висновок, що даний мікроорганізм має найбільш антагоністичну властивість ніж інші?

Завдання 3. Як називаються ензими, які розщепляють жири?

Завдання 4. Стан організму при недостатній кількості вітамінів.

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

1. Привес М.Г., Лисенко Н.И., Бушков В.И. Анатомия человека.-М.: Медицина.- 2001.
2. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология, цитология и эмбриология.-М.:Медицина.-2002.-725 с.
3. Березов Т.Т.,Коровкин В.Ф.Биологическая химия.-М.:Медицина.-2001.
4. Слюсарев А.А., Жукова С.В. Биология с общей генетикой. – М.Медицина. 1987.

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

1. Поняття про нормальну мікрофлору: її роль та функції в організмі.
2. Поняття про біотоп, мікробіоценоз мікроекологічної системи організму людини.
3. З призвищами яких вчених пов'язане навчання про нормальну мікрофлору.
4. Гнотобіологія.ЇЇ значення в медичній мікробіології та імунології.
5. Поняття про біотехнологію.
6. Автохтонна та аллохтонна мікрофлора тіла людини.
7. Мікрофлора шкіри, дихальних шляхів, травної та сечостатевої систем.
8. Динаміка нормальної мікрофлори в онтогенезі людини.
9. Поняття про колонізаційну резистентність та її роль в інфекційній патології.
10.Дисбактеріоз (умови виникнення, наслідки розвитку, класифікація за збудником та локалізацією).
11.Методи діагностики, санації, корекції дисбактеріозів.
12.Еубіотики та пробіотики – препарати для відновлення нормальної мікрофлори організму людини. Механізм дії.
13.Наукова проблема кафедри мікробіології ДДМА.

Література для засвоєння знань-умінь за данною темою:

1. Медицинская микробиология , вирусология и иммунология/ Под ред.Л.Б. Борисова, М.:Медицина, 2005.-С.121-129, 136-148.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.67-70, 190.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Л.Б.Борисова, М.: Медицина,1984.- С.79-81.
4. Матеріали лекції з теми "Нормальна мікрофлора організму людини".
5. Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Вальчук С.И. Роль микроэкологии организма человека и принципы ее коррекции.- Днепропетровск: Пороги.- 2003. – 230 с.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 88-93, 303.
7. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – Киев: ТОВ "Червона рута – Турс" – 2008. – С. 21-188.

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми „Нормальна мікрофлора організму людини." (додаток 1).

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з МПА, Ендо, Сабуро, суміш S.aureus, Vibrio, А-бактерін (ампули, флакони) та інші пробіотики.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Ознайомитися із морфологією мікроорганізмів.які складають нормальну мікрофлору нестерильних порожнин тіла людини:

а) вивчити пофарбовані мазки з морфології представників нормальної мікрофлори людини: лактобактерій, бифідумбактерий, кишкової палички. Визначити морфологічні ознаки цих мікроорганізмів. Малюнки занести у протокол.

б) приготувати та пофарбувати мазки з зубного нальоту за методом Грама. Замалювати мікроорганізми ротової порожнини. Звернути увагу на різноманіт-

ність бактерій. Порівняти отриманий мазок із тим, що зображений на таблиці "Мікрофлора зубного нальоту", визначити мікроорганізми, що спостерігаються.
в) приготувати та пофарбувати мазки з харкотіння за методом Грама.
Замалювати мікроорганізми дихальних шляхів. За допомогою таблиці визначити, до якої морфологічної групи вони належать.

2. Розібрати методику дослідження мікробного пейзажу кишечника:

а) для виявлення патогенних ентеробактерій досліджуваний матеріал засівають на середовище Ендо, Плоскірьова, вісмут-сульфітний агар.

б) з розведення 10^{-3} 0,1 мл засівають на середовище Сабуро, для виявлення мікроорганізмів р.Candida та на ЖСА для виявлення стафілококів.

в) з розведення 10^{-5} 0,1 мл засівають на середовище Ендо і на 5% кров'яний агар для виділення і кількісного обліку умовно-патогенних ентеробактерій, кокової групи, гемолітичних форм.

г) з розведення 10^{-5}, 10^{-7},10^{-9} по 0,1 мл засівають на середовище Блоурока, гідролізатно-молочне середовище чи інші подібного складу середовища для виявлення біфідобактерій.

д) для кількісного визначення лактобактерій по 1 мл з цих же розведень засівають на середовище МРС-3.

Критерії оцінки дисбактеріозу кишечника:

1) Виявлення біфідобактерій у розведеннях нижче ніж 10^{-8} ступеню чи повна їх відсутність.
2) Теж саме у відношенні лактобактерій.
3) Збільшення кількості лактозонегативних і повільнозбражуючих ешеріхій – більш 10% від загальної їхньої кількості.
4) Поява гемолітичної флори, яка відсутня у здорової людини.
5) Виявлення умовно-патогенних ентеробактерій понад 10^{-4} на 1г фекалій (протей, клебсієла, цитробактер та ін.).
6) Виявлення золотистого стафілококу.
7) Виявлення грибів р.Candida більш ніж 10^{-3} на 1г фекалій.
8) Зниження чи різке підвищення кількості кишкової палички на 1г фекалій.

Для дисбактеріозу характерно сполучення декількох показників зміни мікрофлори і виникнення нових їх асоціацій в динаміці захворювання.
Розглянути запропоновані результати аналізів на дисбактеріоз кишечника.
Визначити у протоколі ступень дисбактеріозу для кожного випадку.

Таблиця 1.

Ступені дисбактеріозу.

Ступінь дисбакте-ріозу	Вміст облігатних анаеробів (Bifidobacterium, Bacteroides)	Вміст факультатив. анаеробів та аеробів Lactobacillus, Escherichia	Клінічні прояви
1	без зміни у нормі (10^{-8} та вище на 1г фекалій)	незначне підвищення або зниження	норма
2	незначне зниження (до	зниження Lactobacillus	незначна

	10^{-7} та нижче)	(10^{-5} та нижче)	диспепсія
3	- значне зменшення анаеробів ($^{10-6}$); - значне підвищення атипових E.coli (гемолітичні та лактозонегативні); -колонізація біотопа одним з умовно-патогенних микробів (Klebsiella, Proteus, Staphylococcus, Candida, Clostridium)		Понос, погане травлення та засвоєння їжі
4	-зниження захисної анаеробної та аеробної мікрофлори (нижче 10^{-4}), -колонізація біотопа кількома видами умовно-патогенною мікрофлорою, -поява у кишечнику патогенних бактерій, -транслокація кишкової мікрофлори за межі біотопу.		Зниження імунітету, діарея, різке зниження ваги тіла, інфекції

3. Познайомитися з науковою проблемою кафедри, де створений новий пробіотик А-бактерін, що є препаратом подвійного призначення (застосовується зовнішньо та перорально). До складу його входять мікроби антагоністи з роду Aerococcus, виділенні з грудного молока (штам №167) з вираженою антагоністичною активністю за рахунок адгезії та продукції різних біологічно активних речовин. Стимулюють імунітет.

Області застосування:

- профілактика і лікування гнійно-запальних процесів шкіри та слизових оболонок;
- корекція дисбактеріозів;
- профілактика кишкових інфекцій та бактеріоносійства.

Вивчити антагоністичну активність виробничих штамів двох еубіотиків (Колібактеріну та А-бактеріну) шляхом посіву методом „штриха” на добові культури S.aureus та Vibrio-p 6078 на ПМА. Врахувати готові результати та занести їх до протоколу.

4. Розглянути запропоновані зразки біопрепаратів: „Колібактеріну”, ”Біфіколу”, ”Біфідумбактеріну”, ”Лактобактеріну”, ”Біоспоріну”,”А-бактеріну”. Заповнити таблицю, вказати, які мікроорганізми входять до складу пробіотиків. Ознайомитися з інструкціями щодо застосування їх у практиці.

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

1. До лікаря- педіатра на прийом звернулася матір дитини 1,5 роік з скаргами на те, що її дитина погано набирає вагу, дратівлива та страждає на періодичні проноси. Враховуючи, що місяць тому дитина пройшла курс антибіотикотерапії з приводу ангіни, лікар запідозрив дисбактеріоз. Які лабораторні дослідження необхідно призначити лікарю для встановлення діагнозу?

2. Після лабораторного обстеження фекалій у пацієнта виявлено значне зниження лакто- та біфідум бактерій. Які висновки можна зробити на підставі отриманих результатів? Оцініть статус хворого?

3. Із фекалій дворічної дитини висівається клєбсієла у кількості 10^{-5} на 1 г фекалій. Лікар призначив замісну терапію пробіотиками. Який пробіотик доцільно застосувати у даному випадку, якщо антагонізм „Лактобактеріна” по

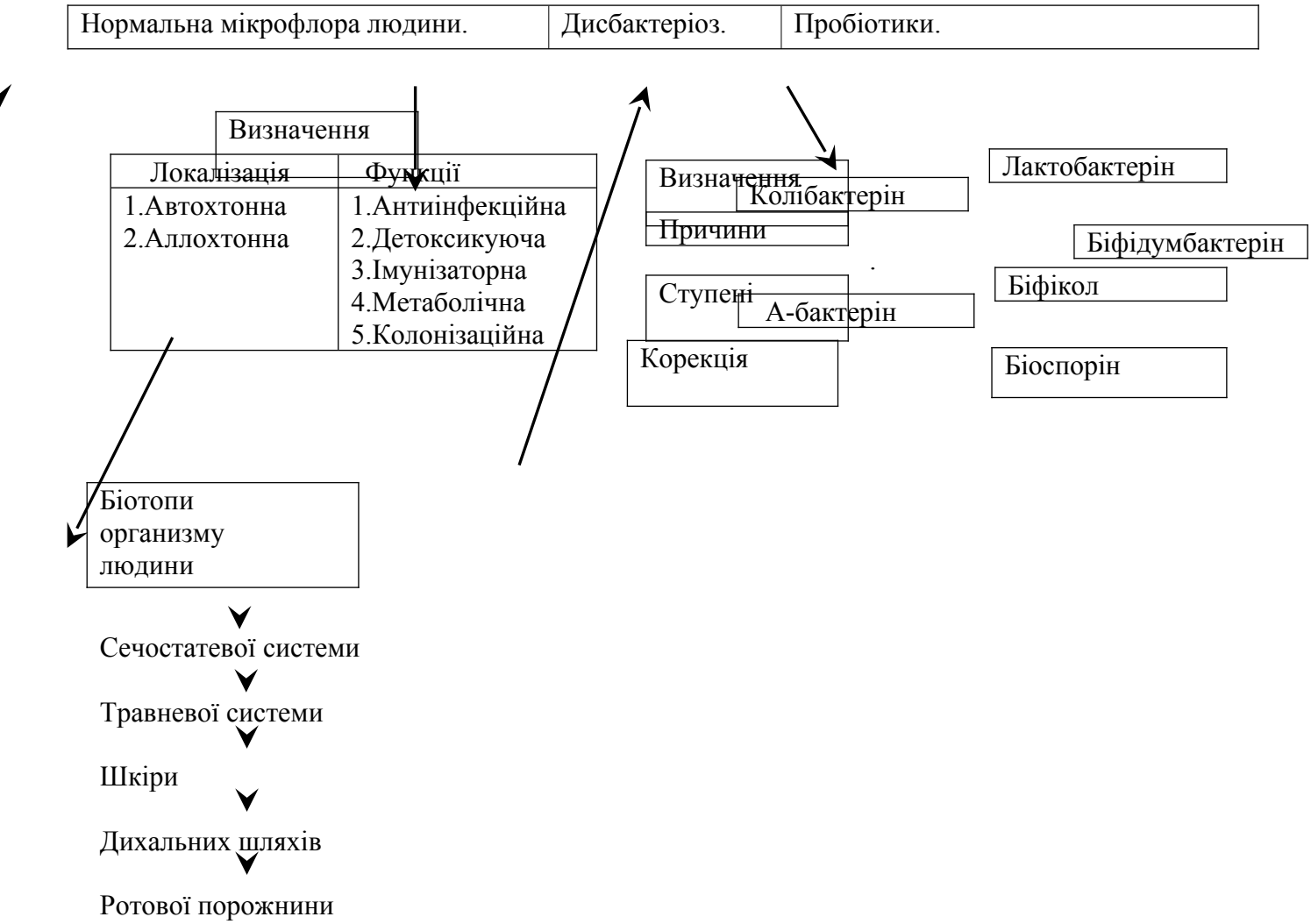
відношенню до клебсієли складає – 7 мм затримки росту, ”Колибактеріну” – 5 мм, ”А-бактеріну” – 14 мм?

4. На протязі тривалої антибіотикотерапії пацієнту було призначено застосовувати „Біоспорин”, а після „Лактобактерін”. Обгрунтуйте призначення пробіотиків у даному випадку.

Додаток 1.

Граф логічної структури теми:

Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробіотики.

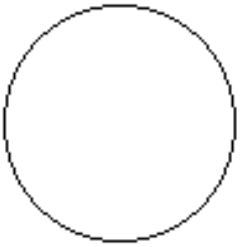


Додаток 2.

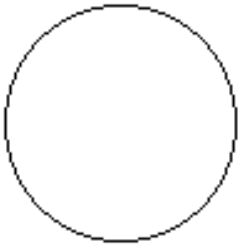
Зразок протоколу до практичного заняття № 12

Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробіотики.

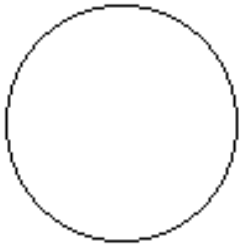
Завдання 1. Нормальна мікрофлора тіла людини.
а) морфології представників нормальної мікрофлори кишечника:



Мал.1 Лактобактерії

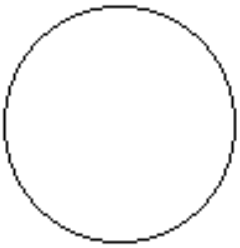


Мал.2 Біфідумбактерії

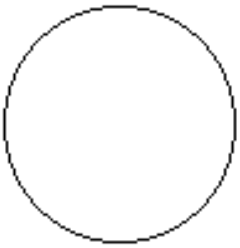


Мал.3 Кишкова паличка

б) морфології представників нормальної мікрофлори ротової порожнини та дихальних шляхів.



Мал.4 Мікрофлора зубного нальоту



Мал.5 Мікрофлора дихальних шляхів

Завдання 2. Досліджували кишковий мікробіоценоз (демонстрація)

№	Мікрофлора на 1г фекалій	Норма	П А Ц І Є Н Т И				
			1	2	3	4	5
1	Патогенні ентеробактерії	0	0	0	0	S.sonnei 10^{-3}	0
2	Біфідумбактерії	10^{-8} – 10^{-9}	10^{-9}	10^{-7}	0	10^{-7}	10^{-9}
3	Лактобактерії	10^{-8} – 10^{-10}	10^{-9}	10^{-6}	0	10^{-8}	10^{-5}
4	Загальна кількість кишкової палички	2.10^{-8}	1.10^{-8}	1.10^{-8}	2.10^{-5}	5.10^{-7}	4.10^{-7}
5	Кишкова паличка з слаб. ферм. властивостями	До 10%	2%	50%	40%	20%	10%
6	Гемолітична паличка	0	0	30%	80%	0	0
7	УПЕ (протей, клебсієла, цитробактер, псевдомонади)	До 10^{-4}	0	0	Клебсієла 10^{-5}	Протей 10^{-5}	Цитробактер 10^{-5}
8	Стафілокок сапрофітний, епідермальний	До 10^{-4}	10^{-3}	0	0	0	0
9	Стафілокок золотистий	0	0	10^{-5}	10^{-5}	0	10^{-4}
10	Гриби р.Candida	До 10^{-3}	0	0	10^{-5}	10^{-4}	0

Висновок: _____

Завдання 3. Познайомилися з науковою проблемою кафедри мікробіології, співробітники якої створили новий еубіотик А-бактерін.
Виробничий штам А-бактеріну _____

Його властивості _____
Області застосування _____

Завдання 4. Познайомилися з іншими пробіотичними препаратами. Вивчили антагоністичну активність E.coli M-17 (основа колібактеріну), A.viridans №167 (основа А-бактеріну).

