

ББК 28.4я722

Л-96

УДК579

Рецензенти: *М.М. Каплін*, проф. Сумського державного медичного інституту; *СІ. Нестеренко*, старший викладач вищої категорії з мікробіології Сумського державного медичного коледжу.

Люта, В.А.

Л 96 Практикум з мікробіології: навч. посібник/В.А. Люта, О.В. Кононов. — К.: Медицина, 2008. — 184 с.

ISBN 978-966-8144-61-5

Люта В.А. — викладач-методист вищої категорії Сумського базового медичного коледжу, *Кононов О.В.* — заслужений працівник освіти України, викладач-методист вищої категорії, директор цього ж навчального закладу.

У практикумі описані алгоритми виконання професійних практичних навичок з мікробіології, тести, ситуаційні задачі, надано рекомендації щодо проведення модульного контролю знань, умінь і практичних навичок студентів з цього предмету.

Для студентів вищих медичних навчальних закладів I—II рівнів акредитації.

ББК 28.4я722

ISBN978-966-8144-61-5

© В.А. Люта, О.В. Кононов, 2008

©Видавництво "Медицина", 2008

ЗМІСТ

Від авторів.....	4
Практичні заняття	5
Модуль I. Загальна мікробіологія	9
Практичне заняття 1. Організація й обладнання бактеріологічної лабораторії.....	9
Практичне заняття 2. Прості та складні методи фарбування препаратів	26
Практичне заняття 3. Поживні середовища. Техніка посіву на поживні середовища	39
Практичне заняття 4. Дезінфекція. Стерилізація	56
Практичне заняття 5. Серологічний метод дослідження	67
Практичне заняття 6. Вакцини. Сироватки. Методи алергодіагностики.....	79
Практичне заняття 7. Модульний контроль з розділу "Загальна мікробіологія"	90
Модуль II. Спеціальна мікробіологія.....	93

Практичне заняття 8. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними коками	93
Практичне заняття 9. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених кишковими бактеріями	105
Практичне заняття 10. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій.....	114
Практичне заняття 11. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених збудниками повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій	123
Практичне заняття 12. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених облігатними анаеробами	137
Практичне заняття 13. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними спірохетами.....	146
Практичне заняття 14. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених рикетсіями, хламідіями, мікоплазмами	157
Практичне заняття 15. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій.....	164
Практичне заняття 16. Модульний контроль з розділу "Спеціальна мікробіологія"	179
Відповіді на тести і ситуаційні задачі	181

**Знання, що не народжені досвідом,
безплідні і помилкові. Леонардо да
Вінчі**

Від авторів

Згідно із Законом України "Про вищу освіту" та реформою медсестринської освіти в Україні відповідно до Болонського процесу в програмі передбачені години на самостійну роботу студентів щодо оволодіння матеріалом.

Автори створили навчальний посібник-практикум, користуючись яким студенти зможуть самостійно опрацювати матеріал і вдосконалити практичні навички.

У практикумі подано розробку занять, в яких дається план, перераховано обладнання для виконання практичної роботи, вказано мету заняття, розроблено алгоритми виконання навичок, наведено контрольні запитання, тести та ситуаційні задачі; надано рекомендації щодо проведення модульного контролю.

Практикум з мікробіології підготовлено відповідно до нової навчальної програми для студентів вищих медичних навчальних закладів I—II рівнів акредитації зі спеціальності "Сестринська справа", враховано також навчальні програми зі спеціальностей "Лікувальна справа" та "Акушерська справа".

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ

Мета практичних занять:

- закріпити теоретичні знання, сформувати вміння користуватися ними в майбутній професійній діяльності;

- сформувати систему професійних практичних навичок щодо виконання певних маніпуляцій, дотримання вимог методики та умов їх виконання, оформлення ділової документації;
- сформувати почуття відповідальності за своєчасність і правильність професійних дій, уявлення про вплив екологічних факторів на здоров'я людей, деонтологічний підхід до хворих, колег по роботі, у побуті.

Приходячи на практичне заняття, студент повинен:

- 1) мати щоденник (загальний зошит), лінійку, ручку, кольорові олівці, маркер, гумові рукавички, спеціальний одяг;
- 2) вивчити теоретичний матеріал за підручником "Мікробіологія" і додатковою літературою.

У підручнику подається тематичний план, рекомендації щодо підготовки та проведення практичних занять. Готуючись до практичного заняття, студент повинен заповнити щоденник за поданим зразком, а після заняття — записати результати виконаної роботи за схемою: вивчили, ознайомилися, виконали; а також відмітити, якими практичними навичками оволоділи.

Контроль теоретичних знань викладач проводить протягом практичного заняття залежно від того, яке питання плану виконується. Підсумкова оцінка виставляється з урахуванням: теоретичної підготовки, виконання практичних навичок, розв'язання ситуаційних задач, ведення щоденника тощо.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 1

I. Оформіть щоденник.

1. Оформіть обкладинку щоденника за зразком:

Щоденник

для практичних занять з дисципліни "Мікробіологія "

студента (ки) _____ групи
зі спеціальності _____

прізвище, ім'я та по батькові студента

прізвище, ім'я та по батькові викладача

2. Оформіть першу сторінку щоденника за зразком:

№	Дата	Тематика практичних занять	Кількість годин	Місце проведення
Модуль 1: Загальна мікробіологія				
1		Організація і обладнання медичної мікробіологічної лабораторії	2	
2		Прості та складні методи фарбування препаратів	2	
3		Поживні середовища. Техніка посіву на поживні середовища	2	
4		Дезінфекція. Стерилізація	2	
5		Серологічний метод дослідження	2	
6		Вакцини. Сироватки. Методи алергодіагностики	2	
7		Модульний контроль з розділу	2	
Модуль II: Спеціальна мікробіологія				
8		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними коками	2	
9		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених кишковими бактеріями	2	
10		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій	2	

№	Дата	Тематика практичних занять	Кількість годин	Місце проведення
3. Заповніть останню сторінку щоденника за зразком.				
№		Перелік практичних навичок	Відмітка про виконання	Всього
1		Організація робочого місця		
2		Виготовлення нативних препаратів		
3		Виготовлення фіксованих препаратів		
4		Фарбування препаратів простим методом		
5		Фарбування препаратів складними методами		
6		Мікроскопування нативних препаратів		
7		Мікроскопування пофарбованих препаратів		
8		Визначення морфології бактерій		
9		Проведення посіву на поживні середовища петлею, шпателем, тампоном		
10		Виготовлення дезінфекційних розчинів		
11		Дезінфекція рук, робочого місця, інструментарію, піпеток, відпрацьованого матеріалу		
12		Підготовка матеріалу до стерилізації; контроль якості стерилізації		
13		Взяття матеріалу для дослідження при різних інфекційних хворобах		
14		Оформлення супровідної документації		
15		Транспортування інфікованого (заразного) матеріалу до		
11		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених збудниками повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій	2	
12		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених облигатними анаеробами	2	
13		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними спірохетами	2	
14		Лабораторна діагностика хвороб, спричинених рикетсіями, хламідіями, мікоплазмами	2	
15		Лабораторна діагностика вірусних інфекцій	2	
16		Модульний контроль з розділу	2	
		Всього:	32	

4. Заповніть 2—3 сторінки щоденника за зразком. Запишіть у щоденник тему і план практичного заняття № 1.

№	Дата	Виконана робота	Оцінка	Підпис викладача
1		Організація й обладнання медичної мікробіологічної лабораторії. План (див. практичне заняття 1)		

II. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 21—26; практикум, с. 9—25).

Модуль I ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Практичне заняття 1

ОРГАНІЗАЦІЯ Й ОБЛАДНАННЯ МЕДИЧНОЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

^ Мета заняття:

- знати основні методи мікробіологічних досліджень;
- уміти описувати морфологічні властивості бактерій;
- уміти мікроскопувати мазки-препарати.

Оснащення: відеофільм "Структура мікробіологічної лабораторії" (екскурсія в лабораторію або схема структури лабораторії), журнал інструктажу з питань техніки безпеки, обладнане робоче місце лаборанта (інструменти, спиртівка, сірники, дезінфекційний розчин, пробірки з ізотонічним розчином натрію хлориду, вата), світловий мікроскоп, імерсійне масло, пофарбовані препарати промислового виготовлення.

План

1. Призначення, структура, обладнання медичної мікробіологічної лабораторії.
2. Організація робочого місця лаборанта.
3. Правила поведінки та техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії.
4. Класифікація за ступенем небезпечності найбільш поширених мікроорганізмів, патогенних для людини.
5. Правила взяття, оформлення та транспортування патологічного матеріалу.
6. Основні методи мікробіологічних досліджень.
7. Ознайомлення з основними методами мікроскопії.
8. Мікроскопія пофарбованих препаратів.

Хід заняття

1. Призначення, структура, обладнання медичної мікробіологічної лабораторії

Завдання 1. Ознайомтеся з призначенням, структурою та обладнанням медичної мікробіологічної лабораторії, організацією робочого місця.

Вимоги щодо влаштування приміщення, безпеки робіт і правил поведінки персоналу мікробіологічної лабораторії викладені в Державних санітарних правилах "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю" (ДСП 9.9.5.-080-02), затверджених МОЗ України 28.01.2002 р. Мета Правил — створення безпечних умов праці, забезпечення індивідуальної та загальної безпеки, запобігання винесенню

інфекцій за межі лабораторії, нещасним випадкам та професійним захворюванням.

Медичні мікробіологічні лабораторії організують при лікарнях, поліклініках, санітарно-епідеміологічних станціях, медичних науково-дослідних інститутах, вищих та середніх спеціальних навчальних закладах.

За призначенням медичні мікробіологічні лабораторії бувають: бактеріологічні, вірусологічні, мікологічні, парази-тологічні, імунологічні. Окремо існують лабораторії для діагностики особливо небезпечних інфекцій, шкірно-венеричних інфекцій, а також туберкульозу.

Завдання медичної мікробіологічної лабораторії

1. Діагностичні дослідження при інфекційних хворобах проводять з метою:

- 1) виявлення збудника або ДНК і продуктів його метаболізму в матеріалі, що досліджується;
- 2) визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків;
- 3) виявлення імунної відповіді макроорганізму на проникнення мікроорганізму.

2. Профілактичне обстеження населення для виявлення носіїв патогенних мікроорганізмів.

3. Санітарно-мікробіологічне обстеження об'єктів навколишнього середовища (води, харчових продуктів, повітря тощо) з метою стеження за циркуляцією збудників та запобігання поширенню інфекцій.

4. Наукові дослідження з метою вивчення властивостей збудників інфекційних хвороб, вдосконалення методів мікробіологічної діагностики, створення ефективних препаратів для профілактики та лікування інфекційних хвороб.

Робота мікробіологічної лабораторії в комплексі з іншими медичними і немедичними установами спрямована на зниження захворюваності населення і оздоровлення довкілля.

У Структура мікробіологічної лабораторії

Медична мікробіологічна лабораторія — це складний самостійний структурний підрозділ медичного закладу, що виконує експериментальні, діагностичні або виробничі роботи з патогенними біологічними агентами. Специфіка роботи потребує ізоляції її від інших приміщень. Вимоги до планування та складу приміщень лабораторії, їх обладнання залежать від конкретних задач, обсягу досліджень, призначення, централізації лабораторної служби. Лабораторія має бути забезпечена водопроводом, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, а також бути газифікованою.

На вхідних дверях потрібно позначити: назву лабораторії і міжнародний знак "Біологічна небезпека" (мал. 1). Двері повинні мати кодові замки.

Приміщення мікробіологічної лабораторії за ступенем небезпеки для персоналу ділять на три зони: "заразна" зона — приміщення, в яких проводять роботу з біологічним матеріалом; "умовно-заразна" зона — приміщення, в яких проводять роботу із незараженим біологічним матеріалом; "чиста" зона — приміщення, в яких не проводять роботу з біологічним матеріалом.

Приміщення лабораторії слід розташовувати відповідно до ходу виконання аналізів і

мати раціональне розміщення

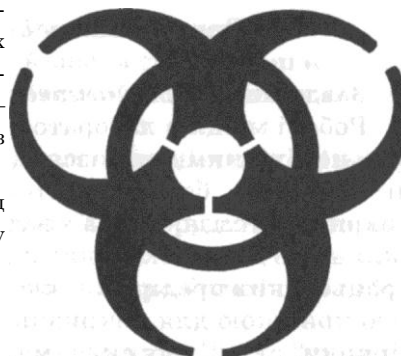
Мал. 1

міжнародний знак

щодо основних потоків техно-

логічного процесу. Дослідження патологічного матеріалу проводять у лабораторній кімнаті.

Лабораторна кімната має бути просторою, світлою, непрохідною. Для зручності оброблення дезінфекційними розчинами і миття стіни облицьовують



"Біологічна небезпека"

глазурованою плиткою на висоту 1,5 м або фарбують олійною фарбою світлих тонів. Поверхня дверей, підлоги має бути рівною, без виступів, легко митися, стійкою до дезінфекційних засобів. Робочі поверхні столів потрібно робити із водонепроникного, кислото- і лужностійкого, незгораючого матеріалу, який не псується від оброблення вогнем і дезінфекційними розчинами. Столи, на яких проводять мікроскопію, розміщують біля вікон.