Назви антагоністів	Затримки росту тест культур	
	S.aureus	Vibrio p-6078
E.coli M-17		
A.viridans №167		

Висновок: Більш вираженою антагоністичною активністю по відношенню S. aureus, Vibrio p-6078 є _____.

Завдання 5. Заповнити таблицю, вказати які мікроорганізми входять до складу пробіотиків

Назва пробиотика	Склад	Застосування
Колібактерін		
Біфідумбактерін		
Лактобактерін		
А-бактерін		
Біфікол		
Біоспорін		

Дата _____ Підпис викладача _____

Практична робота № 13

Тема: Санітарна мікробіологія

Актуальність теми. Концентрація населення у великих містах, розвиток промисловості і зростання промислових об'єктів призводить до наростання біологічного забруднення навколишнього середовища, стічних вод, відкритих водоймищ, грунту, а, також, в дещо меншому ступені, підземних вододжерел і атмосферного повітря. Тим самим створюються умови для циркуляції вірусів в об'єктах навколишнього середовища. Оскільки збереження життєздатності вірусів у воді, грунті, повітрі, харчових продуктах є одним з основних чинників, сприяючих розповсюдженню інфекції в сприйнятливих колективах, виникла необхідність вивчення патогенних для людини вірусів в об'єктах зовнішнього середовища. Цим займається санітарна вірусологія. Вивченням бактерій в зовнішньому середовищі здатних негативно впливати на здоров'я людини, займається санітарна мікробіологія.

В глобальній проблемі охорони навколишнього середовища велике значення має охорона водних ресурсів. Серед різних видів біологічного забруднення води особливе місце займає мікробне обсіменіння, оскільки вода може бути чинником передачі і розповсюдження не тільки бактерійних, але і вірусних інфекцій. Мікробіологічні дослідження необхідні не тільки для безпечного використовування відкритих водоймищ, а, також, охорони їх від забруднень, що потрапляють.

Серед чинників зовнішнього середовища, постійно впливаючих на людину, важливе місце займає і повітря, що має велике санітарно-епідеміологічне значення.

Останнім часом все гостріше встає проблема мікробіологічного зараження повітря, причиною якого є діяльність людини. Особливе значення привертає забруднення повітря підприємствами мікробіологічної промисловості, де необхідна для народного господарства продукція виходить шляхом використовування життєдіяльності різноманітних мікроорганізмів. Проте через недостатню герметичність процесів має місце надходження життєздатних мікроорганізмів і продуктів їх життєдіяльності в повітря виробничих приміщень. Велику небезпеку представляє повітря інфекційних і хірургічних лікарень, багатих патогенною і умовно-патогенною мікрофлорою. В цьому зв'язку при оцінці санітарного стану повітря різних закритих приміщень дуже часто доводиться вдаватися не тільки до визначення санітарно-показових мікроорганізмів, але і до безпосереднього виділення патогенних вірусів і бактерій. Особливо велике значення це має при розшифровці спалахів респіраторних інфекцій в дитячих установах і в стаціонарах лікувально-профілактичних установ.

Ціль (загальна): уміти давати гігієнічну оцінку якості води, грунту і повітря з погляду інфекційної безпеки для здоров'я людини.

Конкретні цілі: уміти

1. Трактувати властивості санітарно-показових мікроорганізмів.

2. Пояснювати роль води, грунту, повітря в розповсюдженні інфекційних захворювань.
3. Знаходити мікробне число і бактерії групи кишкових паличок (БГКП) в пробі питної води методом фільтрів мембран і бродильним методом.
4. Визначати мікробне число і кількість санітарно-показових мікроорганізмів повітря седиментацією і аспіраційним методами.
5. Використовувати бактеріофаги для індикації патогенних бактерій в об'єктах навколишнього середовища.

Початковий рівень знань – умінь:

1. Пояснювати межі стійкості вірусів і бактерій до дії різних чинників навколишнього середовища.
2. Пояснювати хімічний склад води (кафедра хімії).
3. Пояснювати будову апарату Кротова, принцип роботи приладу (кафедра медбіофізики).
4. Вміти приготувати кратні розведення води, уміти провести розрахунки в отриманих результатах. (кафедра біохімії).

Для того, щоб ви могли зрозуміти, чи відповідає початковий рівень ваших знань-умінь необхідному, пропонуємо виконати ряд завдань:

Завдання 1. Скільки відсотків в організмі людини складає вода і які функції вона виконує?

Завдання 2. Яким чином розрахувати вміст бактерій в 1 кубометрі повітря у апараті Кротова?

Завдання 3. Поясніть термін «седиментація». Перерахуйте недоліки методу седиментації.

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

1. «Медічна і біологічна фізика" за редакцією проф. О.В. Чалого. Київ, 2005.
2. А.С. Мороз, Д.Д. Луцевіч, Л.П. Яворська "Медічна хіімія". Вінниця: Нова книга, 2006.
3. Е.Г. Гончарук "Комунальна гігієна". Київ: "Здоров"я", 2003.

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

1. Санітарна мікробіологія, предмет, завдання. Значення санітарної мікробіології в діяльності лікаря.
2. Санітарно показові мікроорганізми, вимоги до них, їх значення для характеристики об'єктів навколишнього середовища.
3. Санітарно бактеріологічний контроль за якістю питної води. Вимоги Державного стандарту до питної води. Санітарно показові мікроорганізми, які використовують при оцінці якості води.
4. Мікрофлора води. Чинники самоочищення води. Виживання патогенних мікроорганізмів у воді. Роль води в передачі інфекційних захворювань.
5. Методи санітарно бактеріологічного дослідження води і їх оцінка.
6. Мікрофлора грунту. Роль грунту в передачі інфекційних захворювань. Чинники, які впливають на той, що виживає патогенних мікроорганізмів в грунті. Санітарно-показові мікроорганізми, які використовують при оцінці

забруднення грунту. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження грунту.

7. Мікрофлора повітря, її характеристика. Роль повітря в передачі інфекційних захворювань.

8. Мікробне число і санітарно показові мікроорганізми повітря закритих приміщень, методи визначення, їх оцінка.

9. Санітарна вірусологія, предмет, завдання, значення санітарної вірусології в діяльності лікаря.

10.Роль води, грунту, повітря в передачі збудників вірусних інфекцій. Віруси, які частіше за все знаходять в об'єктах навколишнього середовища.

11.Санітарно-вірусологічне дослідження води. Відбір проб, методи концентрації. Віруси, бактеріофаги в питних і стічних водах. Методи виявлення.

12.Роль повітряного середовища в розповсюдженні збудників респіраторних вірусних інфекцій. Методи відбору проб повітря і індикації респіраторних вірусів.

Література для засвоєння знань- умінь по даній темі:

1. О.К.Познеев Медична мікробіологія. М. ГЭОТАР-МЕД, 2002.

2. Л.Б.Борисов. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія М., МНА, 2005.-С. 131-136.

3. Букринская А.Г. Вирусология.- М.: Медицина,1986.

4. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина, 1998. С.63-66.

5. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова. – М .: Медицина, 1984.-С.81-95.

6. Кочемасова Н., Ефремова С.А., Рыбакова А.М. Санитарная микробиология и вирусология.- М.: Медицина, 1987.

7. Справочник по санитарной микробиологии / Под ред. проф. М.З.Григорьевой – Кишинев: Картя Молдовенясько, 1981.

8. Санітарно-бактеріологичне і вірусологічне дослідження води (Під ред. Канд. Мед.наук В.Н. Гиріна, проф. М.З.Грігорьевой - Київ: Здоров'я, 1984.

9. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження об'єктів навколишнього середовища (Під рук. акад. АМН СРСР проф.Г.І.Сидоренко – Москва: Медицина, 1978.

10.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С.83-84, 87-88, 93-95,100-102.

11. Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр "Академия", 2005 – С. 481-495.

Таблиця 1

Патогенні для людини віруси, що знаходяться у воді

Сімейства	Роди	Представники	Захворювання, що викликають
Пікорнавіруси	Ентеровіруси	Поліовіруси ECHO	Лихоманка, паралічі респіраторні

		Коксаки А, В	захворювання, діарея, менінгіт
		Вірус гепатиту А	респіраторні захворювання, менінгіт,
Рєовіруси	Ротавіруси		Інфекційний гепатит,
	Рєовіруси		Гострий гастроентеріт,
Аденовіруси	Аденовіруси ссавців	Аденовіруси людини	Респіраторні захворювання, кон'юнктивіт

Таблиця 2

Віруси, що знаходяться в повітрі, і їх стійкість при різній сприйнятливості при різній вогкості

Віруси	Стійкість при вогкості		
	низкою	середньою	високою
Грипу	+	-	-
Парагріппу	+	-	-
Кору	+	-	+/_
Аденовіруси	-	+/_	+
Поліомієліту	-	+/_	+

Позначення: (+)- стійкі, (+/_)-малостійкі, (-)-не стійкі.

Матеріали та обладнання: проба питної води, флакони та пробірки з ГПС, чашки Петрі з середовищем ЖСА, МПА, аппарат Кротова.

Орієнтована основа дій при виконанні практичної роботи

1. Визначення загальної кількості бактерій (мікробне число), в пробі питної во-ди методом титрів мембран. Етапи дослідження води методом фільтрів мем-бран вивчаються на демонстраційному матеріалі: викладач демонструє фільтр Зейтца, фільтри мембран, чашку Петрі із засіваючими фільтрами. Студенти підраховують кількість колоній, що виросли. Для доказу приналеж-ності мікроорганізмів, що виросли, до БГКП (бактерії групи кишкової палич-ки) викладач демонструє готовий забарвлений по Граму мазок і проводить визначення оксидазної активності, демонструє напіврідке середовище з глюкозою, засіваючу культурою з безбарвних оксидазонегативних колоній. Студенти роблять висновок про загальне мікробне забруднення введення і її відповідності санітарним нормам.

2. Визначення бактерій групи кишкових паличок (колі - індекс, колі - титр) бродильним методом. Дослідження проводиться по типу рішення задачі. Студенти діляться на групи по 3 людини, кожна група одержує зашифровану пробу питної води, оснащення, необхідне для визначення мікробного числа і колі - індексу бродильним методом. Для визначення мікробного числа студен-ти самостійно готують розведення проби води і роблять посів. Самостійно

кожна група проводить засів необхідних об'ємів води у флакони і пробірки з ГПС (глюкозо-пептоним середовищем). Для кращого уловлювання газоутворення у флакони замість поплавців поміщені шматочки вати, яка спливає у разі утворення газу при розщеплюванні глюкози. Зроблені посіви студенти поміщають в шафу. В протоколі наголошується виконаний етап роботи.
Кожна група студентів одержує теку з методичними і законодавчими документами, з якими знайомиться у міру необхідності.
Викладач акцентує увагу студентів на необхідності вивчення Гостів, СанПінів, інших матеріалів по воді: ГОСТ18963-73»Вода питна. Методи санітарно-бактеріологічного аналізу»; ГОСТ2874-82»Вода питна. Гігієнічні вимоги і контроль за якістю»; СанПін №4630-888»санітарні правила і норми охорони поверхневих вод від забруднення».
Студенти визначають колі- індекс і колі- титр, заповнюють протокол і роблять висновок (по таблиці 3) про санітарний стан води, можливості її використовування як питна.

3. Визначення загальної мікробної контамінації (мікробне число) і санітарно-показових мікроорганізмів методом седіментації.
Група студентів одержує 2 чашки з МПА, 2 чашки з ЖСА і 2 чашки з кров'яним агаром. Покласти чашки Петрі з живильними середовищами на рівні дихання на горизонтальну повехню і відкрити на 20 хв. (для визначення загальної мікробної контамінації) і на 40 хв. (для обліку кокової мікрофлори). Чашки помістити в шафу до наступного заняття. Розглянути засіяні раніше аналогічним способом чашки з середовищами, підрахувати кількість колоній, що виросли, дані занести в протокол.

4. Визначення мікробного числа і санітарно- показових мікроорганізмів аспіраціонним методом. Дослідження проводиться паралельно з виконанням завдання 1. Студенти одержують 2 чашки з МПА, 2 чашки з ЖСА і 2 чашки з кров'яним агаром. Чашки послідовно поміщають в апарат Кротова і пропускають 100 л. повітря для визначення мікробного числа (швидкість 25 л /хв.) і 250 л - для визначення санітарно-показових мікроорганізмів. Чашки помістити в шафу до наступного заняття.

Облічити результати посівів, зроблених раніше. Розрахувати мікробне число за формулою:

$$X = \frac{a \times 1000}{У}$$

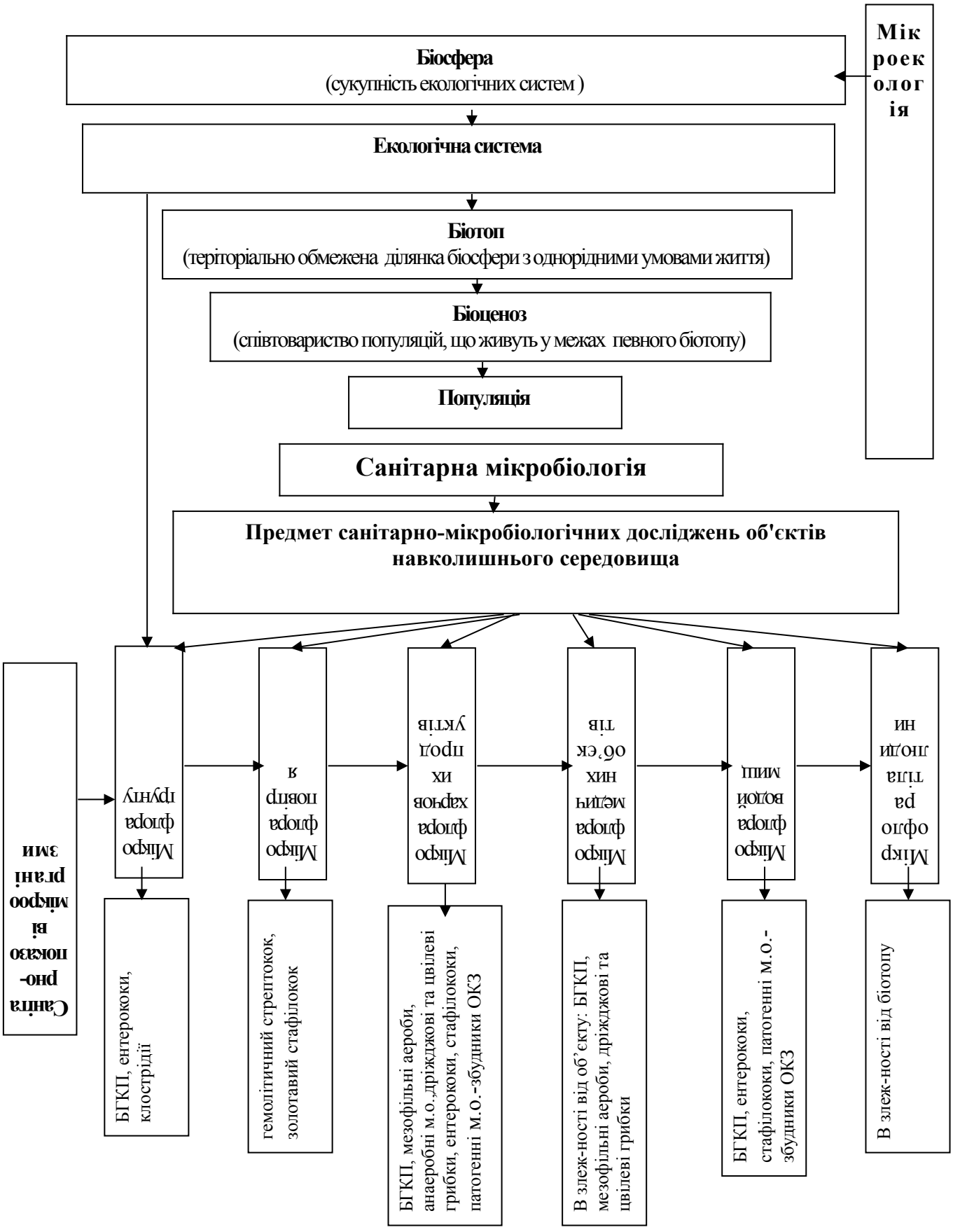
а - кількість вирослих на чашці колоній;
у - обсяг пропущеного через прилад повітря;
1000 - шуканий об'єм повітря в л.