Оснащення бактеріологічної лабораторії має забезпечувати умови для праці персоналу. В ній слід розмістити: термостати, холодильники, стерилізатори, центрифуги, дистиллятор, нагрівальні прилади. Лабораторна кімната має бути обладнана водопроводом. Раковини зі змішувачами холодної та гарячої води розміщують біля виходу. Біля раковини встановлюють пристрої, в яких мають постійно знаходитись розчини для дезінфекції рук і мийні засоби. У лабораторній кімнаті повинні бути мікроскопи, інструменти для виконання досліджень.

Дослідження в стерильних умовах проводять у боксах.

Площа **боксу** має бути розрахована на роботу одночасно двох осіб. Перед роботою і після неї приміщення боксу обробляють дезінфекційними розчинами і опромінюють бактерицидними лампами.

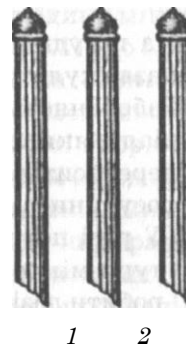
2. Організація робочого місця лаборанта

Завдання 2. *Ознайомтеся з організацією робочого місця.*

Робочі місця в лабораторії мають бути постійно оснащені всім необхідним для повсякденної роботи. Для роботи потрібні спиртівка, бактеріологічна петля (мал. 2), предметні та покривні стекла, банка з ватою, пінцет, ножиці, скальпель; склянки з дезінфекційними розчинами для піпеток і для відпрацьованих предметних стекел; невелика склянка з притертою кришкою для покривних стекел; фіксатори для мазків, сірники, олівці для скла (маркер), гумові груші, 70 % етиловий спирт для оброблення рук, пробірки з ізотонічним розчином натрію хлориду; мікроскоп, імерсійне масло.

Перед початком роботи предмети на столі потрібно розмістити так, щоб середина столу була вільною. Дезінфекційні розчини для оброблення рук, посудина для піпеток, банка для відходів мають бути розміщені справа від працівника на відстані, що дає змогу, не встаючи з робочого місця, обробляти руки, занурювати в дезінфекційний розчин піпетки й інший відпрацьований матеріал. Спиртівка повинна знаходитись у центрі столу на відстані 30 см від його краю. Об'єкти з посівами, незасіяні поживні середовища розміщують зліва на однаковому рівні зі спиртівкою.

Для фарбування мазків обладнують спеціальне місце, на якому потрібно мати барвники, спирт, пісочні годинники, про-мивалку з дистильованою водою, лоток із місточком, пінцет, фільтрувальний папір.



Мал. 2. Бактеріальна голка (1) і бактеріальні петлі: 2, 3 – виготовлені неправильно, 4 – виготовлена правильно

3. Правила поведінки та техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії

Завдання 3. *Вивчіть правила поведінки та техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії, поставте свій підпис в журналі інструктажу з питань техніки безпеки.*

Правила поведінки і техніки безпеки спрямовані на:

— профілактику внутрішньолабораторного зараження персоналу;

- запобігання потраплянню патогенних мікроорганізмів у навколишнє середовище;
 - захист патологічного матеріалу від забруднення сторонньою мікрофлорою.
- Правила поведінки і техніки безпеки в мікробіологічній лабораторії

1. Під час виконання роботи в "заразній" та "умовно-заразній" зонах персонал повинен працювати в спеціальному одязі: халат, шапочка, змінне взуття, гумові рукавички; у боксі — в стерильному спеціальному одязі: халат, шапочка, маска, бахіли, гумові рукавички.
2. Робоче місце утримувати в чистоті і порядку.

Увага! Забороняється носити взуття із тканини та з відкритим носком!

3. На посудинах із культурою мають бути чітко написані назва культури, реєстраційний номер, дата посіву.
4. Забороняється переливання бульйонних культур і матеріалу, який досліджується, із однієї посудини в іншу, він переноситься піпеткою так, щоб не інфікувати горловину посудини.
5. У разі потрапляння патологічного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл їх негайно слід обробити дезінфекційним розчином.
6. Відпрацьований заразний матеріал, культури мікроорганізмів знезаражують в автоклаві чи заливають дезінфекційним розчином, занурюють у дезінфекційний розчин або спалюють.
7. У лабораторії не допускають зайвих рухів, сторонніх розмов.
8. Всі маніпуляції проводять таким чином, щоб уникнути виникнення аерозолів.
9. Категорично забороняється пити воду, їсти, палити.
10. Після закінчення роботи поживні середовища з посівами поміщають у термостат, культуру мікроорганізмів — у холодильник і опечатують їх; інструменти, прилади ставлять на відведені для них місця, стіл протирають дезінфекційним розчином, руки обробляють 70 % етиловим спиртом і ретельно миють із милом.
11. Персонал лабораторії повинен мати щеплення проти тих інфекцій, збудники яких можуть бути в патологічному матеріалі, що досліджується.

Режим роботи мікробіологічної лабораторії визначається ступенем небезпечності мікроорганізмів, які можуть перебувати в патологічному матеріалі.

4. Класифікація за ступенем небезпечності найбільш поширених мікроорганізмів, патогенних для людини

Завдання 4. Ознайомтеся з класифікацією за ступенем небезпечності найбільш поширених мікроорганізмів, патогенних для людини.

За ступенем небезпечності патогенні для людини мікроорганізми та їх токсини поділяють на 4 групи (табл. 1). До I і II груп відносять збудників висококонтагіозних (від лат. *contactus* — дотик) інфекційних хвороб, які характеризуються важкими та стійкими розладами здоров'я у значній кількості хворих, високим рівнем смертності та швидким поширенням серед населення, їх називають особливо небезпечними інфекціями. Дослідження матеріалу, зараженого або підозрілого на зараженість цими збудниками, проводять в окремих лабораторіях, режим роботи яких регламентується "Інструкцією про протиепідемічний режим роботи з матеріалом, зараженим або підозрілим на зараженість збудниками інфекційних хвороб I—II груп".

До III групи відносять збудників інфекційних хвороб, що характеризуються тяжкими або стійкими розладами здоров'я в окремих хворих і становлять небезпеку для їх життя і здоров'я. Дослідження матеріалу, зараженого або підозрілого на зараженість цими збудниками, проводять у бактеріологічних лабораторіях санітарно-епідеміологічних і лікувальних закладів.

До IV групи належать збудники токсикоінфекцій і гострих бактерійних отруень, збудники ентеритів, сепсису, представники нормальної мікрофлори людини, в тому числі санітарно-показникова мікрофлора.

ТО	Види збудників
----	----------------

Таблиця 1. Патогенні для людини мікроорганізми

CO CL L	Види збудників					
	Бактерії	Рикетсії	Гриби	Найпростіші	Хламідії	Віруси
I	Збудник чуми					Збудники натуральної віспи, кримської геморагічної гарячки, гарячки Ебола, Ласса, Марбург

Гру	Бактерії	Рикетсії	Гриби	Найпростіші	Хламідії	Віруси
II	Збудники сибірки, сапу, бруцельозу, туляремії, легіонельозу, лептоспірозу, холери	Збудники епідемічного висипного тифу, ендемічного висипного тифу, Ку-гарячки	Збудники бласто-мікозу, кокцидіозу, гістоплазмозу		Збудники орнітозу	Збудники гепатиту В, Д, С, сказу, СНІДу, ящуру
III	Збудники коклюшу, дифтерії, туберкульозу, менінгококової інфекції, гонореї, дизентерії, черевного тифу, ботулізму, правця, сифілісу, актиномікозу	Збудники кліщового висипного тифу Північної Азії, волінської, марсельської гарячок	Збудники канди-дозу, аспергі-льозу	Збудники лейшманіозу, малярії, трихомоні-азу	Збудники трахоми, пневмонії	Збудники грипу А, В, С; гепатиту А, Е; поліомієліту, простого герпесу, вітряної віспи, цитомегалії, вірус Епштейна—Барр
IV	Збудники паракоклюшу, газової гангрені, ешері-хії, сальмонели, стафілококи, стрептококи, клебсієли, синьогнійна паличка, протей, мікоплаз-ма		Мукор, пеніциліум, трихофітон	Токсоплазма, балантидій, патогенна (дизентерійна) амеба		Аденовіруси, віруси ЕСНО, збудники парагрипу, епідемічного паротиту, кору, краснухи

Робота з цими збудниками вимагає дотримання звичайного режиму, який забезпечує надійний захист персоналу від вну-трішньолабораторного зараження, надійне знезараження матеріалу, а також виключає можливість поширення інфекцій за межі лабораторії.*

5. Правила взяття, оформлення та транспортування патологічного матеріалу

Завдання 5. Вивіть, який матеріал підлягає мікробіологічному дослідженню та як його доставляють до лабораторії.

На мікробіологічне дослідження у хворих відбирають патологічний матеріал для діагностики інфекційних хвороб, у здорових людей — з метою профілактичного обстеження та з навколишнього середовища — для виявлення патогенних мікроорганізмів або визначення його санітарного стану.

У лабораторію доставляють від людей: випорожнення, блювотні маси, промивні води шлунка, бронхів, мокротиння, кров, сечу, виділення з ран, гній, мазки зі слизових оболонок, зскрібки, спинномозкову рідину, жовч, вагінальні виділення, жіноче грудне молоко, пунктат кісткового мозку, лімфатичних вузлів, абсцесів, біопсійний та секційний матеріал тощо; з навколишнього середовища: воду, ґрунт, повітря, харчові продукти, трупні тварин та ін.

Увага! Будь-який матеріал, що надходить на дослідження до лабораторії, розглядається як потенційно небезпечний!

Патологічний матеріал відбирають стерильним інструментом (тампоном, шприцем, шпателем, піпеткою та ін.) і вміщують у стерильний посуд (банки, пробірки, флакони, плевальниці); зразки крові, сироваток крові потрібно доставляти у флаконах, пробірках, герметично закритих гумовими пробками, або у пробірках типу "Епендорф"; матеріал із навколишнього середовища для санітарно-бактеріологічного дослідження вміщують у нові поліетиленові пакети, стерильні пляшки, банки, стерильний пергаментний папір і ретельно пакують.

До кожної проби додають етикетку, на якій вказують номер і назву матеріалу, заклад (відділення) або місце його взяття, прізвище, ім'я та по батькові хворого, на етикетках до проб на санітарно-бактеріологічне дослідження вказують: ферму, підприємство, джерело води, дату і час взяття матеріалу. Крім етикетки заповнюють бланк направлення за затвердженим зразком, у якому вказується заклад (відділення) або місце взяття

! :■: *Ич уцького* ЕДИМНОГО КОЛЕДЖУ

матеріалу, номер і назва матеріалу, кратність направлення матеріалу (первинно чи повторно), прізвище, ім'я та по батькові хворого, його вік, дата захворювання, попередній діагноз, дані про лікування хворого антибіотиками та іншими антимікробними препаратами, мета дослідження, дата і час взяття матеріалу, прізвище і посада особи, яка направляє матеріал для мікробіологічних досліджень.

Загальні вимоги до взяття і транспортування матеріалу

1. Взяття матеріалу слід здійснювати до вживання хворим антибіотиків та інших антимікробних препаратів, а якщо це неможливо, то після відміни їх вживання хворим через 2—3 доби.
2. Необхідно захистити матеріал від забруднення сторонньою мікрофлорою, тобто чітко дотримуватися правил асептики. Особливо це стосується тих матеріалів, які в нормі не містять мікроорганізмів, — крові, спинномозкової рідини, лімфи тощо.
3. Характер і кількість матеріалу, який забирається, повинен бути скоригований з урахуванням клінічної картини, патогенезу, строків захворювання, його тяжкості тощо.
4. Необхідно виключити можливість інфікування осіб, які беруть і доставляють матеріал, і забруднення довкілля мікробами.
5. Максимальне скорочення строків з моменту взяття матеріалу до його доставки у мікробіологічну лабораторію — не більше ніж 2—3 год.

Транспортується матеріал на спеціальному транспорті або переноситься в бідсах, сумках-холодильниках, пластикових футлярах, термосах, стійких до автоклавування та дії дезінфектантів. Матеріал, що вміщує мікроорганізми, нестійкі в навколишньому середовищі (збудники коклюшу, менінгококової інфекції), під час транспортування обкладають ватою та грілками. Направлення на дослідження упаковують окремо.

Увага! Забороняється обертати направлення навколо посудини з об'єктом дослідження.

Зразки і посуд, в якому надходить матеріал для дослідження, поверненню не підлягають!

6. Основні методи мікробіологічних досліджень

Завдання 6. ***Ознайомтеся з принципами основних методів мікробіологічних досліджень.***

Важливою умовою ефективності лабораторних досліджень є доцільний вибір методу. Основні вимоги, яким мають відповідати сучасні методи, — це висока

специфічність і чутливість. У сучасних мікробіологічних лабораторіях використовуються такі методи.

Мікроскопічний — виявлення збудника під мікроскопом у мазках, виготовлених із патологічного матеріалу. Застосовують для діагностики гонореї, сифілісу, туберкульозу, малярії тощо.