Дані занести до протоколу.

Використовуючи таблицю № 4 зробити висновок про ступінь мікробного обсіменіння повітря.

Додаток 1

Граф логічної структури теми:
Санітарна вірусологія і бактеріологія



Таблиця.3.

Розрахунок числа БГКП в 1л при дослідженні питної води централізованого водопостачання

Число позитивних результатів з 3 об'ємів			Колі-індекс	Колі-титр	Число позитивних результатів з 3 об'ємів			Колі-індекс	Колі-Титр
по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл			по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл		
0	0	0	<3	>333	3	0	0	23	43
0	0	1	3	333	3	0	1	39	26
0	1	0	3	333	3	0	2	64	16
1	0	0	4	250	3	1	0	43	23
1	0	1	7	143	3	1	1	75	13
1	1	0	7	143	3	1	2	120	8
1	1	1	11	91	3	2	0	93	11
1	2	0	11	91	3	2	1	150	[12]
2	0	0	9	111	3	2	2	210	5
2	0	1	14	72	3	3	0	240	4
2	1	0	15	67	3	3	1	460	2
2	1	1	20	50	3	3	2	1100	09
2	2	0	21	48	3	3	3	>1100	<09
2	2	1	28	86					

Таблиця.4.

Критерії оцінки повітря житлових приміщень.

Оцінка повітря	Мікробне число	Вміст бактерій у $м^3$	
		гемолітичний стрептокок	S.aureus
Літо			
Чистий	До 1500	Одиничні	
Брудний	2500	16-36	
Зима	До 4500	Одиничні	
Чистий	7000	36-124	
Брудний			

Додаток 2

Зразок протоколу до практичного заняття № 13

Санітарна вірусологія і бактеріологія

Завдання 1. Визначення загальної кількості бактерій (мікробне число) в пробі питної води

Мікробне число _____

Висновок_____

Завдання 2. Визначення колі-титру, колі-індексу, проби питної води бродильним методом

Колі-титр_____

Колі-індекс_____

Висновок _____

_____

Завдання 3. Визначення загальної кількості бактерій в повітрі навчальної лабораторії седиментаційним методом

Мікробне число_____

Висновок_____

Завдання 4. Визначення загальної кількості бактерій та санітарно-показових в повітрі навчальної лабораторії аспіраційним методом

Кількість колоній ікроорганізмів, що виросли на:

МПА_____

ЖСА_____

КА_____

Висновок _____

_____

Дата _____ Підпис викладача _____

Практична робота № 14

Тема: **Неспецифічні фактори захисту організму**

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

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

Завдання 2. а) Відмітьте ферменти, які входять до складу слини: 1) протеаза; 2) амілаза; 3) лактозопероксідаза; 4) ендонуклеаза; 5) ліпаза. б) Відмітьте білки, які входять до складу сироватки крові людини: 1) альбумін; 2) глобулін; 3) гемоглобін; 4) пепсин; 5) фібріноген.

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

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

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Визначити бактерицидні властивості шкіри.

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

Оцінка бактерицидності шкіри	Кількість колоній E.coli через		
	5 хв	15 хв	45 хв
Висока	багато	немає	немає
Задовільна	багато	одиничні	немає
Незадовільна	багато	багато	одиничні

2. Визначити титр лізоциму в слині.

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

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

4. Визначити фагоцитарну активність.

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

ПОФР = 10-24 реакція слабопозитивна;

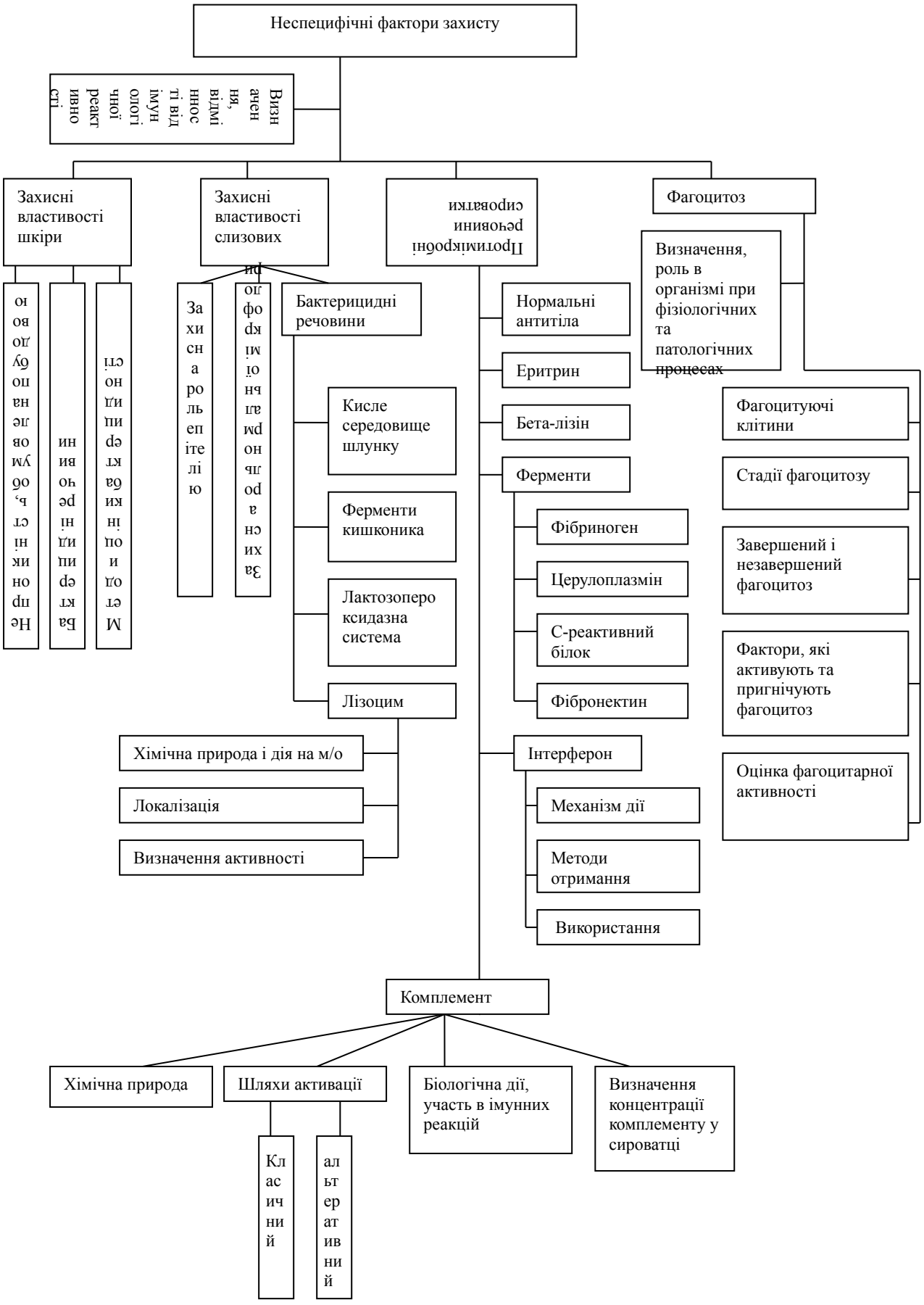
ПОФР = 25-49 реакція ясно виражена;
ПОФР = 50-75 реакція різко позитивна.
Зробити висновок про стан фагоцитарної активності.

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

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

Додаток 1

Граф логічної структури теми: Неспецифічні фактори захисту організму



Додаток 2

Зразок протоколу до практичного заняття № 14

Неспецифічні фактори захисту організму

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

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

Висновок: бактерицидність шкіри _____.

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

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

Висновок: титр комплементу _____.

Завдання 3. Визначення титру лізоциму в слині.

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

Висновок : титр лізоциму _____

.

Завдання 4. Визначення фагоцитарної активності.

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

Фагоцитарний показник _____
Фагоцитарне число _____
ПОФР _____
Висновок: функція фагоцитів _____ .

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 15

Тема: Серологічні реакції (І заняття)

Актуальність теми. Серологічними називають реакції, які відбуваються між антигенами та антитілами. Антигени – це речовини, що мають ознаки генетичної чужерідності і при потраплянні до організму викликають імунну відповідь. Антигенні властивості мають компоненти мікробної клітини і речовини, що виділяються нею. Більшість бактеріальних антигенів відрізняється високою специфічністю і є важливою діагностичною ознакою, що дозволяє визначити не тільки вид, але і серотип збудника інфекційного захворювання. Настільки ж специфічні антитіла, що утворюються В-клітинами імунної системи у відповідь на проникнення збудника в організм людини. Визначення титру антитіл у сироватці хворого лежить в основі серологічної діагностики інфекційних хвороб. Для серологічної ідентифікації і діагностики найчастіше використовується реакція аглютинації. Її застосовують у діагностиці тифо-паратифозних захворювань, кашлюка, дизентерії, бруцельозу, рікетсіозів та ін. Досить поширені у медичній практиці варіанти реакції аглютинації – РПГА, РГГА, РГПГА - їх використовують для діагностики як бактеріальних, так і вірусних інфекцій, визначення напруженості антитоксичного імунітету, виявлення гормонів у біологічних рідинах, реакція Кумбса використовується для виявлення неповних антитіл, що є одним з методів діагностики резус-конфлікту. Застосування антитіл, мічених флюорохромом, тобто реакція імунофлуоресценції, дозволяє виявити збудника у патологічному матеріалі без виділення чистої культури.
Мета (загальна): уміти ставити реакцію аглютинації та її варіанти для діагностики інфекційних захворювань для використання цих знань-умінь у комплексі діагностичних заходів на наступних кафедрах.
Конкретні цілі – уміти:
1. Трактувати роль центральних та периферичних органів імунної системи.
2. Описувати властивості та функції лімфоцитів.
3. Характеризувати молекулярну структуру антитіл та особливості основних класів імуноглобулінів.
4. Інтерпретувати властивості антигенів, антигенну будову мікроорганізмів.
5. Ставити орієнтовну РА на склі з метою серологічної ідентифікації мікроорганізмів.
6. Ставити розгорнуту РА з метою серологічної діагностики інфекційного захворювання.
7. Ставити РПГА, враховувати та інтерпретувати результати РА та РПГА.
8. Пояснювати механізм та спосіб врахування прямої та непрямої РІФ.
Вихідний рівень знань – умінь:
1. Визначати анатомічне положення центральних та периферичних органів імунної системи (кафедра анатомії).
2. Пояснювати структуру червоного кісткового мозку, тимусу, лімфовузлів (кафедра гістології).
3. Пояснювати формування органів імунної системи в онтогенезі (кафедра гістології).

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

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

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

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

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

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

Завдання 5. Стисло опишіть морфологію лімфоцитів.

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

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

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

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

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

1. Сучасне визначення імунітету. Його головні функції.
2. Імунна система. Її особливості як системи. Побудова імунної системи.
3. Формування імунокомпетентних Т и В лімфоцитів. Їхнє розселення.
4. Антитіла. Структура молекули імуноглобуліну (на прикладі Ig G).
5. Класи імуноглобулінів
6. Генетичний контроль утворення антитіл.
7. Поняття про антигени. Умови антигенності. Повноцінні та неповноцінні антигени. Ад‘юванти.
8. Антигени мікроорганізмів.
9. Антигенні властивості мікробних токсинів.
10.Антигени тварин: видові, органні, ізоантигени, аутоантигени.
11.Гетерогенні антигени.
12.Специфічність антигенів. Значення для діагностики і специфічної профілактики.
13.Механізм реакції аглютинації, її варіанти.
14.Механізм прямої та непрямої РІФ.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С.236-256.

2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.128-136, 144-157.

3. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.-С. 5-13, 22-36.

4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С.109-114.

5. Ройт А. Основы иммунологии.- М.: Мир, 1991.

6. Вейсман И.Л. и др. Введение в иммунологию.- М.: Высшая школа, 1983. - 160с.

7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С. 201-227, 235-244, 283-285.

8. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С. 61-176, 480.

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

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

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

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

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

6) Пробірки інкубують 2 год. при 37^0 С и витримують протягом доби при кімнатній температурі. Реакцію враховують як позитивну при наявності виразної аглютинації в дослідній пробірці і відсутності аглютинації в обох контрольних пробірках.