Бактеріологічний (вірусологічний, культуральний) — посів патологічного матеріалу на поживні середовища, зараження культури клітин, курячих ембріонів, виділення чистої культури збудника та його ідентифікація. Використовують для діагностики більшості хвороб бактеріальної, вірусної, грибової природи: черевного тифу, чуми, мікроспорії, грипу та ін. Нині розроблено автоматичні аналізатори, за допомогою яких протягом декількох годин (4—24) можна визначити вид збудника.

Біологічний (експериментальний) — зараження лабораторних тварин патологічним матеріалом для моделювання інфекції або виділення та ідентифікації збудника. Застосовують для виділення чистої культури пневмокока, збудника туляремії, діагностики туберкульозу та ін. Біологічний метод використовують також для виявлення мікробних токсинів, під час харчових отруєнь (ботулізм), при хворобах (правець, газова гангрена) тощо.

*Імунологічний (серологічний, від лат. *serum* — сироватка)* — виявлення специфічних антитіл у сироватці крові або антигенів у патологічному матеріалі. Для цього використовують імунні реакції.

Молекулярно-генетичний — виявлення РНК або ДНК збудника в патологічному матеріалі. Для цього використовують:

- а) метод гібридизації ДНК або РНК (метод ДНК-, РНК- зондів);
- б) метод ЛПР.

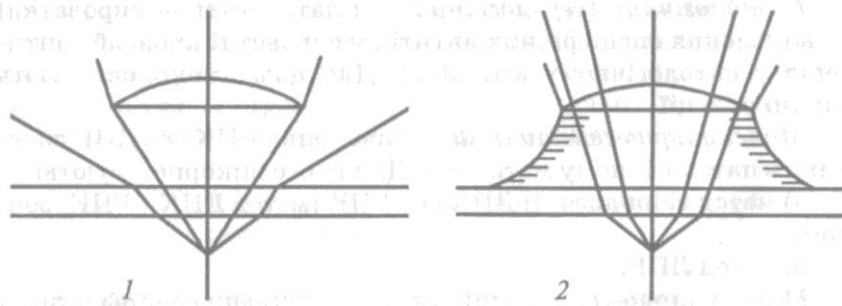
Молекулярно-генетичний метод найбільш специфічний і чутливий, він дає змогу ідентифікувати будь-який біологічний об'єкт навіть за незначної концентрації його нуклеїнових кислот у досліджуваному матеріалі. Метод ЛПР дає змогу виявити 1 молекулу нуклеїнової кислоти в зразку, що досліджується.

7. Ознайомлення з основними методами мікроскопії

Завдання 7. *Ознайомтеся з основними методами мікроскопії.*

Світлова мікроскопія проводиться за допомогою звичайних біологічних мікроскопів. Вона ґрунтується на тому, що світло, відбите поверхнею дзеркала, проходить через систему лінз конденсора Аббе і попадає на препарат, потім в об'єктив, окуляр і далі сприймається оком дослідника. У такий спосіб дослідник бачить уявне збільшене зображення об'єкта. Під час мікроскопії мікробіологічних препаратів слід користуватися імерсійним об'єктивом. В імерсійних системах використовують імерсійне масло (кедрове, персикове), об'єктив позначають "МІ" (масляна імерсія), або воду, об'єктив позначають "ВІ" (водна імерсія). Крім того, масляний об'єктив має на своїй поверхні чорне кільце, водний — біле. Імерсійне масло чи вода мають коефіцієнт заломлення світла, близький до такого, як у скла. Світлові промені, проходячи через предметне скло препарату, потрапляють у краплю імерсійної рідини і далі в об'єктив, не змінюючи напрямку, тому не розсіюються (мал. 3). Це забезпечує краще освітлення об'єкта і посилює чіткість зображення.

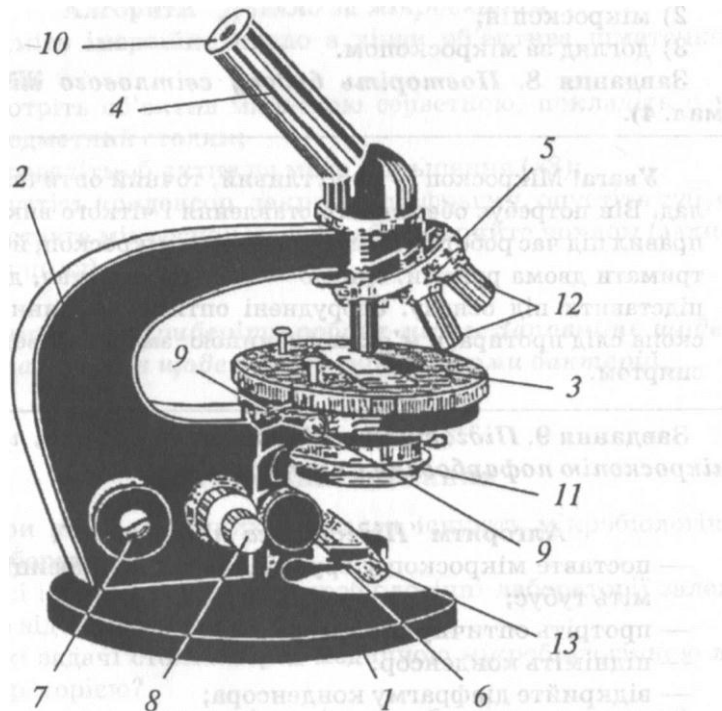
Цей вид мікроскопії використовують здебільшого для вивчення пофарбованих препаратів, тому на світлому фоні видно забарвлений непрозорий об'єкт.



Мал. 3. Хід променів у сухій (1) та імерсійній (2) системах

Крім світлової використовують темнопольну, фазовоконтрастну, люмінесцентну та електронну мікроскопію. Темнопольну і фазовоконтрастну мікроскопію використовують для вивчення мікроорганізмів у живому стані. За допомогою люмінесцентної мікроскопії виявляють мікроби безпосередньо в патологічному матеріалі. Цей метод найбільш інформативний (можна виявити мікроорганізми навіть у невеликій кількості) і швидкий. Такий метод виявлення патогенних мікробів у патологічному матеріалі називається експрес-діагностикою.

Під час електронної мікроскопії зображення об'єкта збільшується в мільйони разів, що дає змогу вивчати структуру мікроорганізмів на субклітинному



Мал. 4. Будова мікроскопа. Механічна система мікроскопа:

1 – основа; 2 – тубусотримач; 3 – предметний столик; 4 – тубус; 5 – револьвер; 6 – гвинт для опускання конденсора; 7 – макрогвинт; 8 – мікро-гвинт; 9 – гвинт для переміщення предметного столика. Оптична система мікроскопа: 10 – окуляр; 11 – конденсор; 12 – об'єктиви (сухі та імерсійні); 13 – дзеркала.

і молекулярному рівнях.

8. Мікроскопія пофарбованих препаратів

У мікробіологічній лабораторії в повсякденній практиці для вивчення морфології і тинкторіальних властивостей мікроорганізмів використовують світловий мікроскоп.

Мікроскопія включає такі етапи:

- 1) підготовка мікроскопа;

- 2) мікроскопія;
- 3) догляд за мікроскопом.

Завдання 8. Повторіть будову світлового мікроскопа (мал. 4).

Увага! Мікроскоп — це чутливий, точний оптичний прилад. Він потребує обережного ставлення і чіткого виконання правил під час роботи з ним. Переносячи мікроскоп, його слід тримати двома руками: однією — за тубусотримач, другу — підставити під основу. Забруднені оптичні частини мікроскопа слід протирати м'якою тканиною, змоченою водою або спиртом.

Завдання 9. Підготуйте мікроскоп до роботи, проведіть мікроскопію пофарбованих препаратів.

Алгоритм "Підготовка мікроскопа":

- поставте мікроскоп у зручну для роботи позицію, підніміть тубус;
- протріть оптичну систему; —
- підніміть конденсор;
- відкрийте діафрагму конденсора;
- встановіть об'єтив (x8);
- освітіть поле зору за допомогою дзеркала.

Алгоритм "Мікроскопія":

- нанесіть краплю імерсійного масла на препарат;
- покладіть препарат на предметний столик;
- переведіть об'єтив з малого збільшення на велике (x90 МІ);
- опустіть обережно об'єтив макровинтами у краплю імерсійного масла (дивитися збоку);
- піднімайте повільно об'єтив макровинтами, доки не з'явиться зображення (дивитися в окуляр);
- встановіть чіткість зображення за допомогою мікровин-та;
- визначте форму мікроорганізмів, їх розміщення, наявність у них спор і капсул;
- підніміть тубус макровинтами;
- зніміть препарат з предметного столика.

Алгоритм "Догляд за мікроскопом":

- зніміть імерсійне масло з лінзи об'єктива шматочком вати;
- протріть об'єктив марлевою серветкою, покладіть її на предметний столик;
- переведіть об'єктив на мале збільшення (x8);
- опустіть конденсор, закрийте діафрагму, опустіть тубус;
- поставте мікроскоп у шафу або накрийте чохлом (захист від пилу).

Завдання 10. Приберіть робоче місце. Заповніть щоденник. Замалюйте в щоденнику основні форми бактерій.

Контрольні запитання

1. При яких медичних закладах існують мікробіологічні лабораторії?
2. Які існують медичні мікробіологічні лабораторії залежно від призначення?
3. Які задачі стоять перед медичною мікробіологічною лабораторією?
4. Яким вимогам має відповідати лабораторна кімната?
5. Чим має бути обладнане робоче місце лаборанта?
6. Яких правил слід дотримуватися під час роботи з патологічним матеріалом?
7. Від чого залежить режим роботи лабораторії?
8. Яких правил слід дотримуватися під час взяття і транспортування матеріалу для дослідження?
9. Які методи використовують під час мікробіологічних досліджень?

Тести

1. Метод дослідження, під час якого проводять посів патологічного матеріалу на поживне середовище:
 - а) мікроскопічний;
 - б) бактеріологічний;
 - в) біологічний;
 - г) імунологічний.
2. На мікробіологічне дослідження відбирають матеріал:
 - а) у хворої людини;
 - б) у здорової людини;
 - в) із навколишнього середовища;
 - г) всі відповіді правильні.
3. Відбір матеріалу проводять:
 - а) до початку лікування антибактеріальними препаратами;
 - б) у процесі лікування;
 - в) не має значення.
4. Час, протягом якого матеріал транспортують до лабораторії:
 - а) 1 год;
 - б) 2 год;
 - в) 1 доба,
 - г) 3—5 год.
5. Імерсійну систему в мікроскопі використовують для:
 - а) збільшення зображення об'єкта;
 - б) посилення чіткості зображення;
 - в) всі відповіді правильні.
6. Експрес-методи діагностики є найбільш:
 - а) точними;
 - б) швидкими;
 - в) досконалими;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. Під час мікроскопії препарату, виготовленого з культури бактерій, використали об'єктив x40. Які були допущені помилки?
2. Під час мікроскопії осаду спинномозкової рідини хворого на менінгіт виявили грампозитивні кулясті бактерії, розміщені у вигляді грона винограду. Наявність яких бактерій можна підозрювати у патологічному матеріалі?
3. Патологічний матеріал, забруднений споровою культурою, знезаражували в автоклаві за температури 110 °С протягом 20 хв. Дайте оцінку цим діям.
4. При інфекційній хворобі клінічний діагноз підтверджують мікробіологічним дослідженням патологічного матеріалу. Як слід упакувати матеріал і направлення до нього?
5. Збудник менінгококової інфекції швидко гине за температури, нижчої за температуру тіла людини. В яких умовах слід транспортувати патологічний матеріал хворого на менінгококову інфекцію?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 2.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 2

1. Ознайомтеся з темою і метою заняття, запишіть у щоденнику тему і план.

- Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 21—39; практикум, с. 26—38).

Практичне заняття 2

ПРОСТІ ТА СКЛАДНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ

Мета заняття:

- навчитися виготовляти мазки-препарати для мікроскопічного дослідження;
- навчитися фарбувати мазки-препарати простим і складними методами;
- навчитися мікроскопіювати мазки-препарати;
- навчитися трактувати результат мікроскопічного дослідження.

Оснащення: світловий мікроскоп, імерсійне масло, в'язкий матеріал (мокротиння або гній), кров, бульйонна культура ешерихій, агарова культура стафілокока, ізотонічний розчин натрію хлориду, предметні стекла, пінцет, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, маркер, банка з ватою, посудина для фарбування, вода для промивання препаратів, барвники (фуксин Пфейффера, метиленовий синій, папірці, пофарбовані за Синьовим, розчин Люголя), 96 % етиловий спирт, фільтрувальний папір для висушування препаратів, пуста чашка Петрі, гумові рукавички.

^ План

- Матеріал для мікроскопічного дослідження.
- Поняття про тинкторіальні властивості мікроорганізмів.
- Виготовлення мазків-препаратів із патологічного матеріалу.
- Виготовлення мазків-препаратів із культури мікроорганізмів.
- Фарбування препаратів простим методом і за Грамом.
- Ознайомлення з методикою фарбування препаратів для виявлення капсул, кислото-, спирто- та лугостійких бактерій, спор, включень.

Хід заняття 1. Матеріал для мікроскопічного дослідження

Виявлення патогенних мікроорганізмів в патологічному матеріалі за допомогою мікроскопа називається **мікроскопічним** методом лабораторної діагностики. Для мікроскопії використовують мокротиння, гній, кров, осад спинномозкової рідини і сечі, мазки зі слизових оболонок, зскрібок з уражених ділянок шкіри, уражене волосся, нігті, а також відбитки уражених органів.

2. Поняття про тинкторіальні властивості мікроорганізмів

Мікроорганізми мають настільки малі розміри, що вивчати їх у незабарвленому вигляді під світловим мікроскопом неможливо, до того ж вони прозорі. Тому частіше їх вивчають у забарвленому стані. Вивчення мікроорганізмів у пофарбованому препараті дає змогу не тільки вивчити їх форму, розміщення, а й виявити деталі структури клітини (спору, капсулу), а також хімічний склад, через те, що різні хімічні речовини проявляють різну спорідненість до барвників і після фарбування мають різний колір або різну інтенсивність забарвлення.

Здатність мікроорганізмів сприймати барвники називають **тинкторіальною** (від лат. *tingere* — настоянка) властивістю.

3. Виготовлення мазків-препаратів із патологічного матеріалу

Для виявлення мікроорганізмів у патологічному матеріалі готують мазки на предметному склі. Предметні стекла готують заздалегідь. їх миють, знежирюють і зберігають в етиловому спирті або суміші Нікіфорова (суміш етилового спирту та

діетилового ефіру 1:1) у широкогорлій банці з притертою пробкою. Перед роботою їх витирають насухо. Тримати скло слід I і II пальцями лівої руки за ребра.

Завдання 1. **Виготовте мазок із в'язкого матеріалу (мокротиння або гною).**

Увага! Під час роботи з патологічним матеріалом дотримуйтесь техніки безпеки.

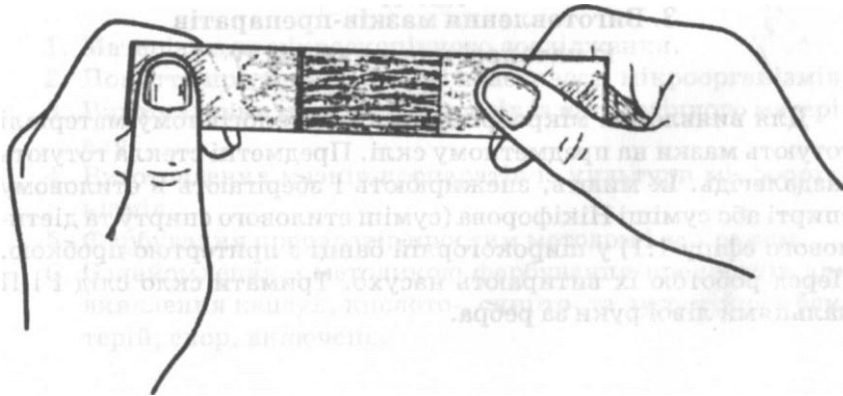
Алгоритм **"Виготовлення мазка із в'язкого матеріалу":**

- протріть насухо 2 знежирених предметних стекла;
- поставте свій номер у верхньому лівому куті кожного скла;
- нанесіть пастерівською піпеткою патологічний матеріал на середину скла;
- накрийте його другим склом так, щоб 1/3 частина кожного скла була вільною, злегка притисніть (мал. 5);
- розведіть стекла в різні сторони, взявши їх за вільні кінці I і II пальцями обох рук;
- залиште мазки на столі для висихання.

Завдання 2. **Виготовте мазок із крові.** Алгоритм

"Виготовлення мазка із крові":

- підготуйте 2 предметних стекла (одне з них повинно бути вужчим і мати шліфований вузький кінець);
- поставте свій номер на ширшому склі;
- нанесіть краплю крові пастерівською піпеткою на ширше скло ближче до правого кінця; поставте друге скло шліфованим кінцем у краплю крові,



Мал. 5. Виготовлення мазка із мокротиння

- нахиліть його вправо під кутом 45°;
- проведіть ним по першому склу справа наліво на 3/4 скла (мал. 6);
- опустіть вузьке скло в дезінфекційний розчин;
- залиште мазок на столі для висихання.

Увага! Правильно виготовлений мазок повинен мати світло-рожеве забарвлення і бути рівномірним за товщиною.

Завдання 3. **Виготовте препарат "товста крапля".** Алгоритм

"Виготовлення препарату "товста крапля":

- підготуйте 2 предметних стекла;
- поставте свій номер на одному з них;
- нанесіть пастерівською піпеткою краплю крові на середину підписаного скла;
- розмажте цю краплю кутом другого скла до величини монети вартістю 1 копійка;
- опустіть друге скло в дезінфекційний розчин;
- залиште препарат на столі для висихання.

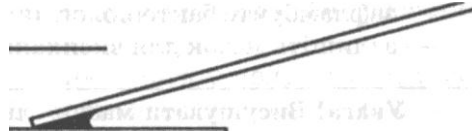
Завдання 4. **Ознайомтеся з методикою виготовлення мазків із слизу, взятого із ротоглотки (зіва), мазків-відбитків з органів і тканин, сечі, спинномозкової рідини.**

1. Виготовлення мазка із слизу, взятого з ротоглотки.

Мазок із ротоглотки беруть стерильним тампоном з мигдаликів, роблять мазок на предметному склі, висушують на повітрі, фіксують хімічним способом.

2. Виготовлення мазків-відбитків з органів і тканин секційного матеріалу.

Поверхню органа припалюють нагрітими бланшами пінцета або нагрітим скальпелем. Зрізають поверхневий шар. З глибини вирізають невеликий шматочок тканини, беруть її пінцетом і прикладають поверхню зрізу до предметного скла декілька



разів. Отримують послідовний ряд мазків-відбитків. Мазки фіксують хімічним способом.

3. Виготовлення мазків із сечі, ліквору (від лат. *liquor* — спинномозкова рідина).

Маленьку краплю рідини (сечі чи ліквору) бактеріологічною петлею наносять на предметне скло і розмазують до розміру монети вартістю 1 копійка. Висушують на повітрі, фіксують хімічним методом.

Увага! Мазки, виготовлені з в'язкого матеріалу і крові, після перевірки викладачем опустіть у дезінфекційний розчин.

4. Виготовлення мазків із культури мікроорганізмів

Мазки з культури мікроорганізмів виготовляють для вивчення їх морфології та тинкторіальних властивостей.

Увага! Під час роботи з живими культурами ретельно дотримуйтесь правил техніки безпеки.

Завдання 5. **Виготовте мазок із бульйонної культури.**

Алгоритм "Виготовлення мазка із бульйонної культури":

- підготуйте предметне скло, нанесіть контури майбутнього мазка;
- переверніть скло (нанесений контур знизу);
- у лівому верхньому куті скла поставте свій номер;
- зафламбуйте скло у полум'ї спиртівки (скло тримати пінцетом);
- покладіть скло у кришку чашки Петрі;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю, візьміть бульйонну культуру;
- нанесіть краплю культури на предметне скло, розітріть;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- залишіть мазок для висихання.

Увага! Висушувати мазки слід на повітрі. Під впливом високої температури структура мікробної клітини порушується.

Завдання 6. **Виготовте мазок з агарової культури.** Алгоритм

"Виготовлення мазка з агарової культури":

- підготуйте предметне скло, нанесіть контури майбутнього мазка;
- переверніть скло (нанесений контур знизу);
- у лівому верхньому куті скла поставте свій номер;
- зафламбуйте скло у полум'ї спиртівки (скло тримати пінцетом);
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- нанесіть краплю стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду на предметне скло;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;

- відкрийте лівою рукою чашку Петрі з ростом культури мікроорганізмів;
- притулите бактеріологічну петлю до стінки чашки Петрі (охолодження петлі);
- візьміть петлею матеріал з однієї колонії;

Увага! Слід брати колонію мікроорганізмів, а не агар!

- закрийте чашку Петрі;
- нанесіть матеріал на суху поверхню скла поряд із краплею ізотонічного розчину натрію хлориду, розітріть;
- рівномірно розмішайте матеріал із краплею ізотонічного розчину натрію хлориду;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- залишіть мазок для висихання.

Увага! Мазок має бути тонким, прозорим, рівномірним, невеликим.

Фіксування мазків. Мазки фіксують для: закріплення матеріалу на склі, знезараження, кращого фарбування (вбиті мікроби краще поглинають барвник).

Для фіксації мазків використовують два способи: фізичний і хімічний.

Фізичний спосіб. Фіксацію проводять у полум'ї спиртівки протягом 6 с. Для цього скло беруть пінцетом або I і II пальцями правої руки і проводять тричі повільно через верхню частину полум'я мазком догори. Правильність фіксації перевіряють, торкаючись нижньою поверхнею скла тильної сторони лівої руки. Мазок повинен бути гарячим, але не обікати руку.

Цим методом фіксують мазки, виготовлені з культури мікроорганізмів, за умови, що під час нагрівання не змінюється структура мікробної клітини.

Хімічний спосіб. Для фіксації використовують хімічні речовини: безводний метиловий спирт — фіксують протягом 5 хв, спирт етиловий 96 % — 10—15 хв, суміш Нікіфорова — 10—15 хв, ацетон — 5 хв, суміш парів хлоридної кислоти і формаліну — декілька секунд.

Хімічним способом фіксують мазки, виготовлені із патологічного матеріалу, а також з культури в тому разі, коли під час нагрівання може порушитися структура бактеріальної клітини (капсульні форми бактерій, спірохети).

Зафіксований мазок називається препаратом.

Завдання 7. Зафіксуйте мазки, виготовлені з агарової і бульйонної культури, фізичним способом.

Алгоритм **"Фіксація мазка фізичним способом":**

- візьміть пінцетом предметне скло з висušеним мазком;
- проведіть тричі через верхню частину полум'я спиртівки;
- доторкніться нижньою поверхнею скла до тильної сторони лівої руки (перевірка правильності фіксації).

Увага! Забороняється залишати на відкритих місцях або в неопечатаних сховищах незафіксовані мазки після закінчення роботи!

5. Фарбування препаратів простим методом і за Грамом

Під час простого методу фарбування використовують один барвник — частіше це фуксин Пфейффера або метиленовий синій. Цей метод ще називається орієнтовним, оскільки його використовують тільки для виявлення мікробів у патологічному матеріалі, визначення їх кількості, форми, взаємного розташування.

Завдання 8. Пофарбуйте препарат, виготовлений з бульйонної культури, фуксином Пфейффера, та препарат, виготовлений із агарової культури, метиленовим синім.

Увага! Принцип фарбування однаковий.

Алгоритм **"Фарбування препарату простим методом":**

- помістіть препарат на підставку в посудину для фарбування;
- нанесіть барвник піпеткою так, щоб він закритий весь препарат;
- проконтролюйте термін дії барвника (фуксин Пфейффера — 1—2 хв, метиленовий синій — 3—5 хв);
- промийте препарат водою;
- висушіть препарат фільтрувальним папером.

Метод фарбування мазків-препаратів за Грамом належить до складних методів, тому що на мазок наносять два барвники, один з яких є основним, а інший — додатковим. Ці методи називають ще диференціальними, оскільки вони дають змогу розрізнити окремі групи бактерій, а також виявити хімічний склад і структуру бактеріальної клітини.

Завдання 9. *Виготовте два мазки: перший — з культури ешерихій, другий — з культури стафілокока. Зафіксуйте їх фізичним способом і пофарбуйте препарати за Грамом.*

Під час фарбування за Грамом бактерії поділяють на 2 групи: грампозитивні (забарвлюються в фіолетовий колір) та грам-негативні (забарвлюються в червоний колір). Різний колір забарвлення пояснюється різною будовою їх клітинної стінки. Основну частину клітинної стінки грампозитивних бактерій складає пептидоглікан — понад 90 %. Він має форму сітки. У грампозитивних бактерій він утворює 5—6, інколи до 40 шарів. Коли бактерії фарбують генціановим фіолетовим, а потім розчином Люголя, то утворюється нерозчинний у спирті і воді комплекс йоду з барвником. Цей комплекс не вимивається спиртом і водою через слабку проникність клітинної стінки (пептидоглі-кану). Грампозитивні бактерії залишаються забарвленими у фіолетовий колір. Дофарбовування препарату фуксином Пфейффера не змінює фіолетового кольору клітин мікроорганізмів.

У грамнегативних бактерій пептидоглікан утворює переважно один шар, зрідка — два. Тому комплекс генціанового фіолетового з йодом легко вимивається спиртом і водою, вна-

2 8-218

слідок чого бактерії знебарвлюються. Знебарвлені бактерії забарвлюються фуксином Пфейффера у червоний колір.

Алгоритм "Фарбування за Грамом":

- покладіть на мазок папірець, пофарбований за Синьовим, змочіть його водою — 2—3 краплі, витримайте 2 хв;
- зніміть папірець пінцетом, нанесіть розчин Люголя — 1 хв (до почорніння);
- нанесіть 96 % етиловий спирт — 20—30 с;
- промийте водою;
- нанесіть фуксин Пфейффера на 1—2 хв;
- промийте водою;
- висушіть препарат фільтрувальним папером.