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

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

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

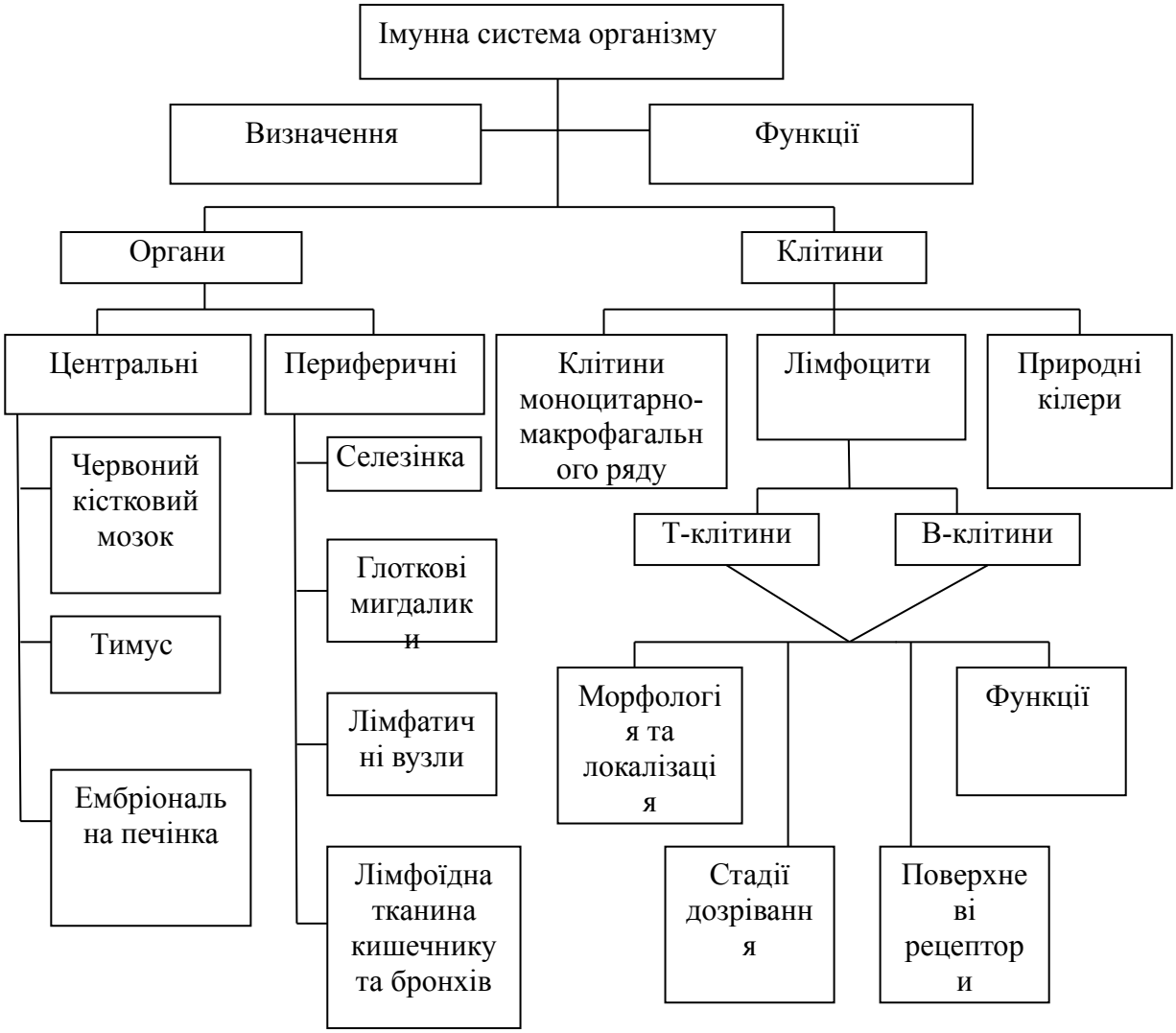
2) Петлею внести в кожну краплю невелику кількість виділеної від хворого бактеріальної культури і перемішати до одержання рівномірної суспензії.
3) Облік зробити через 3-5 хв. по появі зерен аглютината в краплях. Реакція враховується як позитивна, якщо спостерігається утворення осаду у вигляді зерен або пластівців, негативна - рівномірно мутна суспензія.
4) Зробити висновок про видову приналежність виділеного збудника дизентерії. Зробити у протоколі малюнок, який ілюструє проведений дослід.
3. Поставити реакцію пасивної аглютинації з метою серологічної діагностики мікоплазменної пневмонії.
1) У лунках пластмасових пластин чи пробірках приготувати послідовні розведення досліджуваної сироватки.
2) У кожну лунку (пробірку) внести однаковий об‘єм (0,05 мл) 3% еритроцитарного мікоплазменного діагностикуму.
3) Результат врахувати через 2 год. інкубації при 37^0 С, оцінюючи зовнішній вигляд осаду. Визначити титр сироватки.
Негативна реакція - осад у виді "ґудзичка", позитивна - у виді "парасольки".
Титр сироватки - це її найбільше розведення, яке дає позитивну реакцію.
Механізм реакції пояснити схематичним малюнком.
4. За таблицями вивчити механізм реакції Кумбса для виявлення неповних антитіл, схематично відобразити його у протоколі, зробивши необхідні пояснення.
5. За таблицями розібрати механізм прямої та непрямої реакції імунофлуоресценції, схематично відобразити його у протоколі, зробивши необхідні пояснення. Із запропонованого набору біопрепаратів відібрати ті, що використовуються у цих реакціях, записати їх назви до протоколу. Відмітити, яке обладнання необхідне при проведенні дослідження цим методом.
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:
1. У хворого, переведеного з терапевтичного відділення в інфекційне, на 12-й день хвороби був поставлений клінічний діагноз "дизентерія?" Триразове бактеріологічне дослідження калу виявилося негативним - шигели (збудники дизентерії) не виявлені. Для підтвердження клінічного діагнозу в бак.лабораторію направлений досліджуваний матеріал. Який матеріал був направлений у лабораторію в даному випадку? Яку реакцію можна використовувати для підтвердження чи спростування клінічного діагнозу? Який результат реакції підтвердить діагноз?
2. У лабораторію надійшла кров від хворого на черевний тиф для постановки реакції аглютинації. Які реактиви необхідні для її постановки? Який показник реакції буде використаний у якості діагностичного?
3. При ідентифікації збудника харчової токсикоінфекції з'ясувалося, що за своїми біохімічними властивостями він відноситься до роду Salmonella. Які дослідження треба провести, щоб визначити вид збудника?
4. У бак.лабораторії досліджується сироватка крові клінічно здорової людини з підозрою на черевнотифозне бактерионосійство. Для цього було використано РПГА з еритроцитарним черевнотифозним Ві-діагностикумом. У пробірках, де були розведення сироватки від 1:10 до 1:80 спостерігався осад у вигляді

„парасольки”, а розведення 1:160 та 1:320 дали осад у вигляді „ґудзичка”. Що означає отриманий результат?

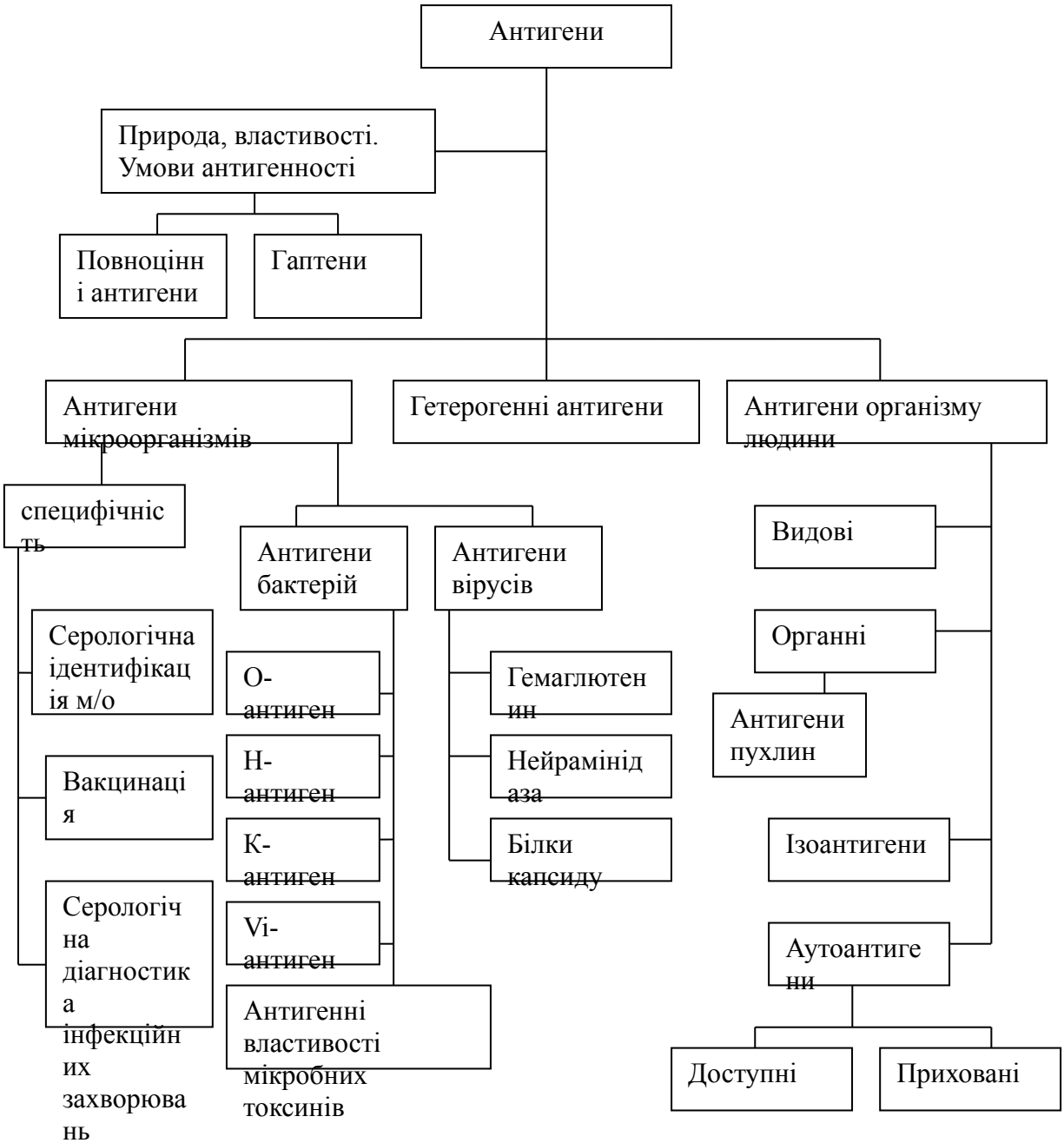
Додаток 1

Граф логічної структури теми:

Імунна система організму

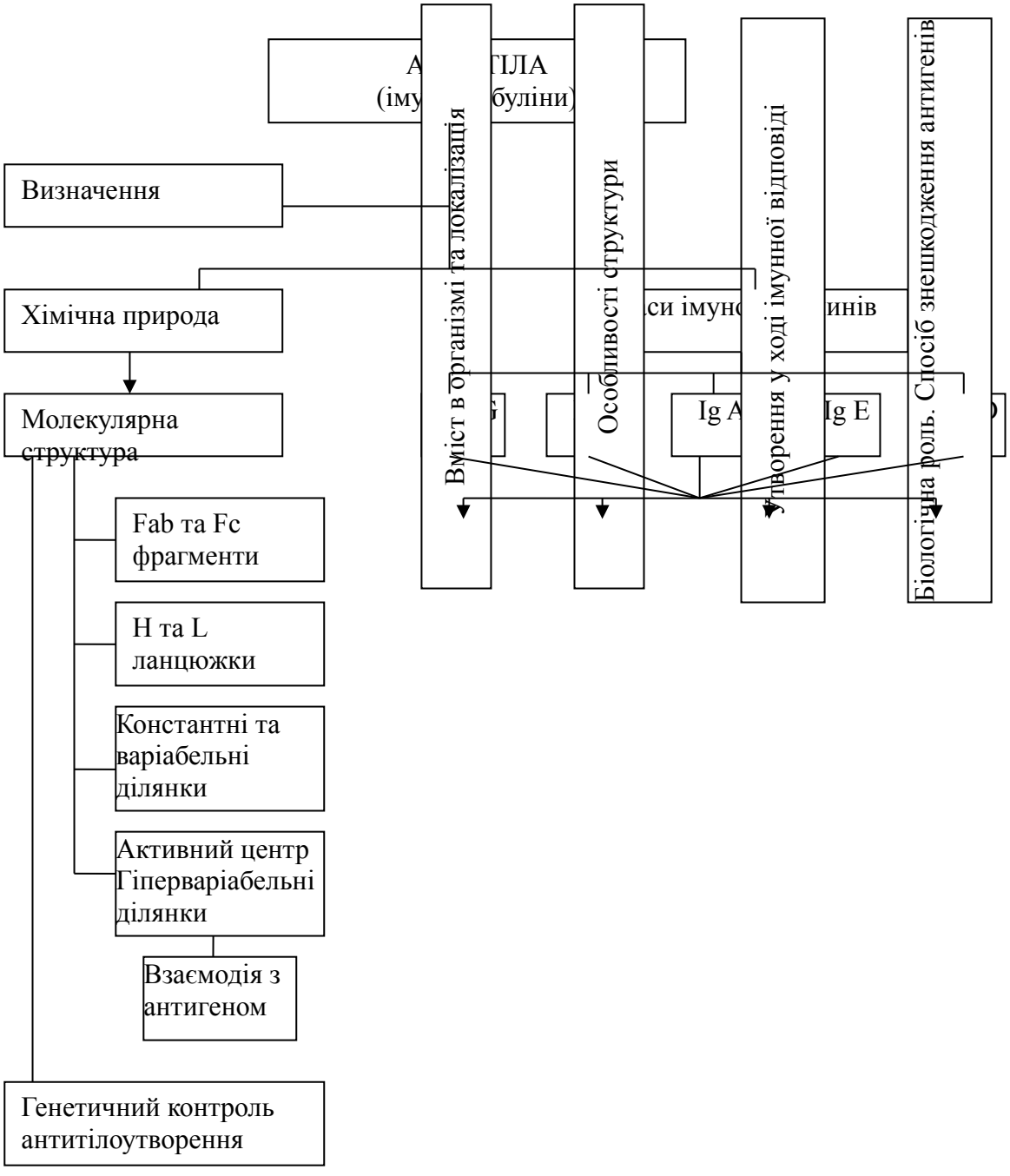


Антигени



Мал. 2.

Антитіла


Визначення
Хімічна природа
Молекулярна структура
Fab та Fc фрагменти
H та L ланцюжки
Константні та варіабельні ділянки
Активний центр Гіперваріабельні ділянки
Взаємодія з антигеном
Генетичний контроль антитілоутворення
Вміст в організмі та локалізація
Особливості структури
Ig A
Ig E
Утворення у ході імунної відповіді
Біологічна роль. Спосіб знешкодження антигенів

Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття № 15

Імунна система організму

Завдання 1. Серологічна діагностика інфекційного захворювання.

діангостикуми	Розведення сироватки хворого					контроль	
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	АТ	АГ
Коклюшний							
Паракоклюшний							

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

Завдання 2. Серологічна ідентифікація збудника інфекційного захворювання.

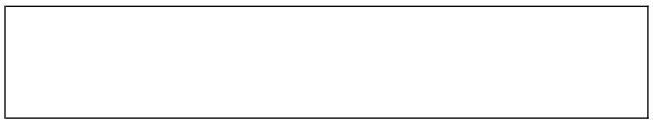


Рис.1 Реакція аглютинації на склі

Умовні позначення:
сироватка до S.flexneri
сироватка до S.sonnei
контроль
позитивна реакція
негативна реакція

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

Завдання 3. Серологічна діагностика інфекційного захворювання у РПГА

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

Рис.2

Завдання 4. Схема реакції Кумбса.

Умовні позначення:
1- неповні антитіла
2- еритроцити
3- антиглобулінові антитіла

Рис.3 Виявлення неповних антитіл.

Завдання 5. Реакція імунофлуоресценції

Умовні позначення:
1- мікробний антиген
2- антитіла до мікробного антигену
3- антиглобулінові антитіла
4- флюорохром

Рис.4а. Пряма РІФ Рис.4б. Непряма РІФ

Реактиви для постановки РІФ _____
Обладнання для урахування результатів _____

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 16

Тема: Серологічні реакції (II заняття)

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

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Пояснювати властивості справжніх та колоїдних розчинів (кафедра хімії).
2. Трактувати структуру складних білків (кафедра біохімії).
3. Готувати серійні розведення розчинів (кафедра біохімії).
4. Пояснювати сутність гуморальної регуляції фізіологічних процесів (кафедра фізіології).

5. Пояснювати морфологічні особливості та функції макрофагів і лімфоцитів (кафедра гістології).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

Зміст навчання повинен забезпечити досягнення цілей навчання, чому сприяє граф логічної структури теми: „Форми імунної відповіді. Реакції преципітації та зв‘язування комплементу” (додаток 1).

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Поставити РЗК із метою серологічної діагностики.

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

2) Основний дослід проводять за схемою:

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

Для постановки основного досліду сироватки хворих та контрольну сироватки інактивують нагріванням протягом 30 хв. при 56^0С.

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

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

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

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

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

1. У лабораторію судово-медичної експертизи доставлений одяг громадянина Н., що пропав без звістки. На одязі помітні бурі плями, що нагадують сліди крові. Яку реакцію можна використати для підтвердження цього припущення? Який результат буде спостерігатися, якщо припущення підтвердиться?

2. При додаванні гемолітичної (індикаторної) системи до пробірок, де міститься суміш сироватки хворого з бактеріальним діагностикумом (основна система), у них відбувся гемоліз. Про яку реакцію мова йде в даному випадку?

3. При постановці РЗК у пробірці з досліджуваною сироваткою хворого в системі утворився комплекс "антиген + антитіло + комплемент", але зовнішній вигляд розчину не змінився. Яким чином можна виявити цей комплекс?

4. При постановці РЗК із сироваткою хворого з підозрою на токсоплазмоз, вона виявилася негативної у всіх розведеннях. Як ви візуально визначите негативну РЗК? Про що вона свідчить? Які реактиви було використано для постановки цієї реакції?

5. Є підозра, що у партії м‘ясних консервів міститься ботулінічний токсин. За допомогою яких серологічних реакцій його можна виявити? Які реактиви та обладнання необхідні? Який результат буде спостерігатися, якщо підозра підтвердиться?

6. У бактеріологічній лабораторії досліджується сироватка громадянина Н. з підозрою на сифіліс. У якості діагностикуму були використані живі трепонеми, а результат фіксувався за допомогою темнопольного мікроскопу. Яку серологічну реакцію було поставлено? Що покаже мікроскопія у разі негативної реакції?

Додаток 1

Граф логічної структури теми

Додаток 2

Зразок протоколу до практичного заняття № 16

Серологічні реакції

Мета: виявлення менінгококових антигенів у спинномозковій рідині хворого.

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

Висновок: позитивна реакція преципітації № ____, це означає, що _____ _____

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

Умовні позначення:

Рис.1

Висновок: токсигенними є штами №№ _____ .

Завдання 3. Серологічна діагностика у РЗК.

а) визначення титру та робочої дози комплементу.

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

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

б) дослідження сироваток хворих

дослід		контроль		
сироватка №1	сироватка №2	сироватка №1	сироватка №2	антиген

Висновок: РЗК позитивна у хворого № _____ .
Завдання 4. Застосування РН для виявлення мікробних токсинів.
Досліджуваний матеріал _____
Використовувані біологічні об‘єкти _____
Позитивний результат _____
Діагностичні біопрепарати для РН _____
_____
Завдання 5. Застосування реакції іммобілізації мікроорганізмів.
Біопрепарати , що застосовуються для виявлення:
а) мікроорганізмів _____
б) антитіл у сироватці хворого _____
Обладнання, необхідне для врахування результату _____
_____
Позитивний результат _____
Негативній результат _____

Дата _____ Підпис викладача _____

Практична робота № 17

Тема: Вакцини та сироватки.

Актуальність теми. Сучасний рівень розвитку імунології характеризується розробкою і широким використанням лікувально-профілактичних імуномодуляторів - тобто препаратів, що змінюють властивості імунітету. Ці препарати можуть містити антигени, антитіла, імунокомпетентні клітини, гормони й інші медіатори системи імунологічного нагляду. Використовуючи імуномодулятори лікар одержує реальну можливість коректувати систему імунітету хворого. Серед цих препаратів провідна роль належить вакцинам та сироваткам, які дозволяють створювати штучний імунітет до інфекційних захворювань. Саме завдяки вакцинації вдалося повністю подолати натуральну віспу, значно зменшити захворюваність на поліомієліт, кір, дифтерію та ін. Після відкриття антибіотиків сфера використання імунних сироваток скоротилася, але вони залишаються важливими засобами специфічної профілактики та терапії при захворюваннях, обумовлених мікробними токсинами (правець, ботулізм, дифтерія, газова гангрена). Призначаючи вакцини або сироватки, лікар повинен знати про можливі ускладнення та побічні дії, які виникають через втручання у роботу імунної системи людини.
Не менш важливі діагностичні імунопрепарати, які також містять відомі антитіла (сироватки) або антигени (діагностикуми) і дозволяють з великою точністю проводити серологічну ідентифікацію патогенних мікроорганізмів і серологічну діагностику інфекційних, алергічних та інших захворювань.
Мета (загальна): уміти вибирати імунопрепарати для мікробіологічної діагностики, специфічної терапії та профілактики інфекційних хвороб; трактувати основні механізми формування імунної відповіді організму людини при введенні вакцин та сироваток, а також визначати основні типи патологічних реакції імунної системи, які можуть виникати при цьому, для використання цих знань-умінь у комплексі протиепідемічних, лікувально-профілактичних та діагностичних заходів на наступних кафедрах.

Конкретні цілі – уміти:

1. Трактувати основні принципи специфічної профілактики та лікування інфекційних захворювань.

2. Пояснювати класифікацію вакцин та імунних сироваток за різними параметрами.

3. Пояснювати спосіб та сферу застосовування основних груп імунобіологічних препаратів.

4. Готувати вбиту вакцину.

5. Визначати активність антитоксичної сироватки.

Вихідний рівень знань – умінь:

1. Трактувати поняття гомеостазу, рівні дії гомеостатичних механізмів (кафедра нормальної фізіології).

2. Описувати сучасні методи впливу на мінливість (кафедра медичної біології).

3. Пояснювати хімічний склад плазми та сироватки крові (кафедра біохімії).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Історія створення перших вакцин, походження терміна.

2. Класифікація вакцин за різними параметрами.

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

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

5. Хімічні, синтетичні та генно-інженерні вакцини.

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

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

8. Донорські гамма-глобуліни і плазми: одержання, використання, приклади.
9. Як оцінити ефективність вакцин і сироваток?
10.Діагностичні сироватки: методи одержання та сфера використання.
Полівалентні та монорецепторні сироватки, реакція Кастеллані.
Діагностичні
сироватки для РІА, ІФА, РІФ.
11.Поняття про діагностикуми.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С. 339-351.
2. Воробьев А.А. и др. Микробиология. М.: Медицина , 1998. С.181-189, 191-193.
3. Творко М.С. Імунологія.-Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.- С. 107-128.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984. С. 123-124.
5. Ройт А. Основы иммунологии.- М.: Мир, 1991.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – С.294-302, 304-309.
7. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – С. 445-478.

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Приготування стафілококової аутовакцини.

1) Виділити від хворого і накопичити чисту культуру S.aureus.

2) Приготувати маточну суспензію і стандартизувати її за оптичним стандартом мутності до 2 млрд./мл. Для цього 5 мл фізіологічного розчину змити з агару мікроорганізми. Перелити в стерильну пробірку маткову суспензію і визначити її мутність: 1 мл цієї суспензії відлити в порожню пробірку і мірно розводити фізіологічним розчином до мутності по стандарті 1 млрд. /мл мікробних тіл. Мутність маточної суспензії визначають за кількістю доданого фізіологічного розчину.

3) Знаючи мутність маточної суспензії, приготувати з неї суспензію, яка містить 2 млрд. мікробних клітин на 1мл, для вакцини. Вихідна густина маточної суспензії визначається за формулою: $\boldsymbol{x} = \boldsymbol{a} + 1$ (млрд.кл./мл), де $\boldsymbol{a}$ - об‘єм доданого фізіологічного розчину.

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

4) Прогріти приготовлену суспензію стафілококів на водяній бані при 80^0С протягом 1 години, для того щоб убити мікроби.

5) Перевірити на стерильність прогріту культуру (вакцину) шляхом посіву на скошений агар. Врахувати результати. Зробити висновок про придатність отриманого препарату до використання.

2. Визначення лікувальної сили антитоксичної сироватки.

1) У ряд з 7 пробірок внести досліджувану сироватку у об‘ємі від 0,1мл у першій пробірці до 0,7 мл у останній.

2) У кожну пробірку додати по 2 мл токсину. Використовується токсин, що містить 20Lf(Limis floeculatieris) у 1мл. Lf токсину - це його кількість, що дає ініціальну флокуляцію з 1 МО стандартної сироватки.

3) Пробірки тримати у термостаті при 45^0С протягом 30 хв.

4) Відмітити, у якій пробірці раніше з‘явиться флокулят та розрахувати кількість МО/мл сироватки. При титруванні сироватки ініціальна флокуляція з'являється в тій пробірці, де кількість Lf токсину дорівнює кількості МО сироватки.

5) Пояснити сутність реакції схематичними малюнками.

3. Визначення типу лікувально-профілактичних та діагностичних препаратів:

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

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

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

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

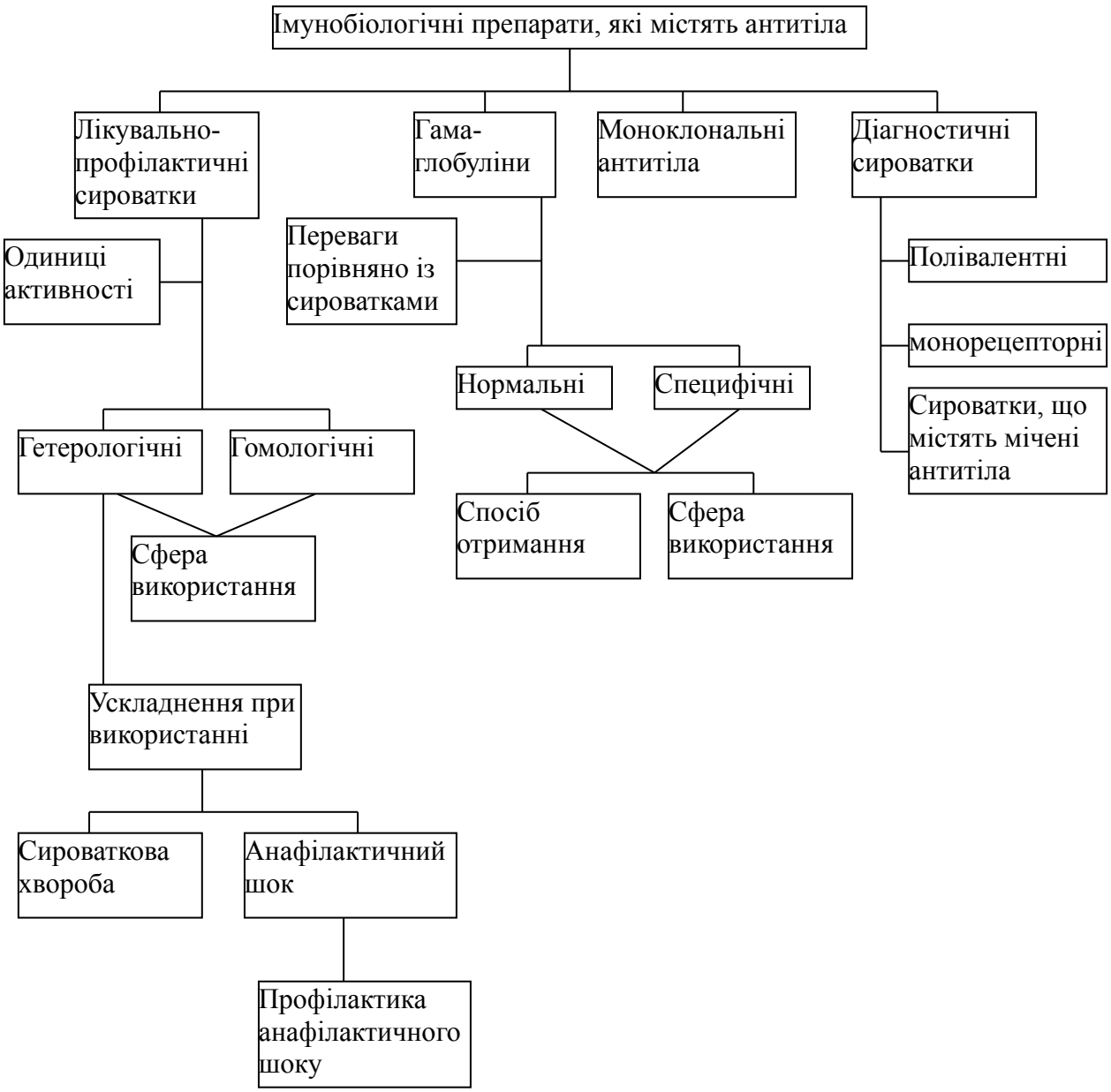
1. У дитячому саду планується вакцинація проти дифтерії і правця. Який препарат необхідний для цих цілей? Які імунологічні реакції використовують для виміру їхньої специфічної активності?
2. У лабораторію інституту вакцин і сироваток надійшла протидифтерійна сироватка для визначення її специфічної активності. Яка реакція буде використана, які інгредієнти необхідні для її постановки?
3. Людині, яка постраждала у дорожно- транспортній пригоді необхідно провести екстренну профілактику правця – ввести протиправцеву сироватку. Однак виявилося, що лікувальної антитоксичної протиправцевої сироватки у лікаря немає. Чи можна замість неї ввести такий самий об‘єм діагностичної сироватки до правцевого анатоксину?

Додаток 1

Граф логічної структури теми:

Вакцини та сироватки

Мал 1.



Мал. 2

Додаток 2.

Зразок протоколу
до практичного заняття № 17

Вакцини та сироватки

Завдання 1.Приготування стафілококової аутовакцини.
Щоб довести маточну суспензію до густини 1 млрд. мікробних клітин/мл, до 1 мл суспензії було додано _____ мл фізіологічного розчину (*а*).
Отже вихідна густина маточної суспензії становить: *а* + 1=_____ млрд. /мл (*х*).
Для приготування вакцини, яка містить 2 млрд. /мл, треба до 1 мл маточної суспензії додати : *х*/2 –1=_____ мл фізіологічного розчину.
Перевірка вакцини на стерильність : _____ .

Завдання 2. Визначення сили антитоксичної сироватки.

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

Висновок: ініціальна флокуляція спостерігається у пробірці № ___,
у якій міститься _____ Lf токсину (*х*),
тобто у _____ мл сироватки (*v*) також міститься *х* МО.
Це означає, що 1 мл сироватки містить: *х:v*= _____ МО.

Умовні позначки:
-АТ
-АГ

а) б) в)

Рис.1. Механізм реакції флокуляції:
а) АТ<АГ - №№ пробірок _____, реакція йде повільно, або не відбувається;
б) АТ =АГ, - № пробірки _____, ініціальна флокуляція;
в) АТ>АГ - №№ пробірок _____, реакція йде повільно, або не відбувається.

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

Препарати, що містять антигени	Препарати, що містять антитіла

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

Дата _____ Підпис викладача _____

Практична робота № 18

Тема: Імунний статут організму. Імунопатологія.

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Поняття про імунний статут організму. Основні показники стану імунної системи.

2. Показання до імунологічного обстеження.

3. Первинні імунодефіцити, їх механізми.

4. Вторинні імунодефіцити. Можливі причини вторинних імунодефіцитів.

5. Поняття про алергію. Основні типи алергічних реакцій.

6. Аутоімунні захворювання, їх причини, класифікація.

7. Визначення стану Т-системи імунітету.

8. Визначення стану В-системи імунітету.

9. Імунологічні тести І та ІІ рівня, їх призначення.

10. Принципи імунокорекції.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

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

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

Матеріали та обладнання: мікропрепарати для визначення формули крові, врахування Е-РОК та ЕАС-РОК, реакції бластної трансформації, макропрепара-

ти із демонстрацією РП у гелі (реакція Манчіні) для побудови каліброваної кривої та визначення вмісту імуноглобулінів різних класів у сироватці, ФГА, антиглобулінові сироватки.

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Оцінка Т-системи імунітету.

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

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

Для постановки реакції беруть 3-6 мл гепарінізованої крові хворого і центрифугують з реагентами, які дозволяють розділити лімфоцити й інші клітинний елементи крові (еритроцити, гранулоцити). З одержаних лімфоцитів готують суспензію на середовищі N199, вона повинна містити до 2 млн. лімфоцитів на 1 мл. Далі у пробірку відбирають у рівних кількостях (0,1-0,2 мл) суспензії лімфоцитів і 0,5% суспензії еритроцитів барана. Реакція проходить при інкубації в термостаті при 37^0С протягом 30 хв. і в холодильнику до 1 години.

Підрахунок клітин проводять у камері Горяєва: підраховують 200 лімфоцитів і визначають відсоток кліток, що зв'язують 3 і більш еритроцитів. Потім підраховують абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові (за даними загального аналізу крові). У здорових людей у крові міститься 55-76% Т клітин від загальної кількості лімфоцитів, що становить 600-2500 клітин на мкл. Зменшення кількості Т-лімфоцитів - показник пригнічення клітинного імунітету.

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

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

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

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

2. Оцінка В-системи імунітету.

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

Усі В-лімфоцити мають рецептор до третього компонента комплементу (C_3-компонент), тому їх виявляють у реакції розеткоутворення з еритроцитами, навантаженими антитілами до еритроцитів і комплементом. Лімфоцити одержують як і для реакції Е-РОК. Окремо готують 5% суспензія еритроцитів

барана, які навантажують антитілами, для цього використовується гемолітична сироватка в субгемолітичній дозі. Суміші лімфоцитів і навантажених еритроцитів інкубують протягом 30 хв. при Т=37^{0}С. У здорової людини кількість В-лімфоцитів у периферичній крові становить 20-25% від загальної кількості лімфоцитів. Облік ЕАС-РОК здійснюють аналогічно Е-РОК. У протоколі схематично відобразити механізм ЕАС-РОК, зробити кількісну оцінку стану В-системи імунітету хворого.

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

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

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

Ig G - 6-16 мг/мл;
Ig A - 0,5-1,8 мг/мл;
Ig M - 1-5 мг/мл.