Завдання 10. *Підготуйте мікроскоп, розгляньте препарат, визначте форму, розміщення та колір бактеріальних клітин.*

6. Ознайомлення з методикою фарбування препаратів для виявлення капсул, кислото-, спирто- та лугостійких бактерій, спор, включень

Для виявлення капсул, кислото-, спирто- та лугостійких бактерій, спор і включень використовують складні методи фарбування.

Для виявлення *капсул* препарат фарбують за Буррі—Гінсом. Для цього на предметному склі культуру змішують із краплею чорної туші, потім роблять мазок іншим предметним склом (як мазок із крові), висушують на повітрі, фіксують хімічним способом і, після промивання водою, наносять фуксин Пфейффера. Потім знову промивають водою і висушують на повітрі. Капсули містять понад 98

% води, тому погано утримують барвник. На темному фоні препарату капсули залишаються безбарвними, клітини бактерій набувають червоного кольору.

Для виявлення *кислотостійких* мікобактерій туберкульозу, лепри, а також деяких актиноміцетів застосовують фарбування препарату за Цілем—Нільсеном. У цих мікроорганізмів у клітинній стінці міститься багато (понад 40 %) ліпідів, воску, оксикислот, що зумовлює їх стійкість до кислот, лугів, спиртів. Вона також малопроникна для розведених барвників, тому для фарбування використовують концентрований барвник (фуксин Ціля), що містить протраву (5 % фенолу). Фарбування проводять при нагріванні (в кип'ячому шарі). За таких умов всі елементи препарату (клітини макроорганізму, стороння мікрофлора і кислотостійкі мікобактерії) набувають червоного кольору. Після оброблення препарату сульфатною кислотою і водою кислотостійкі мікобактерії залишаються червоного кольору, всі інші елементи препарату знебарвлюються. Другим барвником, розведеним метиленовим синім, фарбують без підігрівання, тому він всередину клітини кислотостійких мікобактерій не проникає і вони не змінюють червоного забарвлення. Всі інші знебарвлені елементи препарату набувають синього кольору. При мікроскопії на синьому фоні видно кислотостійкі мікобактерії червоного кольору.

Для виявлення *спор* препарат фарбують за Ожешко. Щоб барвник проник всередину спори, перед фарбуванням мазок обробляють кислотою для розпушування оболонки спори. Після промивання водою його фіксують і фарбують за Цілем—Нільсеном. Вегетативні клітини набувають синього кольору, спора — червоного.

Для виявлення *включень* препарат фарбують за Нейссером. Для цього на препарат наносять синьку Нейссера, потім розчин Люголя, після промивання водою на препарат наносять барвник везувін і знову промивають водою. Вегетативна клітина набуває жовтого кольору, зерна волютину — темно-коричневого. Цей метод фарбування використовують для виявлення зерен волютину (у коринебактерій дифтерії).

Завдання 11. *Оформіть щоденник. Замалюйте в щоденнику кольоровими олівцями вигляд мікроорганізмів під мікроскопом.*

Контрольні запитання

1. Яким вимогам мають відповідати предметні стекла, які використовують для виготовлення мазків?
2. Як виготовити мазок із в'язкого матеріалу?
3. Як виготовити із крові мазок, "товсту краплю"?
4. Як виготовити мазки із слизу, рідини?
5. Як виготовити мазки-відбитки з тканин і органів?
6. Яка різниця у виготовленні мазків з бульйонної та агарової культури?
7. З якою метою фіксують мазки?
8. Які є способи фіксації мазків? У яких випадках їх застосовують?
9. Чим відрізняється препарат від мазка?
10. Чому не дозволяється залишати на відкритих місцях незафіксовані мазки?
11. Які властивості мікроорганізмів називають тинкторі-альними?
12. Від чого залежить вибір барвника і методів фарбування мікроорганізмів?
13. Що таке простий метод фарбування? Які барвники для цього використовують?
14. Які методи фарбування називають складними? Чому їх називають диференціальними?
15. На які групи поділяють бактерії у разі фарбування за Грамом?
16. Чому під час фарбування за Грамом бактерії забарвлюються у фіолетовий або червоний колір?
17. Яку структуру бактеріальної клітини можна виявити у разі фарбування за Буррі—Гінсом?
18. Чому капсули не забарвлюються?
19. Які мікроорганізми виявляють у разі фарбування препарату за Цілем—Нільсеном?
20. Чому кислотостійкі бактерії не забарвлюються розведеними барвниками?

21. Чому під час фарбування за Цілем—Нільсеном різні бактерії забарвлюються в різний колір?
22. Які структури бактеріальної клітини виявляють у разі фарбування за Ожешко?
23. Для чого використовують фарбування за Нейссером? Який вигляд мають бактерії, пофарбовані цим методом?

Тести

1. Мазок перед фіксацією висушують:
 - а) на повітрі;
 - б) над полум'ям спиртівки;
 - в) за допомогою фільтрувального паперу;
 - г) всі відповіді правильні.
2. Не можна фіксувати фізичним способом мазок, виготовлений із:
 - а) бульйонної культури стафілокока;
 - б) агарової культури стафілокока;
 - в) крові.
3. Під час фарбування за Грамом грамозитивні бактерії набувають кольору:
 - а) червоного;
 - б) синього;
 - в) фіолетового;
 - г) блакитного.
4. Структура, від якої залежить фарбування мікроорганізмів за Грамом:
 - а) ліпополісахарид;
 - б) цитоплазматична мембрана;
 - в) пептидоглікан;
 - г) поверхнева мембрана.
5. Для виявлення капсули у бактерій препарат фарбують за:
 - а) Буррі—Гінсом;
 - б) Грамом;
 - в) Цілем—Нільсеном;
 - г) Ожешко.
6. Для виявлення мікобактерій туберкульозу препарат фарбують за:
 - а) Буррі—Гінсом;
 - б) Грамом;
 - в) Цілем—Нільсеном;
 - г) Ожешко.
7. Для виявлення спори препарат фарбують за:
 - а) Буррі—Гінсом;
 - б) Грамом;
 - в) Цілем—Нільсеном;
 - г) Ожешко.

Ситуаційні задачі

1. У пофарбованому препараті виявили кулясті бактерії фіолетового кольору та паличкоподібні — червоного кольору. За яким методом пофарбований препарат?

2. У препараті, пофарбованому за Грамом, виявили бактерії кулястої форми, розміщені ланцюжком, фіолетового кольору, і паличкоподібні бактерії, розміщені безладно, червоного кольору. Які бактерії за формою, розміщенням, фарбуванням виявили в препараті?

3. У пофарбованому препараті виявили бактерії червоного кольору з безбарвним ободком. За яким методом пофарбовано препарат?

4. У пофарбованому за Нейссером препараті, виготовленому із слизу, взятого з ротоглотки, виявили паличкоподібні бактерії з потовщенням на кінці. Палички пофарбовані в жовтий колір, потовщений кінець — у темно-коричневий. Яка причина нерівномірного фарбування бактеріальних клітин?

5. Під час культивування грампозитивних стрептобацил сибірки за наявності пеніциліну паличкоподібна форма клітин змінюється на кулясту внаслідок того, що не синтезується клітинна стінка (феномен "перлинного намиста"). Як називається ця форма бактерій? Який колір мають ці клітини в препараті після фарбування за Грамом? Чому?

6. У препараті з мокротиння, пофарбованому за Цілем— Нільсеном, виявлено коки, розташовані у вигляді грона винограду, синього кольору, поодинокі короткі товсті палички синього кольору, тонкі довгі палички червоного кольору. До яких груп належать виявлені бактерії за формою клітини, розміщенням, фарбуванням?

7. Відомо, що мікобактерії туберкульозу після фарбування за Цілем— Нільсеном мають червоний колір. Якого кольору в препараті, пофарбованому за Цілем—Нільсеном, будуть мікобактерії туберкульозу в Б-формі? Чому?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 3.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 3

1. Ознайомтеся з темою і метою заняття, запишіть у щоденнику тему і план.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 39— 56; практикум, с. 39—55).

Практичне заняття 3

ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА. ТЕХНІКА ПОСІВУ НА ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА

Мета заняття:

- уміти проводити взяття та посів патологічного матеріалу на поживні середовища;
- уміти характеризувати ріст мікроорганізмів на поживних середовищах.

Оснащення: сухі та виготовлені поживні середовища: поживний бульйон, Ендо, ЕМС (Левіна), Гісса, виготовлене середовище ЖСА, бактеріологічні петлі, шпатель для посіву, тампон для зіва, бульйонна культура ешерихій (посівний матеріал), середовище Ендо, кров'яний агар, ЖСА, кольоровий ряд Гісса, МПБ з індикаторними паперовими смужками з ростом культури бактерій, спиртівка, сірники, маркер, гумові рукавички.

План

1. Ознайомлення з поживними середовищами.
2. Техніка посіву патологічного матеріалу на поживні середовища бактеріологічною петлею, тампоном, шпателем.
3. Принципи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів.
4. Етапи виділення чистої культури мікроорганізмів. Ідентифікація чистих культур мікроорганізмів.

ч У

Хід заняття 1. Ознайомлення з поживними

середовищами

Завдання 1. *Ознайомтеся з формою випуску, умовами зберігання сухих поживних середовищ.*

Сухі поживні середовища випускаються у флаконах із темного скла, пластика або у непрозорих пакетах, зроблених із щільного паперу, алюмінієвої фольги (середовища світлочутливі). Посуд, у якому випускають ці середовища, щільно закривають, пробки додатково заливають парафіном, пакети запаюють (середовища гігроскопічні). На флаконах і пакетах обов'язково має бути етикетка, на якій зазначено: назву середовища, призначення, склад, спосіб приготування, термін і умови зберігання, серію. Готують поживні середовища згідно з інструкцією, зазначеною на етикетці.

2. Техніка посіву патологічного матеріалу на поживні середовища бактеріологічною петлею, тампоном, шпателем

Завдання 2. *Проведіть посів бактеріологічною петлею на щільне поживне середовище Ендо.*

Посів на поживні середовища проводять для бактеріологічного дослідження з метою виділення чистої культури мікроорганізмів та її ідентифікації. Для посіву може бути використаний як патологічний матеріал, так і культура мікроорганізмів.

Чисту культуру виділяють з однієї колонії, тому посів роблять так, щоб вирости ізольовані колонії. Для цього використовують такі прийоми: поверхня середовища має бути підсушеною (не повинно бути крапельок конденсаційної вологи), посівний матеріал — розведеним і добре розмішаним, лінія посіву — максимально довгою.

Всі маніпуляції, пов'язані з посівом і виділенням культур мікроорганізмів, проводять в асептичних умовах. Під час посіву не розмовляють, не роблять зайвих рухів; роботу виконують швидко, посіви тримають не далі ніж на 10 см від полум'я.

Увага! Під час роботи з живою культурою дотримуйтеся правил техніки безпеки!

Алгоритм *"Посів на щільне поживне середовище бактеріологічною петлею"*:

- поставте чашку Петрі донизу дном зліва від спиртівки;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю, візьміть матеріал для посіву із пробірки;

Увага! Матеріал для посіву в кільці бактеріологічної петлі утворює плівку "дзеркальце".

- підніміть правою рукою кришку чашки Петрі так, щоб в щілину між кришкою та її дном пройшла бактеріологічна петля;
- втирайте патологічний матеріал бактеріологічною петлею в поверхню поживного середовища біля краю чашки;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю;
- охолодіть бактеріологічну петлю, доторкнувшись її кінцем до внутрішньої сторони стінки чашки Петрі;
- покладіть бактеріологічну петлю на те місце на поверхні середовища, де нанесли патологічний матеріал;
- продовжіть робити посів штрихами по всій поверхні чашки, не відриваючи петлі від середовища;

Увага! Штрихи наносять через всю поверхню середовища від однієї стінки чашки до іншої (протилежної) і розташовують їх якомога ближче один від одного. Завдяки цьому лінія посіву стає якнайдовшою, що дає змогу отримати ізольовані колонії.

- закрийте чашку Петрі;
- зафламбуйте бактеріологічну петлю, поставте її в банку; — закрийте спиртівку;

- підпишіть на кришці чашки назву поживного середовища і дату його виготовлення;
- переверніть чашку дном догори, підпишіть номер, дату посіву, назву культури за бінарною номенклатурою.

Увага! Підпис посуду здійснюється відповідно до Державних санітарних правил (ДСП 9.9.5.-080-02).

Завдання 3. Проведіть посів бактеріологічною петлею у рідке поживне середовище (МПБ).

Під час посіву у МПБ матеріал розітріть на сухій внутрішній поверхні пробірки біля середовища, нахиліть пробірку і змийте матеріал у середовище. Цієї вимоги слід дотримуватися обов'язково, особливо у випадках посіву в'язкої культури.



Алгоритм "**Посів петлею у рідке поживне середовище**": — візьміть бактеріологічну петлю в праву руку, зафламбуйте її;

- візьміть чашку Петрі з культурою у ліву руку;
- охолодіть петлю, доторкнувшись до внутрішньої стінки чашки;
- заберіть матеріал з однієї колонії;
- поставте чашку Петрі, візьміть пробірку з МПБ;
- візьміть мізинцем правої руки пробку пробірки і притисніть її до долоні;

Увага! Пробку постійно тримайте в руці.