За рішенням ВООЗ орієнтованим рівнем у діагностиці імуноглобулінової недостатності (первинні і вторинні імунодефіцити) прийняті концентрації - 2 мг/мл при поєднанні із відповідною клінічною симптоматикою. У протоколі схематично замалювати постановку досліду, накреслити калібровані криві та визначити за ними вміст імуноглобулінів різних класів у сироватці хворого. Зробити висновок про функціональний стан В-системи імунітету.

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

1. У лабораторії було приготовлено агаровий гель, до якого додали кролячу антиглобулінову сироватку до людського імуноглобуліну класу М. Як і для чого буде використано цей реактив?

2. У імунологічній лабораторії приготовлено реактив, який уявляє собою еритроцити барана, оброблені гемолітичною сироваткою та навантажені комплементом. Для виявлення яких клітин імунною системи його буде використано? На якій особливості цих клітин базується методика їх визначення?

3. У жінки 37 лет протягом року періодично виникали бактеріальні інфекції, їх перебіг був тривалим, а ремісії короткочасними. При обстеженні виявлено гіпогамаглобулінемію. Порушення функції яких клітин може бути її причиною? Які дослідження дозволять визначити кількісний вміст цих клітин та їх функціональну активність?

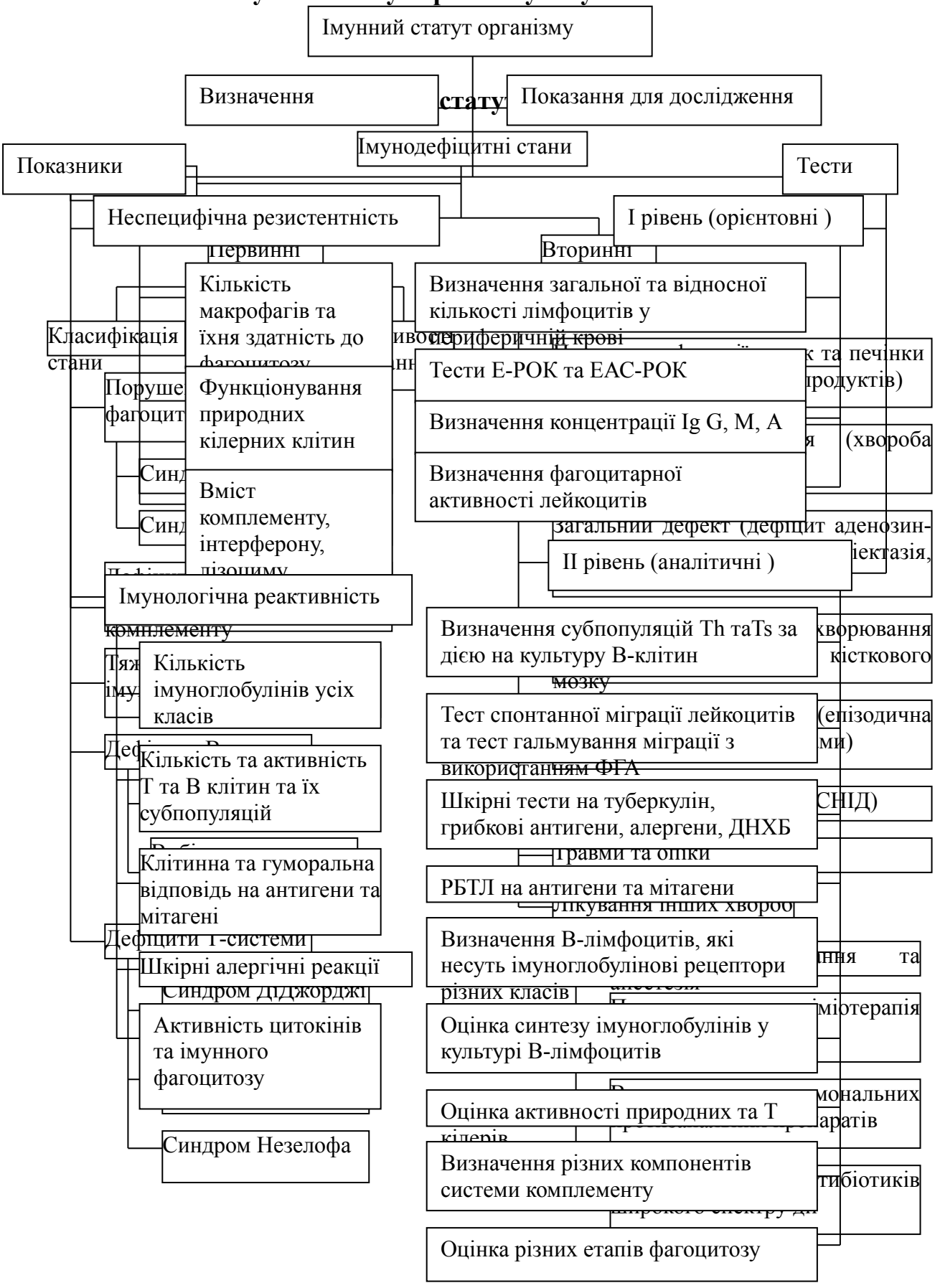
4. Дитина одного року часто хворіє на вірусні та бактеріальні інфекції, які погано піддаються терапії. При проведенні імунологічного обстеження, виявлено відсутність у крові лімфоцитів, що забезпечують клітинний імунітет. Який метод дослідження дозволив поставити діагноз? До якого типу імунодефіцитів відноситься захворювання, виявлене у дитини? Які причини захворювання та можливості його лікування?

5. У хворого з клінічними ознаками імунодефіциту проведені імунологічні дослідження. Виявлено значине зниженння кількості клітин, які утворюють розетки с еритроцитами барана. Як називається використаний метод діагностики? Який висновок слід зробити на основі даних аналізу?

6. У хворої з клінічними ознаками імунодефіциту та незміненою кількістю та функціональною активністю Т- і В-лімфоцитів при обстеженні виявлено дефект на молекулярному рівні, при якому порушена функція антигенпрезентації імунокомпетентними клітинами. Дефект структур яких клітин є можливим?

7. У хворого діагностовано набутий дефект імунної системи - порушення активації системи комплементу за класичним шляхом на фоні достатньої кількості всіх компонентів системи. Передбачається дефект антитілоутворення. Зменшення вмісту яких антитіл найбільш імовірно? Яким чином можна встановити реальний вміст цих імуноглобулінів у сироватці хворого?

Граф логічної структури теми:
Імунний статут організму. Імунопатологія.



Мал.2.

Додаток 2

Зразок протоколу
до практичного заняття №18

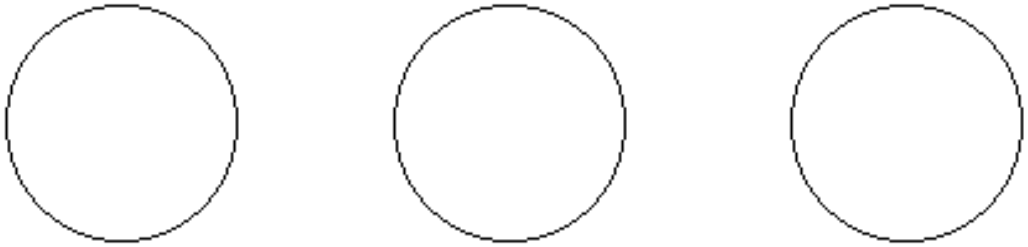
Імунний статут організму. Імунопатологія.

Завдання 1. Оцінка Т-системи імунітету.
а) визначення кількості Т-лімфоцитів методом розеткоутворення:

Умовні позначення:

1.
2.
3.

Рис.1 Е-РОК
Висновок: у досліджуваній крові міститься _____ % Т-лімфоцитів,
що свідчить про _____.
б) визначення функціональної активності Т-клітин у РБТЛ:



а) б) в)
Рис 2. РБТЛ. (а-в - поступові етапи перетворення Т-лімфоцитів на бласти)
Висновок: РБТЛ становить _____ %, тобто активність Т-клітин _____ .

Завдання 2. Оцінка В-системи імунітету.
а) визначення кількості В-лімфоцитів методом ЕАС-розеткоутворення

Умовні позначення:
1.
2.
3.
4.
5.

Рис.3 ЕАС-РОК
Висновок: у досліджуваній крові міститься _____ % В-лімфоцитів, що _____ нормі.

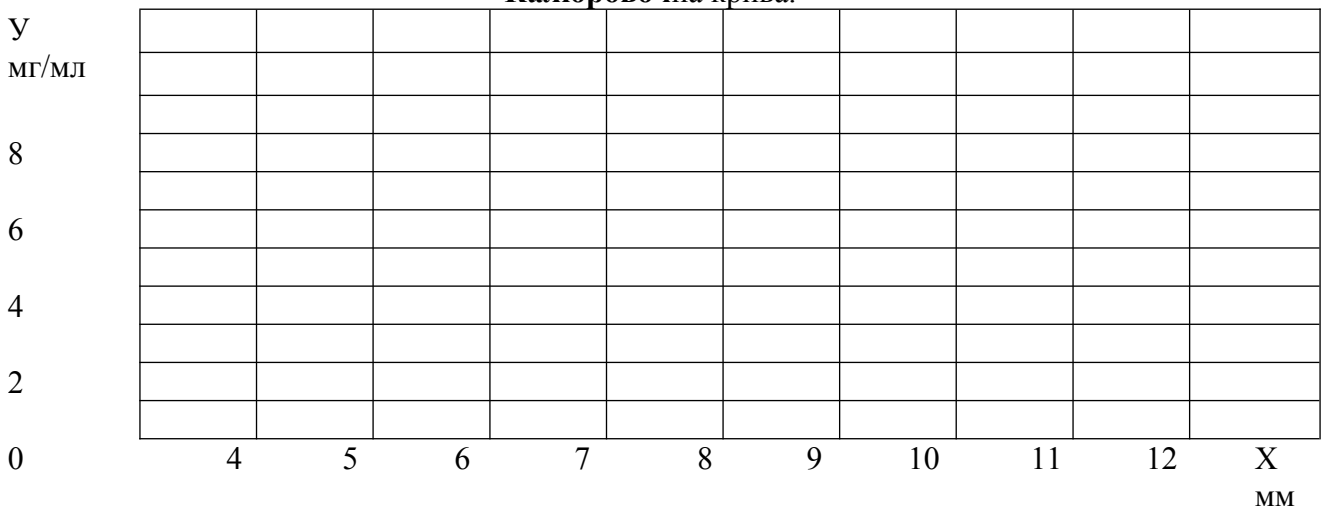
б) визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці методом радіальної імунної дифузії

Умовні позначення:

1.
2.
3.
4.

Мал.4 Реакція Манчіні

Калібровочна крива.



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

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

Висновок: Концентрація імуноглобулінів у досліджуваній сироватці становить:
Ig G _____ мг/мл,
Ig A _____мг/мл,
Ig M_____ мг/мл.

Діагноз імуноглобулінової недостатності _____.

Дата _____ Підпис викладача_____

Практична робота № 19

Тема: Серологічні реакції в вірусології

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

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

Конкретні цілі – уміти:

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

Вихідний рівень знань – умінь:

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

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

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

Завдання 2. Які імуноглобуліни вказують на розвиток хронічного процесу?

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

Завдання 4. Назвіть вміст та призначення діагностикумів.

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

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

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

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М. Микробиология. М.: Медицина , 2005. С.209-288.

2. Воробьев А.А.и др.Микробиология.- М.: Медицина,1998. С. 144-148, 149-153.

3. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология.- К.: Вища школа, 1992.- С. 173-176, 176-181.

4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л.Б.Борисова. – М .: Медицина, 1984.-С.107 - 122.

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

1. Антигенні властивості вірусів.

2. Серологичні реакції, які використовують у вірусології. Реакція вируснейтралізації: механізм, принципи використання, диагностична цінність.

3. Реакція гальмування гемагглютинації, її механізм, умови постановки, принціпи використання, діагностична ценність.

4. Реакція зв’язування комплементу, її суть, оцінка, особливості постановки.

5. Реакції з міченими антитілами.

Література для засвоєння знань-умінь за даною темою:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. Л.Б.Борисова, А.М.Смирновой. М.: Медицина,2005. –С. С.307, 325-327.

2. Микробиология, под ред А.А. Воробьева и др. –М. Медицина, 1994.-С.175-181.

3. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология.- К.: Вища школа, 1992.- С.173-176, 192-204.

4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Л.Б.Борисова. М.: Медицина, 1984.-С.107-122, 235.

5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология /Под ред. А.А. Воробьёва.- М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2008 – с. 289-293.

6. Соколова І.Є., Вінніков А.І., Полішко Т.М. Основи імунології. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007 – с. 496-499.

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

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

Орієнтовна основа дії при виконанні практичної роботи.

1. Провести ідентифікацію вірусу грипу у ХАР (хоріоналантоїсна рідина) за допомогою реакції гальмування гемаглютинації (РГГА). Діагностичні сироватки тип А і В взяти в розведеннях от 1:10 до розведення, яке відповідає титру вірусу (наприклад 1:160). До них додається невідомий вірус, що міститься в ХАР (0,2 мл). Після інкубації на протязі 60 хвилин у термостаті при t 37^0С в усі лунки додається суспензія ерітроцитів 0(1) групи – 0,4 мл. Інкубація 30-60 хвилин. Результати реакции враховують по відсутності гемагглютинации до титру вірусу. Дані занести до протоколу, зробити висновок про тип вірусу.

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

3. Провести серологічну діагностику вірусної інфекції в реакції непрямої гемаглютинації (демонстрація). РНГА наступає, коли до еритроцитів, сенсибілізованих антигеном, тобто таких, що несуть на собі адсорбований антиген, додають імунную сироватку, відповідну антигену. РНГА з еритроцитами проводять з відомим антигеном для виявлення антитіл або з відомими антителами для виявлення антигену. РНГА ставиться з парними сироватками, отриманими на початку і наприкінці захворювання. До 05, мл сироватки, розведеної від 1:10 до 1:1280 в лунку планшета додають 0,25 мл еритроцитарного діагностикуму. На 2 години ставлять в термостат при 37 ºС. У якості позитовного контролю використовують нормальний імуноглобулін людини (НІЛ). У якості негативного контролю використовують діагостикум без сироватки. Титром гемаглютинації є розведення сироватки, яке визиває склеювання еритроцитів при повнім просвітлюванні надосадної рідини. Результати досліджень занести до протоколу. Наявність агглютинації еритроцитів "++". Відсутність агглютинації ознака – мінус.Титром вірусу є найбільше розведення сироватки, де спостерігається аглютинація еритроцитів.