- зафламбуйте отвір пробірки;
- тримайте пробірку біля полум'я так, щоб отвір її був не далі як на 10 см від полум'я;
- уведіть петлю в пробірку, розітріть на її стінці матеріал;
- опустіть петлю в поживне середовище, змийте матеріал зі стінки пробірки;
- вийміть петлю з пробірки, не торкаючись її стінок;
- зафламбуйте отвір пробірки, закрийте її пробкою;
- поставте пробірку у штатив;
- зафламбуйте петлю, поставте її в склянку з інструментом.

Завдання 4. Ознайомтеся з видами тампонів, що використовуються для взяття патологічного матеріалу.

Посів проводять тампоном, яким було відібрано матеріал для дослідження.

Тампони виготовляють шляхом намотування вати на металевий, скляний або дерев'яний стержень. Тампони бувають для зів'я (ротоглотки) і носа, а також ректальні (для взяття патологічного матеріалу із прямої кишки). Тампони для ротоглотки і носа виготовляють так: на кінчик стержня туго намотують вату, а посередині його роблять ватну пробку. Вата кінчика і пробки не повинна сполучатися між собою, в іншому випадку, якщо такий тампон опустити в рідке поживне середовище, то воно, за законом капілярності, буде поглинуте тампоном. Ці тампони використовують для взяття патологічного матеріалу не тільки з ротоглотки, носа, а й з вуха, виразки, абсцесу, рани, а також для взяття змивів з рук і поверхні різних об'єктів навколишнього середовища.

Ректальні тампони виготовляють так: туго намотують вату на кінці стержня, потім навколо стержня на довжину 10—12 см, потім роблять ватну пробку.

Виготовлені тампони вміщують у пусті чисті сухі пробірки і стерилізують у автоклаві за температури 120 °С протягом 20 хв.

Завдання 5. Проведіть взяття патологічного матеріалу з носа.

Патологічний матеріал з носа беруть ватним тампоном під час обстеження на дифтерію, стафілококове носійство, а також у разі ураження слизової оболонки носа при вірусних респіраторних інфекціях.

Алгоритм **"Взяття патологічного матеріалу ватним тампоном з носа":**

- запропонуйте пацієнту сісти обличчям до світла;
- підпишіть на пробірці тампона номер аналізу;
- візьміть тампон у праву руку, звільніть його від пробірки;
- зробіть огляд носових ходів (чи немає пошкоджень слизової оболонки);
- уведіть тампон у носовий хід до кінця ходу;

Увага! Не можна торкатися тампоном зовнішньої поверхні носа.

- зберіть слиз зі стінок одного носового ходу, добре притискуючи тампон;
- зберіть слиз зі стінок другого носового ходу цим самим тампоном, не обертаючи його навколо осі;
- опустіть тампон у пробірку.

Завдання 6. **Проведіть посів тампоном на поживне середовище ЖСА.**

Посів на поживні середовища тампоном роблять за тим самим принципом, що і бактеріологічною петлею, тобто необхідно добре втерти матеріал на невеликій площі, обертаючи тампон навколо його осі, а потім зробити посів зигзагоподібними штрихами. Лінія посіву має бути якомога довшою з тим, щоб отримати ізольовані колонії.

Посів можна робити коловими рухами, обертаючи тампон і чашку Петрі.

Увага! Під час посіву патологічного матеріалу дотримуйтесь правил асептики і техніки безпеки!

∨ Алгоритм **"Посів тампоном на пластинчасті середовища":**

- підпишіть чашку Петрі з середовищем ЖСА (на кришці — назву середовища і дату виготовлення, на дні — номер аналізу, назву культури, дату посіву);
- запаліть спиртівку, поставте ліворуч від неї підписану чашку Петрі із середовищем ЖСА дном догори;
- візьміть тампон у праву руку;
- візьміть чашку із середовищем ЖСА у ліву руку, піднесіть її до полум'я не далі ніж на 10 см;
- зробіть посів тампоном зигзагоподібними штрихами;
- закрийте чашку;
- закрийте спиртівку;
- опустіть тампон у пробірку.

Завдання 7. **Проведіть посів шпателем.**

Алгоритм **"Проведення посіву шпателем":**

- підпишіть чашку Петрі з ЕМС;
- нанесіть на поверхню середовища піпеткою чи бактеріологічною петлею одну краплю посівного матеріалу або тампоном на сегмент 1x2;
- візьміть у праву руку шпатель (тримайте його як олівець), зніміть з нього папірець, швидко зафламбуйте шпатель;
- покладіть його на нанесену краплю посівного матеріалу на поверхні поживного середовища;
- зробіть посів шпателем (робіть шпателем колові рухи правою рукою, прокручуйте чашку лівою рукою);

Увага! За такого методу посіву отримують рясний ріст мікроорганізмів по всій поверхні поживного середовища. Такий посів називається суцільним, або посів газоном.

- закрийте чашку, поставте її догори дном;
- опустіть шпатель у дезінфекційний розчин.

3. Принципи культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів

Умови, необхідні для культивування мікроорганізмів у мікробіологічній лабораторії, забезпечуються в термостаті.

Завдання 8. *Ознайомтеся з будовою термостату, поставте посіви у термостат.*

Термостат призначений для підтримання у внутрішній частині робочої камери стабільної температури, необхідної для проведення бактеріологічних і серологічних досліджень.

Основними частинами термостату є: корпус, металеві дверцята, прозорі дверцята, робоча камера, блок управління. Корпус виготовлений із тонколистового металу. В середині корпусу встановлена робоча камера, в нижній частині якої закріплені два нагрівальних елементи. Простір між корпусом і камерою заповнений теплоізоляційними прокладками, зробленими з гофрованого картону. Корпус закривається металевими дверцятами.

Металеві дверцята зроблені у вигляді двохстіної коробки з тонколистового металу. Простір між двома стінками заповнений ізоляційними прокладками. По периметру дверцят укріплена гумова магнітна прокладка для ущільнення між дверцятами і корпусом термостата.

На дверцятах і корпусі є два гвинти з отворами для проволочки, на яку вішають plombу.

Прозорі дверцята дають змогу спостерігати за процесом у робочій камері, не відкриваючи їх і не порушуючи температурний режим.

Прозорі дверцята по периметру обклеєні прокладкою з гуми для ущільнення між дверцятами і робочою камерою.

Робоча камера має прямокутну форму, її стінки виготовлені з латуні. У верхній частині камери встановлено датчик температури. Для усунення місцевого перегрівання бічні стінки і дно камери обклеєні азбестовим папером. Температурний режим у робочій камері контролюється термометром, який встановлюється через отвір, що розміщений у блоці керування. В середині камери встановлено металеві полицки з отворами для полегшення циркуляції повітря.

Блок керування призначений для автоматичного регулювання та підтримання температури в робочій камері. На панелі блоку керування встановлено тумблер, запобіжники, кнопковий замикач, сигнальну лампу включення в електромережу і одночасно для підсвічування шкали термометра; сигнальну лампу включення нагрівальних елементів термостата, ручки резисторів для встановлення температурного режиму.

Алгоритм *"Підготовка термостата до роботи"*:

- перевірте, чи заземлений термостат;
- підключіть апарат до електромережі, поверніть тумблер у бік напису "мережа" (рос. мовою — "сеть") — сигнальна лампочка світитиметься у напівнакалі;
- поверніть ручку резистора, встановіть потрібну температуру;
- відкрийте дверцята;
- поставте чашки Петрі в робочу камеру термостата догори дном;

Увага! Чашки Петрі розміщують на полицках і дні робочої камери глибоко оптимально не більше ніж по 5 штук, нещільно, що забезпечує циркуляцію повітря і рівномірне нагрівання всіх чашок. Чашки обов'язково ставлять догори дном. Це забезпечує добру аерацію чашок і запобігає потраплянню конденсаційної води з кришки чашки на посів, яка перешкоджає утворенню ізольованих колоній.

- закрийте прозорі дверцята;
- закрийте металеві дверцята.

Для успішного культивування мікроорганізмів у лабораторних чи промислових умовах потрібно правильно підібрати поживні середовища,

правильно виконати посів і створити належні умови для культивування: оптимальну температуру, відсутність світла, вологість, аерацію або відсутність повітря (кисню), витримати певний термін культивування.

Оптимальну температуру створюють у термостаті. Більшість патогенних мікробів ростуть за температури 37 °С.

Для більшості мікроорганізмів, у тому числі і патогенних, світло не потрібне, тому їх культивують у темряві (термостат має непрозорі стінки). *Вологість* — неодмінна умова розвитку мікроорганізмів, тому їх краще висівати на свіжовиготовлені середовища.

Аерація необхідна для культивування облигатних аеробів і факультативних анаеробів. У пробірці кисень разом із повітрям проникає через ватно-марлеві пробки, у чашки Петрі — через щілину між кришкою і дном чашки.

Облігатні анаероби культивують в умовах повної відсутності кисню в поживних середовищах і навколишньому просторі. Для цього використовують різні методи для видалення кисню із середовища і запобігання насиченню середовища киснем. В умовах лабораторії рідкі поживні середовища регенерують — кип'ятять для видалення кисню, різко охолоджують, засівають і заливають на висоту 1 см стерильним вазеліновим маслом або роблять посів уколом у високий стовпчик агару, інколи агаром з посівом заповнюють трубки і запаюють їх на кінцях. Анаеробні умови можна створити в анаеростаті, де культивують мікроби у вакуумі або атмосфері іншого газу (азоту, пропану тощо), а також в екзикаторі. З повітря, що міститься в екзикаторі, кисень поглинають хімічні речовини або запалена свічка.

Деякі мікроорганізми краще культивуються в атмосфері, що містить 5—10 % вуглекислого газу. Це капнофільні мікроорганізми (бруцели, менінгококи).

Термін культивування для різних мікробів різний. Більшість патогенних мікробів культивують протягом 18—24 год, але деякі ростуть повільніше: бордетели — 3—4 доби, спірохети — 7—12 днів, мікобактерії туберкульозу — до 3 міс.

4. Етапи виділення чистої культури мікроорганізмів. Ідентифікація чистих культур мікроорганізмів

Завдання 9. Вивчіть принципи виділення та ідентифікації чистої культури мікроорганізмів.

В організмі людей, тварин, у навколишньому середовищі патогенні мікроорганізми змішані з умовно-патогенними та сапрофітами, тому виділення чистої культури мікроорганізмів є обов'язковим етапом бактеріологічного (культурального) дослідження. Це дає змогу ідентифікувати її за певними властивостями.

На щільних поживних середовищах мікроорганізми утворюють колонії. Вважають, що *колонія* — це видиме скупчення мікроорганізмів, які виростили з однієї клітини, тому чисту культуру виділяють шляхом посіву матеріалу з однієї ізольованої колонії. Виділення чистої культури та її ідентифікацію проводять у декілька етапів:

1-й етап — посів патологічного матеріалу на поживні середовища з метою отримання ізольованих колоній (вибір методу культивування, склад поживного середовища залежить від типу живлення і дихання мікроорганізмів);

2-й етап — визначення характеру росту мікроорганізмів на поживних середовищах (культуральних властивостей), відбір характерних колоній;

3-й етап — визначення морфології і тинкторіальних властивостей мікроорганізмів;

4-й етап — пересівання підозрілих колоній з метою виділення чистої культури мікробів;

5-й етап — перевірка чистоти виділеної культури;

6-й етап — визначення ферментативних властивостей мікроорганізмів;

7-й етап — визначення точних маркерів мікроорганізмів: антигенної структури, фагочутливості, коліциногенності, ан-тибіотикограми тощо.

Характер росту мікроорганізмів на поживному середовищі визначає їх культуральні властивості. Ці властивості постійні для кожного виду мікроорганізмів, тому є важливою ознакою під час їх ідентифікації.

У рідких поживних середовищах мікроорганізми можуть утворювати помутніння, осад, плівку, пристінковий ріст.

На щільних поживних середовищах вивчають колонії неозброєним оком, через лупу або під мікроскопом, результати відмічають у робочому журналі. Характеризують колонії за розміром, формою, контуром краю, прозорістю, рельєфом, характером поверхні, кольором, структурою, консистенцією.

За розміром колонії бувають: точкові (діаметр менший ніж 1 мм), дрібні (діаметр 1—2 мм), середнього розміру (діаметр 2—4 мм), великі (діаметр 4—6 мм і більше).

Форма колоній буває: правильна — кругла, неправильна — амебоподібна, ризоїдна (нагадує переплетене коріння дерева).

Контур краю визначають неозброєним оком або під мікроскопом. Він може бути рівний і нерівний. Нерівний край буває: фестончастий — утворює великі заокруглені зубці правильної форми; хвилястий — великі заокруглені зубці виражені нечітко; зазубрений — зубці гострі, різної величини і форми; бахроможастий — має ніжні ворсинки; розпливчастий — важко відрізнити межу між колонією і поживним середовищем.

За прозорістю колонії бувають: прозорі, напівпрозорі, непрозорі, прозорі або напівпрозорі з непрозорим центром.