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

Реакція імунофлюорісценції— РІФ (метод Кунса) — заснована на тому, що Апg, оброблений імунними сироватками з антитілами, міченими флюорохромами, здатний світитися в ультрафіолетових променях люмінесцентного мікроскопу (прямий метод). Реакція Кунса може бути використана як для виявлення антигенів, так і для визначення антитіл. Різновид — непрямий метод Кунса (РНІФ). Застосовується одна універсальа флюоресцируюча сироватка - антиглобулінова. На утвореному комплексі (специфічні антитіла –досліджуваний антиген) фіксуються флюоресцируючі антиглобулінові антитіла, які визивають світіння при люмінісцентній мікроскопії. **Імуноферментний аналіз (ІФА)** — виявлення антигену за допомогою відповідних йому антитіл, кон'югованих з ферментом — міткою (пероксідазою хріну, в-галактозидазою, чи лужною фосфатазою). Після з'єднання антигену з міченою ферментом імунною сироваткою у суміш додають субстрат і хромоген. Субстрат розщеплюєгься ферментом, і його продукти деградації викликають хімічну модифікацію хромогену. При цьому хромоген змінює колір — інтенсивність фарбування прямо пропорційна кількості молекул антигену та антитіла, що зв'язалися.
Найбільш розповсюджений твердофазний ІФА — варіант імунологічного тесту, коли один з компонентів імунної реакції (антиген чи антитіло) сорбований на твердому носії, наприклад у лунках мікропанелей з полістерола. При визначенні антитіл в лунки із сорбованим антигеном послідовно додають сироватку крові хворого, антиглобулінову сироватку, мічену ферментом і суміш розчинів субстрату для ферменту і хромогену. Щораз після додавання чергового компоненту з лунок видаляють реагенти, що не зв'язалися, шляхом ретельного промивання. При позитивному результаті змінюється колір розчину хромогену. Твердофазний носій можна сенсибілізувати як антигенами, так і антитілами. Тоді в лунку з сорбованими антитілами вносять шуканий антиген, додають імунну сироватку проти антигену, мічену ферментом, а потім суміш розчинів субстрату для ферменту та хромогену. ІФА застосовують для діагностики вірусних, бактеріальних і паразитарних хвороб, зокрема для діагностики ВІЛ-інфекцій, гепатиту В та ін, атакож визначення гормонів, ферментів, лікарських препаратів, інших біологічно активних речовин, що містяться в досліджуваному материалі в мінорних концентраціях 10^{-10}— 10^{-12} г/л.
Радіоімунологічніій аналіз (РІА) — високочутливий метод, заснований на реакції Ang + Ant з застосванням антигенів чи антитіл, мічених радіонуклеідом (125І, 14С, 3Н, 5ІСг та ін). Після їх взаімодії відокремлюють радіоакгивний імунний комплекс, що утворився, і визначають його радіоактивність у відповідному лічильнику (ß чи γ -випромінювання): інтенсивність випромінювання прямопропорційна кількості молекул антитіл чи антигенів, що зв'язалися. Показання до застосування ті ж, що і в ІФА. Метод представляє певну екологічну небезпеку.
Імуноблотінг — високочутливий метод, заснований на сполученні електрофорезу і ІФА чи РІА. Антиген виділяють за допомогою електрофорезу в

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

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

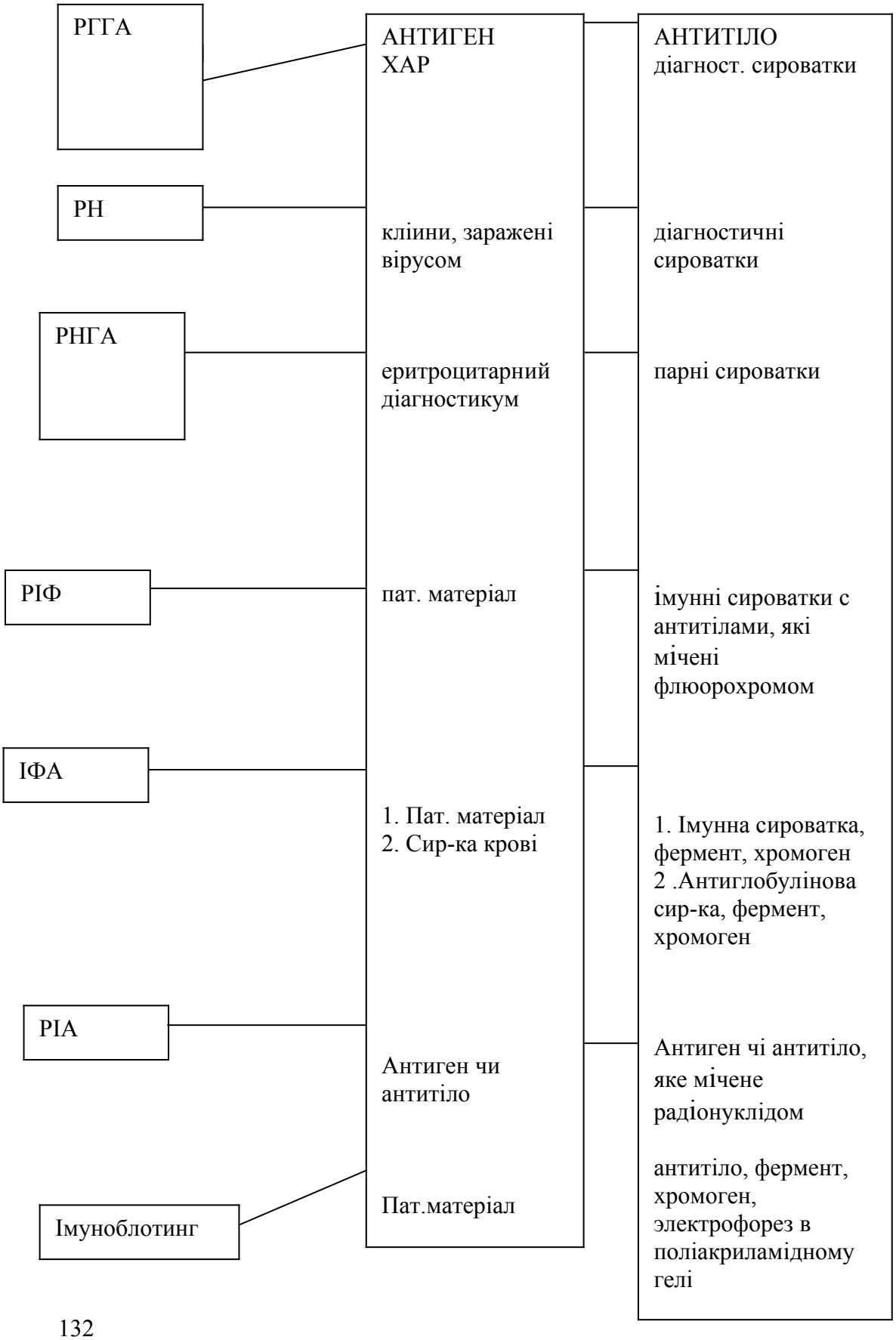
Після ознайомлення з теоретичними питаннями і ходом проведення експерименту вам пропонується виконати наступні навчальні завдання:

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

Додаток 1.

Граф логічної структури теми:

Серологічні реакції в вірусології



Додаток 2.

Зразок протоколу
до практичного заняття № 19

Серологічні реакції в вірусології

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

Завдання 1 :Ідентифікація вірусу грипу в РГГА (демонстрація)

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

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

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

(+) - ЦПД

(-) - відсугність ЦПД

Висновок: реакція нейтралізації вірусу відбулася із сироваткою групи_____ отже _____

Завдання 3. Серодіагностика кору в РНГА.

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

+ + + + - повна гемаглютинація (“парасолька”)

+ + + - чітка гемаглютинація

+ + - часткова гемаглютинація

+ - слабовиражена гемаглютинація

(-) - відсутність гемаглютинації (“гудзэчок”)

Висновок: _____

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

Дата _____ Підпис викладача_____

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

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

Еталони відповідей до завдань для самоперевірки і самоконтролю вихідного рівня знань-умінь

Практична робота №1

1. Роздільна здатність – це найменша відстань між двома точками, на якій вони ще не зливаються в одну, сприймаються як окремі об‘єкти. Роздільна здатність людського ока становить приблизно 0,2 мм. Якщо мікроскоп дає збільшення, наприклад, у 100 разів, то його роздільна здатність буде 0,2/100=0,002 мм.
2. Зображення буде збільшене та перевернуте. Тому, щоб при мікроскопії пересунути поле зору праворуч, препарат треба перемістити ліворуч.
3.Через різний коефіцієнт заломлення відбувається розсіювання світла. Щоб запобігти цьому та забезпечити потрібне освітлення препарату, при мікроскопії використовують імерсійну рідину, яка має коефіцієнт заломлення близький до скла.
4. Люмінесценція – здатність поглинати випромінювання з високою енергією та випромінювати з низькою. Мікроорганізми, що не мають власної здатності до люмінесценції, можна обробити спеціальними барвниками – флюорохромами.
5. У світловий мікроскоп не можливо побачити об‘єкт, який за розмірами менший за довжину світлової хвилі у видимій частині спектру. У електронному мікроскопі використовується випромінювання з меншою довжиною хвилі.

Практична робота № 2

1.- а, б, г, д, з, к, м. **2.-** До основних форм клітин відноситься кулевидна, багатокутова, призматична, веретеноподібна, зірковидна. Форма клітин залежить від взаємовідносин клітинних груп, які входять до складу даної тканини. Одиночні клітини частіше кулевидні. Але важливе значення має функціональний момент. Наприклад, зірковидна форма нервових клітин з відростками обумовлена функцією передачі нервового імпульсу з однієї частини організму в іншу, з однієї нервової клітини на сусідні. Теж саме можна сказати і за м’язові клітини, які мають видовжену, веретеноподібну форму. Їх функції – виконувати розслаблення та скорочення, а в зв’зку з цим зближення чи віддалення одне від одного в різних частинах тіла.

Практична робота № 3

1.-Джгутики, війки, псевдоподії. **2.-** а) білки, б)вуглеводи, в) мінеральні речовини, г) вода, д) мікроелементи. **3.-** а) окуляр, б) дзеркало, в) об єктив, г)конденсор, д)тубус**. 4.** –За допомогою темнополоного мікроскопу розглядають препарати «висяча крапля» або «роздавлена крапля», що дозволяє спостерігати живі мікроорганізми. **5.-** За допомогою хімічних речовин фіксують мазки-відбитки з органів та тканин, мазки крові, а також призначені для виявлення деяких структур бактеріальної клітини за допомогою складних методів фарбування.

Практична робота № 4

1.- а) наявність міцелію, б) стірольний компонент, в) хітін, г) спороутворення, д) розмноження спорами,міцеліем, наявність полового процесу. **2.-** Спороутворення є способом розмноження, а цисти утворюються у несприятливих умовах. **3.-** а) стерігми, б) конідії, в) склероції, г) аски, д) базідії.**. 4.-** Капсула. **5.-**Нагріти.

Практична робота № 5

1. А-3,6; Б-3,5; В-1,2,5; Г-4,7. **2.** Проміжні продукти, можуть включатися до процесів біосинтезу, або розкладатися з виділенням енергії. **3.** За джерелом енергії живі істоти діляться на фототрофи, що використовують для біосинтетичних реакцій енергію сонячного світла, і хемотрофи. Хемотрофи отримують енергію за рахунок окислення неорганічних речовин (нітрифікуючі бактерії та ін.) і органічних сполук (більшість бактерій, у тому числі і патогенного для людини виду). **4.** Фактори росту грають роль каталізаторів в біохімічних процесах клітини і є структурними одиницями при утворенні деяких ферментів. До чинників зростання відносяться різні вітаміни, деякі амінокислоти, пуринові і піримідінові основи та ін. **5.** Дихання (або біологічне окислення) — це складний процес, який супроводжується виділенням енергії, необхідної для синтезу різних органічних сполук. Бактерії, як і вищі тварини, для дихання використовують кисень. Проте Л. Пастером було доведено існування таких бактерій, для яких наявність вільного кисню є пагубним, енергію, необхідну для життєдіяльності вони отримують у процесі бродіння. **6.** Ферменти — біологічні каталізатори, високомолекулярні речовини білкової природи, що продукуються живою клітиною. Вони специфічні і грають найважливішу роль в обміні речовин мікроорганізмів. Специфічність їх пов'язана з активними центрами, що утворюються групою амінокислот, тобто кожен фермент реагує з певною хімічною сполукою та каталізує одну або декілька близьких хімічних реакцій. Наприклад: фермент лактаза розщеплює лактозу, мальтаза — мальтозу і т.д.

Практична робота № 6

1.Мітоз для соматичних клітин та мейоз для статевих. **2.** Неорганічні речовини, у складі яких є атоми, здатні змінювати ступінь окислення, наприклад сульфати або нітрати. **3.** Кислотна. **4.** 3г речовини та 97г розчину.

Практична робота № 7

1,2,3,4-відповідь Е.

Практична робота № 8

1. Клас, порядок, царство. **2.** ДНК забезпечує передачу та збереження генетичної інформації, РНК забезпечує синтез білків. **3**. Фосфоліпіди та білки. **4.** Певні речовини (рецептори) вірусу взаємодіють з рецепторами на поверхні клітини, мембрана інвагінується і утворює внутрішньоклітинну вакуоль. **5**. Паразитизм. **6.** Рестриктаза «розрізає» молекулу ДНК, лігаза з‘єднує її фрагменти.

Практична робота № 9

1. Існування мікрорганизмів за рахунок хазяїна, яке сопроводжується нанесенням урону у вигляді того чи іншого захворювання. **2.** Відсутність білоксинтезуючих систем та систем мобілізації енергії. **3.** Мутантні фібробласти, міобласти відрізняються від ракових клітин тим, що при спроможності розмножуватись безконтрольно (як ракові) можуть зростати без фіксації на твердій поверхні. До внезародкових органів відносяться: амніон, жовточний міхур, алантоіс, хоріон. Алантоіс – орган, який забезпечує водне середовище для розвитку зародку. Жовточний міхур – орган, який депонує поживні речовини, необхідні для розвитку зародку. Алантоіс – проізводне жовточного міхура, яке відіграє важливу роль у забезпеченні дихання та живлення зародку. Хоріон – ворсинкова оболонка – орган регулювання обмінних процесів зародку. **5**. Використання поживних середовищ для клітинних культур, які відрізняються своїм змістом у залежності від мети використання : ростові- для вирощування клітинних культур до внесення вірусу (з великою кількістю сироватки крові), та підтримуючі- для утримання інфікованих вірусом клітин (з малою кількістю чи повною відсутностью сироватки крові).

Практична робота № 10

1- г. **2-** 3, 5, 6. **3-** від генотипу та умов зовнішнього середовища. **4-** ознаки спадкової мінливості передаються наступним поколінням. **5-** 1, 3.

Практична робота № 11

1.Треба взяти з попередньої пробірки 1 мл розчину у розведені(1:10) перенести у другу і додати 9 мл фізіологічного розчину, отримаємо (1:100). **2.** Актиноміцети – променеві гриби, що виглядають як ниткоподібні клітини,нагадують міцелій грибів, не утворюють повітряного міцелію. **3.** R-плазміда визначає стійкість бактерій до різноманітних лікарських препаратів, контролює синтез ферменту, який інактивує антибіотик. R-плазміда має сложну молекулярну структуру. **4.** Відсутність мембран, за допомогою яких органели мікробної клітини відокремленні від цитоплазми. Відсутність ядра, а тількі нуклеоїд, не відокремлений від цитоплазми ядерною мембраною. Відсутність мітохондрій,хлоропластів,комплексу Гольджи. Відсутність мітозу. Відсутність клітиного центру.

Практична робота № 12

1. Ротова порожнина,кишечник. **2.** По найбільшій зоні затримки росту тест-мікроба. **3.** Ліпаза. **4.** Авітаміноз.

Практична робота № 13

1. Організм людини, в середньому, на 65% складається з води. Вода приймає участь у біохімічних, фізіологічних та фізико-хімічних процесах обміну речовин та енергії: травлен-ня, дихання, синтез білків, жирів, вуглеводів.

2. Вміст бактерій в 1 м 3 повітря розраховується за формулою:

$$a \times 1000$$

$$C = \frac{a}{б},$$

де С – кількість бактерій в 1 м 3;
а – вміст бактерій в дослідженому об”ємі повітря;
б – кількість дослідженого повітря.
3. Седиментація – здатність (у тому числі і мікроорганізмів) осідати на поверхні (в тому числі і поживного середовища) через силу тяжіння.
А) На поверхні середовища осідають тільки грубодисперсні фракції аерозолю.
Б) На застосовуваних поживних середовищах росте тільки частина повітряної мікрофлори.
В) Метод зовсім непригодний для дослідження бактеріальної забрудненості атмосферного повітря.

Практична робота № 14
1-а) за рахунок відлущення верхнього шару відмерлих клітин епітелію; б)колаген, розташований, в основному, у саме шкірі і частково у підшкірній клітковині; в)потові залози та сальні залози. **2**- а) № 2 та 3, б) №1,2,5. **3**-а) 1 та 9 мл; б) додати 1 мл слини у першу пробірку, переносити по 1 мл з попередньої пробірки у наступну, а з останньої відібрати 1 мл. **4**- моноцити крові, ретикулярні клітини лімфовузлів, ендотеліальні клітини судин, клітини нейроглії, купферівські клітини печінки.