Рельєф колоній вивчають неозброєним оком або через лупу, розглядаючи колонію згори і збоку. За рельєфом колонії бувають: каплеподібні і куполоподібні — мають правильну округлу форму у вигляді сегмента кулі, можуть бути слабовипуклі і випуклі; плосковипуклі — випуклі з плоскою верхівкою, у вертикальному розрізі нагадують трапецію; конусоподібні — у вертикальному розрізі нагадують трикутник; плоскі або випуклі з центром у вигляді сосочка; випуклі з вдвленим центром; плоскі — розстилаються по поверхні середовища.

Поверхня буває матовою або блискучою, сухою або вологою, гладенькою або шорсткою. Колонії з гладенькою поверхнею позначають буквою S (від англ. *smooth* — гладенький), з шорсткою — буквою R (від англ. *rough* — шорсткий).

Колір колоній зумовлений пігментом, який продукує культура мікроорганізмів. Переважна більшість патогенних мікробів не утворюють пігмент, тому їх колонії безбарвні, у проникаючому світлі вони прозорі, напівпрозорі або непрозорі. Колонії пігментують мікроорганізмів мають різний колір: жовтий, оранжевий, червоний, чорний, фіолетовий тощо. Так, си-ньогнійна паличка утворює колонії синьо-зеленого кольору, а стафілококи — білого і жовтого.

Структура колоній визначається під мікроскопом. У непрозорих колоній вона не визначається. За структурою розрізняють такі види колоній: гіалінові — без видимої певної структури; зернисті — залежно від розміру зерен можуть бути дрібно- і грубозернистими; волокнисті — наявність волокон усередині колонії.

Колонії також можуть бути однорідні і неоднорідні. В однорідних будова колонії у всіх її частинах однакова, у неоднорідних центральна частина або сектор відрізняється від іншої частини колонії.

Консистенція — це фізичний стан колонії. Її визначають за допомогою бактеріологічної петлі. За консистенцією колонії бувають: пастоподібні (нагадують вершкове масло), легко знімаються; в'язкі або слизькі, прилипають і тягнуться за петлю; волокнисті, шкірясті, щільні — знімаються з поверхні поживного середовища у вигляді плівки, відповідно до розміру і форми колонії; крихкі, сухі — розсипаються у разі торкання петлею.

Завдання 10. Визначте й опишіть культуральні властивості бактерій на поживному середовищі Ендо.

Алгоритм **"Визначення культуральних властивостей мікроорганізмів на пластинчастих середовищах":**

- візьміть чашку Петрі у ліву руку, тримайте її проти джерела світла на рівні очей дном до себе;
- відмітьте маркером ізольовану колонію;
- опишіть ознаки цієї колонії;

- визначте у проникаючому світлі розмір, форму колонії, контур краю, прозорість;
- покладіть чашку Петрі на ліву руку дном донизу;
- розгляньте колонію у відбитому світлі, визначте рельєф, характер поверхні, колір;
- покладіть чашку на предметний столик мікроскопа догори дном, встановіть об'єктив x8, опустіть конденсор, визначте структуру колонії;
- визначте консистенцію колонії, торкнувшись до неї бактеріологічною петлею.

Увага! Консистенцію колонії найчастіше визначають під час виготовлення мазка або пересіванні культури.

Завдання 11. *Вивчіть способи виявлення ферментативної активності мікроорганізмів.*

Здатність виробляти ферменти (ферментативна активність) у мікроорганізмів кодується генами і є їх постійною індивідуальною ознакою. За ферментативною активністю відрізняються не тільки окремі види мікробів, а й окремі варіанти одного виду. Вони називаються **біоварями**. Тому вивчення ферментативної активності мікроорганізмів є важливим етапом ідентифікації культури. Ферментативна активність мікробів багата і різноманітна, але в лабораторній практиці враховують не всі ферменти, що виробляють мікроби, а тільки ті, за якими можна диференціювати генетично близькі між собою види. Найчастіше вивчають ферменти, здатні розщеплювати вуглеводи (сахаролітичні), білки (протеолітичні), сечовину (уреазу), розщеплювати лецитин (лецитиназу), ферменти, що зумовлюють окисно-відновні властивості мікробів (дегідрози, каталазу, оксидазу), а також токсини, що руйнують еритроцити (гемолітичні властивості).

Сахаролітичну активність виявляють на поживних середовищах, що містять певний вуглевод чи багатоатомний спирт (у мікробіологічній практиці вуглеводи і багатоатомні спирти об'єднують в одну групу). Під впливом сахаролітичних ферментів вуглеводи розщеплюються до кислоти і газу (CO_2 , H_2 , CH_4). Для виявлення кислот до поживних середовищ додають індикатор. Накопичення газу виявляють у напіврідкому середовищі за появою кульок газу в середовищі, розривом середовища, піноутворенням. Цей принцип покладено в основу використання диференціально-діагностичних середовищ Ресселя, Гісса, Ендо, ЕМС та ін.

На середовищі з крохмалем визначають здатність мікроорганізмів продукувати фермент амілазу, що супроводжується гідролізом крохмалу, — у разі додавання розчину Люголю до засіяного середовища реакція на крохмаль стає негативною (тобто під дією йоду середовище не синіє).

На середовищі з молоком визначають здатність мікроорганізмів продукувати фермент лактазу, що розщеплює молочний цукор лактозу до кислоти або до кислоти і газу. При цьому молоко зсідається, утворюється казеїн (зсілий білок молока).

Протеолітичну активність мікроорганізмів визначають на середовищах, що містять желатин, молоко, сироватку крові, білок курячого яйця, шматочки вареного м'яса, пептон.

Для виявлення ферменту желатинази мікроби засівають уколом на поживне середовище (м'ясопептонний желатин), ін-кубують за температури 22 °C або 37 °C протягом від 1 до 20 діб. Характер розрідження желатину, спричинений різними мікробами, різний. Так, холерний вібріон зумовлює розрідження желатину у вигляді лійки (суцільне розрідження), збудник сибірки — у вигляді перевернутої ялинки (розрідження шарами).

У середовищі з молоком мікроорганізми, які утворюють протеолітичні ферменти, пептонізують казеїн. Тому рідке молочне середовище стає напівпрозорим, має вигляд молочної сироватки.

Протеолітично активні мікроби гідролізують білки до індолу, сірководню, аміаку. Індол утворюється внаслідок розщеплення амінокислоти триптофан. Для виявлення індолю-утворення у пробірку із середовищем, в яке засіяна культура досліджуваних мікроорганізмів, вносять індикаторну паперову смужку,

просякнуту розчином щавелевої кислоти. Під дією індолу смужка паперу набуває блідо-рожевого кольору. Сірководень можна визначити за допомогою індикаторної паперової смужки, просякнutoї розчином свинцю ацетату. Під дією сірководню утворюється свинцю сульфід — речовина чорного кольору, внаслідок чого папірець також набуває чорного кольору.

Гемолітичні властивості мікробів, тобто здатність руйнувати еритроцити, визначають на поживних середовищах із кров'ю. Розрізняють два види гемолізу: альфа- і бета-гемоліз. Якщо мікроорганізми спричинюють альфа-гемоліз, то на кров'яному агарі навколо колоній утворюється зелена зона (часто в такий самий колір забарвлюється і колонія) внаслідок перетворення гемоглобіну на метгемоглобін. У разі бета-гемолізу утворюється прозора зона навколо колоній.

Лецитиназну активність, здатність руйнувати лецитин у мембранах клітин визначають на середовищах із жовтком курячого яйця. Якщо мікроорганізми утворюють фермент леци-тиназу, навколо колоній утворюється райдужний вінчик.

Фермент плазмокоагулазу вивчають на середовищі, що містить цитратну плазму крові. Через 2—3 год культивування в термостаті за температури 37 °C плазма зсідается (не виливається з перевернутої пробірки).

Уреазну активність визначають на середовищах, що містять сечовину. Оскільки уреаза розщеплює сечовину до вуглекислого газу й аміаку (вуглекислий газ погано розчиняється у воді, а аміак — дуже добре), середовище набуває лужної реакції, на що вказує зміна кольору індикатора.

Завдання 12. *Визначте ферментативну активність мікробів на середовищах Гісса, МПБ, кров'яному агарі та ЖСА.*

Алгоритм "Визначення сахаролітичних властивостей мікроорганізмів на середовищах Гісса":

- порівняйте за кольором контрольні (без росту культури) і дослідні (з ростом культури) пробірки із середовища Гісса;
- зверніть увагу, в якій пробірці змінився колір середовища, зробіть висновок про те, які вуглеводи розщеплює культура мікроорганізмів;
- зверніть увагу на наявність кульок газу.

Примітка. В напіврідких середовищах Гісса визначають також рухливість мікроорганізмів. Нерухливі форми мікробів ростуть тільки вздовж уколу, який має циліндричну або конусоподібну форму, середовище залишається прозорим. Рухливі мікроби спричинюють рівномірне помутніння всього середовища.

Визначення протеолітичних властивостей проводять у середовищі МПБ з індикаторними папірцями.

Зверніть увагу на колір паперових смужок, зробіть висновок про утворення культурою мікробів індолу й сірководню.

Огляньте чашку Петрі із середовищем КА у прямому світлі, відмітьте наявність зони гемолізу, її колір.

Огляньте чашку Петрі із середовищем ЖСА у відбитому світлі, похитайте її, зверніть увагу на наявність зони лецитина-зи (райдужного вінчика) навколо колоній. У разі ясного росту патогенного стафілокока окремі зони лецитинази зливаються у суцільну зону.

Для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів у медичній практиці використовують прискорені методи — *мікротест-системи* (API, Міпіек, Епігеієві; тощо). Вони дають змогу швидко ідентифікувати культуру мікроорганізмів і визначити її антибіотикограму.

Контрольні запитання

1. У якому вигляді випускають сухі поживні середовища?
2. Які дані про поживне середовище наведені на етикетці?
3. Який матеріал використовують для посіву на поживні середовища?

4. Яких правил посіву слід дотримуватися, щоб отримати ізольовані колонії?
5. Яких правил слід дотримуватися під час посіву живої культури?
6. Як підписати чашку Петрі після посіву?
7. Яка техніка посіву патологічного матеріалу петлею (на щільне і рідке поживне середовище), тампоном, шпателем?
8. Як забезпечити необхідні умови культивування аеробних і анаеробних мікроорганізмів?
9. Як правильно розмістити чашки Петрі в термостаті?
10. З якою метою визначають ферментативну активність мікроорганізмів?
11. Які групи ферментів враховують під час визначення ферментативної активності?
12. На яких середовищах і як визначають сахаролітичні ферменти мікроорганізмів?
13. На яких середовищах і як визначають протеолітичні ферменти мікроорганізмів?
14. Як визначають гемолітичну властивість мікроорганізмів? Які бувають види гемолізу?
15. Як визначають лецитиназну активність мікроорганізмів?

Тести

1. Номер аналізу підписують:
 - а) на кришці чашки Петрі;
 - б) на дні чашки Петрі;
 - в) на дні чашки Петрі;
 - г) не має значення.
2. Чашки Петрі з посівом ставлять у термостат:
 - а) догори кришкою;
 - б) догори дном;
 - в) не має значення.
3. Мікроби, що обов'язково ростуть за наявності кисню:
 - а) мікроаерофіли;
 - б) облігатні анаероби;
 - в) облігатні аероби;
 - г) факультативні аероби.
4. Фактор, що не потрібен для культивування мікробів:
 - а) оптимальна температура;
 - б) вологість;
 - в) повітря;
 - г) світло.
5. Середовища, найбільш сприятливі для певного виду мікробів:
 - а) спеціальні;
 - б) елективні;
 - в) селективні;
 - г) основні.
6. Ферменти, що розщеплюють білки:
 - а) протеолітичні;
 - б) сахаролітичні;
 - в) уреаза;
 - г) гіалуронідаза.

Ситуаційні задачі

1. У поживне середовище з молоком висіяли культуру мікроорганізмів. Через деякий час середовище стало напівпрозорим. Що стало причиною зміни вигляду середовища?
2. Після посіву харчових продуктів, підозрілих щодо харчового отруєння, у поживному середовищі з молоком через 4 год утворився пухкий згусток казеїну, а пробки повилітали з пробірок. На які властивості бактерій вказують ці факти?

3. Після посіву мокротиння хворого на пневмонію на поживне середовище з кров'ю вирости дрібні, вологі, зеленкуваті колонії, навколо яких середовище позеленіло. Дайте пояснення цьому явищу.

4. Через добу після посіву на середовище Гісса з лактозою було виявлено, що бактерії вирости вздовж уколу, середовище залишилося прозорим і колір його не змінився. Як оцінити цей результат?

5. Під час зняття пов'язки з гнійної рани було відмічено, що бинти набули синьо-зеленого кольору і запаху суничного мила. Чи можна орієнтовно зробити висновок про те, які бактерії спричинили загнивання рани?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 4.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 4

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 57—77; практикум, с. 56—66).

Практичне заняття 4 ДЕЗІНФЕКЦІЯ.

СТЕРИЛІЗАЦІЯ

Мета заняття:

- знати способи стерилізації та дезінфекції;
- уміти підготувати матеріал до стерилізації;
- уміти проводити дезінфекцію рук, робочого місця, патологічного матеріалу.