Практична робота № 15
1- а) пласкі кістки та епіфізи трубчастих кісток; б) за грудиною; в) з лівого боку під ребрами; г) у тонкому кишечнику. **2-** у червоному кістковому мозку. **3-** навколо артерій. **4-** синім кольором. **5-** дрібні округлі клітини з крупним ядром. **6-** з глоткових кишень, активно функціонує у дитячому віці, у дорослих замінюється жировою тканиною. **7-** до глюкопротеїдів.

Практична робота № 16
1-перейде у стан гелю; **2**- г ; **3**- 0,005; **4**-а; **5**- б, пов‘язані всі.

Практична робота № 17
1- б, в, д, е. **2**- ультрафіолетове та рентгенівське випромінювання, окислювачі, аналоги азотистих основ, акридинові барвники , **3-** генотипові зміни передаються у спадок і проявляються у наступних поколінь, а фенотипові зникають при зміні умов середовища, **4**- г.

Практична робота № 18
1- з периферичної крові готують на предметному склі мазок „товста крапля”, фарбують його за Романовським-Гімзою, мікроскопують при збільшенні х 90 під імерсією, підраховуючи кількість клітин різного типу; **2**- г ; **3**- а, г .

Практична робота № 19
1. Репродукція вірусу у заражених клітинах, прявляється у змінах морфології клітин**. 2.** Ig класу М першими з "являються в сироватці крові, тому їх титр більше при гострих інфекціях, а IgG при хронічних. **3.** Гемолітична система

вміщує еритроцити барана, гемолітичну сироватку кролика та комплемент морскої свинки – використовується для РЗК. Гемоліз ерітроцітів вказує на відсутність антигена або антитіла. Хомогени, та флюорохроми зминюють колір при наявністі антигена в патологічному материалі. **4**. Діагностикум вміщує антигени мікроорганізмів та використовується для виявлення антитіл. **5.** Антитоксичні сироватки, лабораторні тварини. **6.** Для виявлення вірусів за склеюванням еритроцитів.

Методична розробка
з самостійної позааудиторної роботи

Тема: Етапи розвитку мікробіології

Актуальність теми:

Вивчання властивостей мікроорганізмів, які оточують нас повсюди – у воді, землі, організмі людини та тварини, з метою використання корисних для людини властивостей мікроорганізмів у різних галузях народного господарства, а також мікроорганізмів, які є збудниками захворювань людини та тварин, з метою впливу на них специфічною терапією та профілактики інфекційних захворювань.

Конкретні цілі (уміти):

1. Визначити основні хронологічні межі розвитку мікробіології.
2. Характеризувати відмінності різних етапів.
3. Трактувати внесок вчених у розвиток мікробіологічної науки.
4. Пояснити завдання медичної мікробіології в сучасний період.

Теоретичні питання:

1. Дати характеристику морфологічному періоду розвитку мікробіології.
2. Чому Л. Пастер вважається основоположником науки мікробіології?
3. Який період розвитку мікробіології дав початок трудам Л. Пастера?
4. Основні відкриття Л. Пастера.
5. Чому Р.Кох є основоположником медичної мікробіології?
6. Що дало практичній медицині труди Р.Коха?
7. Чим характеризується до пастерівський період?
8. Назвіть декілька імен та научні заслуги видатних мікробіологів , у тому числі основоположників імунології та вірусології
9. Роль мікробіологів у досягненнях медицини.

Література:

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.- М.: Медицина, 1994.- С.6-24.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Микробиология.- санкт-Петербург: Специальная литература, 1999.- С. 8-13.
3. Покровский В.И. Медицинская микробиология.- М.: Медицина,2000.- С.1-5.

Короткі методичні вказівки до самостійної роботи:

1. Прочитати за підручником теоретичний матеріал, знайти відповіді на теоретичні питання.
2. Скласти таблицю:

№	назва періоду, хронологічні межі	основні ідеі, відкриття, теорії та гіпотези	видатні вчені

3. Опрацювати тести за темою:

1) Основні етапи у розвитку мікробіології:

А.Морфологічний.

Б.Коховський

В.Пастерівський.
Г.Мечніковський
Д.Сучасний.
2) Пастерівський період розвитку мікробіології охоплює:
А.Першу половину XVIII в.
Б.Другу половину XVIII в.
В.Першу половину XIX в.
Г..Другу половину XIX в.
Д.Початок XX в.
3) Основні заслуги Пастера в мікробіології:
А.Відкриття холерного вібріону
Б.Розробка щільних живильних середовищ
В.Вакцинація проти сказу.
Г. Розробка основ стерилізації.
Д.Научний принцип створювання вакцини
4)Найважливіші заслуги Р.Коха:
А.Розробив вакцину проти сибірської виразки
Б.Відкрив збудника туберкульозу.
В.Розробив основи дезінфекції.
Г.Вакцинація проти оспи
Д.Основоположник вчення забарвлених бактерій
5)Значення робот Пастера та Коха у розвитку медичної мікробіології:
А.Наукове обгрунтування вакцинопрофілатіки
Б.Розкриття механізмів імунітету
В.Створення живильних середовищ
Г.Відкриття збудника чуми
Д.Отримання чистих культур мікроорганізмів
Письмова робота з теми “Етапи розвитку мікробіології” включає заповнену таблицю та відповіді на тести, виконується на окремому аркуші А4.
Робота повинна бути здана не пізніше ніж за два тижні до пдсумкового модульного контролю.
Оформлення письмової роботи:

Самостійна позааудиторна робота

Студента _____групи_____ (ПІПБ)

Модуль 1
Завдання 1 **“Етапи розвитку мікробіології”**

1.Таблиця.

2. Відповіді на тести.

Дата _____ Оцінка _____ Підпис викладача_____

Оцінювання роботи:
За правильно виконану роботу студент отримує оцінку “5” і йому нараховується 4 бали.
Якщо робота містить одну незначну помилку, або неохайно оформлена студент отримує оцінку “4” і йому нараховується 2 бали.
При наявності двох незначних або однієї суттєвої помилки студент отримує оцінку “3” і йому нараховується 1 бал.
За роботу з кількома серйозними помилками, або здану пізніше визначеного терміну студент отримує 0 балів.

Методична розробка
з самостійної позааудиторної роботи

Тема: Морфологія та систематика найпростіших

Актуальність теми:
Широке розповсюдження паразитарних інвазій, велика економічна шкода визначають актуальність вивчення біологічних властивостей патогенних найпростіших. Актуальною є проблема створення в охороні здоров'я населення низки доходів, спрямованих на запобігання та лікування захворювань, в розвитку та розповсюдженні яких беруть участь тварини як переносники збудників паразитарних захворювань, або як проміжними хазяїнами паразитів.
Вивчення медичної протозоології необхідне для засвоєння таких медичних, теоретичних та клінічних наук як: епідеміологія, гігієна, патологічна анатомія, фізіологія та іншим.
Найпростіші дуже широко розповсюджені на планеті у різноманітних середовищах: у морях та океанах, прісній воді, деякі види-у почві. Дуже багато найпростіших мають властивість проживати в інших організмах – рослинах, тваринах, людині. Вони можуть уражати найрізноманітніші органи хазяїна, заселяючи його кишківник, порожнини тіла, кров'яне русло, статеву систему та т. інше. Дуже багато з них призвичаїлись до внутрішньоклітинного паразитизму. Серед найпростіших є чимало видів, які можуть викликати тяжкі, а іноді і смертельні захворювання людини.
Мета (загальна): Вміти трактувати особливості морфології, розмноження найпростіших, основні біологічні властивості збудників, методи їх виявлення, відмінності найпростіших від бактерій.
Конкретні цілі - уміти:
1. Розрізняти основні органели найпростіших: ядро, цитоплазму, війки, жгутики та псевдо події(рух), цитостому (захват їжі).
2. Пояснювати функції органел.
3. Розрізняти за морфологічними ознаками представників різних класів (Sarcodina, Glagellata або Mastgophora, Sporozoa, Infusoria), вміти їх класифікувати.
4. Вибрати метод лабораторної діагностики для диференціювання за морфологічними ознаками.
5. Описувати розповсюдження найпростіших в зовнішньому середовищі у зв'язку з особливостями їх життєвого циклу.
Вихідний рівень знань:
1.Визначати роль основних органоїдів найпростіших
а) функції ядра
б) функції цитоплазми
в) функції війок, джгутиків, та псевдо подій
г) функції цитостому
2.Пояснювати способи дихання найпростіших
3.Описувати способи розмноження найпростіших

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

1. Представники класу Sarcodina мають:
A) війки
B) псевдоподії
C) джгутики
D) цисти

2. Способи розмноження представників класу Infusoria:
A) клітина поділяється навпіл
B) поперечне ділення, або кон'югація
C) продольне ділення, або полове
D) чередування полового та безполого розмноження

3.Які методи фарбування найчастіше використовують для вивчення морфології найпростіших:
A) Граму
B) Романовському - Гімза
C) Ціль - Нільсену
D) Ожешко

4.Який метод мікроскопії слід використовувати для спостереження рухливості найпростіших:
A) елементарної мікроскопії
B) роздавленої краплі при світлопольній мікроскопіїї
C) люмінесцентної мікроскопії
D) фазово контрастної мікроскопії

Еталони відповідей:

1. 1.Представники класу Sarcodina (саркодові або ложноніжки) мають псевдоподії або ложноножки, які служать для переміщення та захвату їжі.
2. 2.Представники класу Infusoria розмножуються шляхом поперечного ділення, часом здійснюється статевий процес-кон'югація.
3. 3.Найчастіше використовується метод фарбування за Романовським-Гімзою, де цитоплазма у найпростіших буде пофарбована у фіолетовій колір, іноді фарбування проводиться розчином Люголя.
4. 4.Для виявлення рухливості найпростіших використовуються методи "висячої" або "розчавленої" краплі.

Інформація для поповнення знань- умінь:

1. Слюсарев А.А., Жукова С.В. Биология с общей генетикой.-М.:Медицина,1987
2. Слюсарев А.А., Жукова С.В. Біологія.-К. :Вища школа,1998
3. Руководство к лабораторным занятиям по биологии(под ред. Богоявленского Ю.К.-М. :Медицина 1979г.)

Теоретичні питання:

1. Що собою являють найпростіші?
2. Які розміри мають більшість найпростіших?
3. Функції найпростіших.
4. Яку ф-цію виконує ядро в житті найпростіших?

5. Які органели розрізняють в цитоплазмі найпростіших?
6. За рахунок чого здійснюється рух найпростіших?
7. Як у найпростіших здійснюється травлення їжі?
8. Дихання найпростіших
9. Що таке „циста" і коли вона виникає у найпростіших?
10.Розмноження найпростіших.

Література:

1. Борисов Л.Б:. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология-М.:, МИА, 2001, с.634-652
2. Дикий И.Л., Литаров В.Е., Гейдерих О.Г. идр. «Медицинская и ветеринарная паразитология»-Харьков, НФАУ, 2004.
3. Дикий И.Л., Сидочук И.И., Холупяк И.Ю. идр. «Микробиология: руководство к лабораторным занятиям – Х.:Изд-во НФАУ, 2002, с.343-393.

Після ознайомлення з теоретичними питаннями вам пропонується виконати наступні навчаючи завдання.

1.Співставте родові назви найпростіших з видовими:

1).Plasmodium	A).hictolitica
2).Trihomonas	B).vaginalis
3).Toxoplasma	C).intestinalis
4).Lamblia	D).gondii
5).Entamoeba	E).malariae

2.Визначте до якого класу відносяться найпростіші ,які пересуваються за допомогою джгутиків:
A).Flagellata або Mastigophora
B).Sporozoa
C).Sarcodina
D).Infuzoria або Ciliata
3.Більшість найпростіших мають розмір:
A). 1-2 мкм
B). 3-150 мкм
C). 300-500 мкм
D).0,5-1мкм
4.Рух найпростіших здійснюється за рахунок:
A). Війок, джгутиків, псевдо подій
B). Коливань
C). Ядра
D). Цисти

Письмова робота.

Замалювати представників різних класів найпростіших; позначити на латинській мові їхні видові назви та назви класів, до яких вони відносяться:
1. Дизентерійна амеба
2. Трипаносома
3. Токсоплазма
4. Балантидій
Робота виконується на окремому аркуші А4.
Оформлення роботи:

Самостійна робота

студента групи _____ , _____ (ПІПБ)

Модуль 1.
Завдання 2: **Морфологія та систематика найпростіших**.

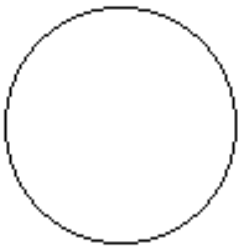


Рис1.

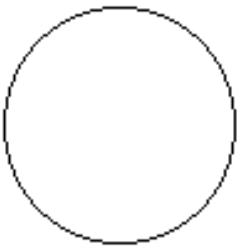


Рис 2.

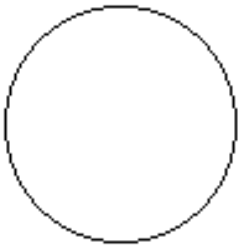


Рис 3.

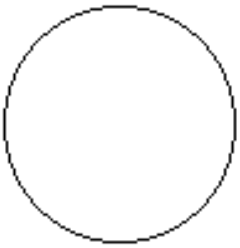


Рис 4.

Відповіді на тести:

Дата _____ Оцінка _____

Підпис викладача_____

Робота повинна бути здана не пізніше ніж за два тижні до пдсумкового модульного контролю.
За правильно виконану роботу студент отримує оцінку “5” і йому нараховується 4 бали.
Якщо робота містить одну незначну помилку, або неохайно оформлена студент отримує оцінку “4” і йому нараховується 2 бали.
При наявності двох незначних або однієї суттєвої помилки студент отримує оцінку “3” і йому нараховується 1 бал.
За роботу з кількома серйозними помилками, або здану пізніше визначеного терміну студент отримує 0 балів.

Граф логічної структури теми

Найпростіші

З М І С Т

Стор.

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
З МЕДИЧНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 1
Тема: Організація бактеріологічної лабораторії. Мікроскопія……. **4**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 2
Тема: Морфологія і структура бактерій. Барвники і прості методи фарбування……... **10**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 3
Тема: Морфологія і структура бактерій. Фарбування бактерій за методом Грама……. **14**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 4
Тема: **Морфологія та структура спірохет, актиноміцетів, грибів. Складні методи фарбування**…… **22**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 5
Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення чистих культур аеробних бактерій……... **29**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 6
Тема: Фізіологія мікроорганізмів. Виділення та ідентифікація чистих культур анаеробних бактерій…….. **37**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 7
Тема: Мікробіологічні основи стерилізації та дезінфекції. Оцінка ефективності стерилізації…… **44**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 8
Тема: **Хімічний склад, морфологія та ультраструктура вірусів. Репродукція вірусів**…… **49**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 9
Тема: **Методи культивування та індикації вірусів**……... **54**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 10
Тема: Генетика мікроорганізмів…….. **59**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 11
Тема: Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики…….. **65**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 12
Тема: Нормальна мікрофлора організму людини. Дисбактеріоз. Пробіотики……... **74**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 13
Тема: Санітарна мікробіологія……. **82**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 14
Тема: **Неспецифічні фактори захисту організму**……... **90**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 15
Тема: **Серологічні реакції (І заняття)**…….. **96**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 16
Тема: Серологічні реакції (ІІ заняття)…… **105**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 17
Тема: Вакцини та сироватки…… **112**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 18
Тема: Імунний статут організму. Імунопатологія……... **119**

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 19
Тема: Серологічні реакції в вірусології…….. **128**

ТЕХНОЛОГІЧНА КАРТА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

ЕТАЛОНИ ВІДПОВІДЕЙ ДО ЗАВДАНЬ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ ВИХІДНОГО РІВНЯ ЗНАНЬ-УМІНЬ..... **136**

МЕТОДИЧНІ РОЗРОБКИ З САМОСТІЙНОЇ ПОЗААУДИТОРНОЇ РОБОТИ

Тема: Етапи розвитку мікробіології…… **141**

Тема: Морфологія та систематика найпростіших…… **144**