Оснащення: апаратура для стерилізації: стерилізатор паровий (автоклав), сухожарова шафа, інактиватор, апарат для зсідання й інактивації сироватки; тести для перевірки якості роботи стерилізаторів: максимальний і немаксимальний ртутні термометри, хімічні тести, біологічні тести, індикатори стерилізації; пінцет, вата, дезінфекційні засоби: 0,1 % розчин дезак-тину, стериліум.

План

1. Поняття про асептику та антисептику.
2. Дезінфекція.
3. Стерилізація. Методи стерилізації медичного інструментарію, перев'язувального матеріалу, лабораторного посуду, поживних середовищ. Контроль якості роботи стерилізаторів і якості стерилізації.
4. Проведення дезінфекції піпеток, рук, робочого місця, патологічного матеріалу.

Хід заняття 1. Поняття про асептику та антисептику

Хімічні речовини, які згубно діють на мікроорганізми, але не впливають негативно на макроорганізм, та які застосовують для лікування інфекційних хвороб, називають антисептиками.

Антисептика — це комплекс заходів, спрямованих на знищення мікроорганізмів або пригнічення їх росту на об'єкті (рана, організм). З цієї метою застосовують бактерицидні хімічні речовини.

Асептика — система профілактичних заходів (дезінфекція, стерилізація), спрямована на запобігання мікробному забрудненню рани, операційного поля, культури мікроорганізмів та ін.

Для проведення дезінфекції і стерилізації використовують різні методи залежно від того, який режим стерилізації вони забезпечують.

2. Дезінфекція

Завдання 1. *Ознайомтеся з основними видами дезінфекції.*

Дезінфекція — це повне знищення вегетативних і спорових форм патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі (у приміщенні: підлога, стіни, ручки дверей; на поверхні меблів, апаратів, приладів; на посуді, білизні; у патологічному матеріалі, отриманому від хворих, тощо).

Таблиця 2. Методи дезінфекції

<i>Метод дезінфекції</i>	<i>Принцип методу</i>
Механічний	Миття рук з милом, вологе прибирання приміщення, прання білизни, провітрювання приміщення тощо
Фізичний	Кип'ятіння, спалювання, оброблення паром, ультрафіолетове опромінювання
Хімічний	Оброблення хімічними засобами (антисептиками та дезінфектантами)

Метою дезінфекції є запобігання передачі збудників від інфікованого організму до неінфікованого через об'єкти навколишнього середовища. Методи проведення дезінфекції наведено у табл. 2.

Дезінфекція буває *поточною* і *заключною*. Поточну дезінфекцію проводять багаторазово протягом дня в лікувально-профілактичних та інших закладах. Заключну проводять одноразово наприкінці робочого дня, або в осередку інфекції після госпіталізації хворого, переведення хворого в іншу палату, або після смерті пацієнта.

Для дезінфекції використовують багато (понад 250) різних хімічних препаратів. Більшість із них випускають готовими для використання у вигляді концентрованої рідини, розчинів, таблеток, емульсій, суспензій, аерозолів.

Дезінфекційні засоби, зареєстровані в Україні, застосовують відповідно до режимів, які регламентовані методичними вказівками і в установленому порядку затверджені головним державним санітарним лікарем України. Останнім часом в Україні зареєстровані ефективні дезінфекційні препарати для проведення поточної і заключної дезінфекції: МедіДес, Тетралін, КвікДес, Сентамін та ін. Їх можна використовувати для знезараження поверхні приміщень, твердих меблів, медичних приладів і апаратури, предметів догляду за хворими, лабораторного посуду, забрудненого виділеннями хворих, білизни, прибирального інвентарю, а також кухонного посуду.

Для гігієнічного оброблення шкіри рук медичного персоналу рекомендовано препарати БактеріоСол, Октенісепт, Стериліум та ін.

Дезінфекційні засоби можуть негативно впливати на макроорганізм, тому під час виготовлення дезінфекційних розчинів слід дотримуватися правил техніки безпеки (працювати в гумових рукавичках, герметичних окулярах, надягати чотиришарову марлеву пов'язку).

3. Стерилізація. Методи стерилізації медичного інструментарію, перев'язувального матеріалу, лабораторного посуду, поживних середовищ. Контроль якості роботи стерилізаторів і якості стерилізації

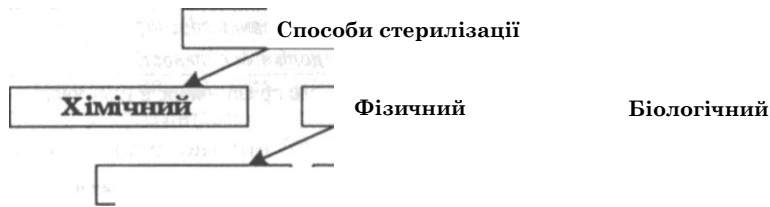
Завдання 2. *Ознайомтеся з методами стерилізації медичного інструментарію, перев'язувального матеріалу, лабораторного посуду, поживних середовищ.*

Стерилізація — це повне знезараження об'єктів навколишнього середовища (знищення вегетативних і спорових форм мікробів).

Стерилізація дає змогу запобігти занесенню мікробів в організм людини під час медичних втручань; обміненню сторонньою мікрофлорою патологічного матеріалу, культур мікроорганізмів, які досліджують, а також поживних

середовищ, лікарських і діагностичних препаратів. Способи стерилізації подані на схемі 1.

Фізичний спосіб. Застосовують термічну, механічну та променеву стерилізацію. Термічні способи стерилізації наведено у табл. 3.



Таблиця 3. Термічні способи стерилізації

<i>Спосіб, апаратура</i>	<i>Режим стерилізації</i>	<i>Застосування способу, недоліки, особливості</i>
Фламбування в полум'ї спиртівки	Кілька секунд	Швидкий та надійний спосіб, але ріжучі інструменти тупляться. Бактеріологічні петлі, піпетки, предметні стекла
Повітряний, сухим жаром у печі Пас-тера	180 °С – 60 хв 160 °С – 150 хв	У лікувально-профілактичних закладах і бактеріологічних лабораторіях. Медичний інструментарій – вироби з металу і силіконової гуми, скла
Водяною парою в стерилізаторі паровому (автоклаві)	132 °С, 2 атм, 30–60 хв 127 °С, 1,5 атм, 30–60 хв 120 °С, 1 атм, 20 хв 112 °С, 0,5 атм, 15 хв	Споровмісний матеріал, інструменти, посуд, забруднений спорогенною культурою. Вегетативні форми мікроорганізмів. Прості поживні середовища, чистий лабораторний посуд, вата, марля, папір, інструменти, забруднені аспорогенною культурою. Поживні середовища, що містять вуглеводи
Стерилізація багаторазова: потоком пари в апараті Коха або в автоклаві з відкритим краном; гарячим повітрям в апараті Коха; тиндалізація на водяній бані з терморегулятором	100 °С, по 30 хв 3 доби підряд 90 °С, по 60 хв 2 доби підряд 56–58 °С, по 60 хв 5 дб підряд	Поживні середовища, що містять вуглеводи, сечовину, желатин, молоко та ін. Середовища, що містять сироватку крові та яєчну масу (стерилізація та згорання). Поживні середовища, що містять неденатурований білок

Схема 1. Способи стерилізації

<i>Спосіб, апаратура</i>	<i>Режим стерилізації</i>	<i>Застосування способу, недоліки, особливості</i>
Кип'ятіння у воді Кип'ятіння у 2 % розчині натрію гідрокарбонату	100 °С, 30 хв 100 °С, 15 хв	Вироби медичного призначення, в тому числі інструменти. У мікробіологічній практиці – предметні стекла
Пастеризація	65 °С, 30 хв; 72–75 °С, 15–30 хв одноразово з подальшим охолодженням	Харчові продукти: молоко, вино, пиво, плодові соки
Гласперленова стерилізація	190–250 °С, занурення в середовище нагрітих скляних кульок	Цільнометалічні стоматологічні інструменти

Стерилізація кип'ятінням є неповною, оскільки спори бактерій та деякі віруси не знищуються. Тому цей вид стерилізації часто відносять до дезінфекції.

Під час пастеризації гинуть переважно молочнокислі бактерії. Дріжджі, спори та деякі вегетативні форми бактерій не гинуть.

Завдання 3. Ознайомтеся з апаратурою для термічної стерилізації та тестами контролю якості роботи стерилізаторів.

Стерилізацію паром під тиском проводять у паровому стерилізаторі (автоклаві), основними частинами якого є стерилізаційна камера, парогенератор, система трубопроводів, крани керування, манометр електроконтактний та мановакуумметр (манометр). Матеріал вміщують у стерилізаційну камеру, температура в якій залежить від тиску пари: при 0 атм — 100 °С, 0,5 атм — 112 °С, 1 атм — 120 °С, 1,5 атм — 126 °С, 2 атм — 132 °С. Температура і термін стерилізації визначаються якістю матеріалу і властивостями мікроорганізмів, якими він забруднений.

Сухожарова шафа використовується для висушування лабораторного посуду за температури 100—105 °С, а також для стерилізації медичного інструментарію за 160 °С протягом 150 хв або за 180 °С — 60 хв.

Інактиватор використовують для інактивації сироватки крові (комплемент сироватки крові переходить у неактивний стан за температури 56 °С протягом 30 хв), а також для багаторазової стерилізації — тиндалізації.

Апарат для зсідання, інактивації сироватки крові, зсідання яєчних і сироваткових поживних середовищ використовують одночасно і для їх стерилізації за температури 90 °С по 60 хв 2 доби поспіль.

Контроль температури в стерилізаційній камері проводять за допомогою трьох видів тестів: фізичного, хімічного та біологічного.

-*Фізичний метод* полягає у використанні максимального термометра в паровому стерилізаторі (автоклаві) і звичайного ртутного термометра в сухожаровій шафі та інактиваторах.

-*Хімічний метод* — використання кристалічних хімічних речовин з певною температурою плавлення: бензонафтол — 110 °С, антипірін — 113 °С, резорцин, сірка — 119 °С, бензойна кислота, бета-нафтол — 120 °С, сечовина, фенацетин, манноза — 132 °С, саліцилова кислота, стрептоцид — 160 °С, тіосечовина, альбуцид — 180 °С.

Одну з цих речовин змішують із невеликою кількістю барвника (фуксину або метиленового синього) і вміщують у трубочку, яку потім запаюють. Ці трубочки вміщують у стерилізаційні коробки разом із матеріалом, що стерилізується. Якщо температура в стерилізаційній камері сягає певного рівня, то хімічна речовина в трубочці розплавляється, змішується з барвником і забарвлюється в його колір.

Нині випускають паперові індикатори стерилізації, які змінюють забарвлення за певної температури: 1С — 120, 1С — 132 °С та ін.

-*Біологічний метод* — використання біотестів (від грец. *bios* — життя і англ. *test* — проба, дослідження). Біотести виготовляють відповідно до методичних рекомендацій "Лабораторный контроль качества дезинфекционных мероприятий в ЛПУ" (Харків, 1988). Для їх виготовлення використовують тест-культуру (мікроорганізми з групи антракоїдів, які витримують кип'ятіння протягом 25—30 хв і вплив текучої пари температурою 100 °С протягом 4—6 хв) або зразки ґрунту, що містять спори термостабільних сапрофітів (витримують температуру 120 °С протягом 2—3 хв). У стерилізатор вміщують щонайменше 5 біотестів (у різних його місцях) та 1 (контрольний тест) залишають за кімнатної температури. Після стерилізації змиви з біотестів засівають на поживні середовища. У змивах з тих біотестів, що перебували в стерилізаторах, росту культури не повинно бути, у змивах з контрольного тесту — рясний ріст культури. Якщо з'являється ріст культури у змивах, взятих із тестів, що перебували в стерилізаторі, перевіряють технічний стан апарата. Здебільшого біотести використовують у парових стерилізаторах і дезінфекційних камерах.

З метою профілактики внутрішньолікарняних інфекцій контролюють не тільки режим роботи стерилізаторів, а й якість стерилізації.

Для цього стерильний матеріал відбирають в асептичних умовах. Від великих об'єктів (бинти, простирадла, шовний матеріал) відрізають стерильними ножицями шматочки; серед дрібних предметів — відбирають по декілька штук стерильним пінцетом з різних місць біксу; з хірургічного інструментарію, іншого

обладнання роблять змиви стерильними серветками, змоченими стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду. Дослідження проводять у стерильному боксі в асептичних умовах. Змиви з усіх відібраних об'єктів засівають на поживні середовища, дрібні об'єкти занурюють у поживне середовище. З метою самоконтролю посів проводять на одне поживне середовище у дві паралельні пробірки. Для виявлення анаеробів використовують тіогліколеве середовище, яке інкубують за 32 °С протягом 8 діб. Для виявлення грибів використовують середовище Сабуро, яке інкубують за 22 °С протягом 8 діб. Матеріал вважають стерильним, якщо в усіх посівах відсутні ознаки росту мікроорганізмів.

^*Механічна стерилізація* (холодна стерилізація) проводиться методом фільтрації через бактеріальні фільтри (мембранні, каолінові та ін.). Використовують для стерилізації розчинів, що не витримують нагрівання (поживне середовище, що містить розчинений білок, сироватку крові, антибіотик). Ця стерилізація неповна, оскільки у фільтраті зберігаються віруси, тому її використовують також для відокремлення вірусів від бактерій, у тому числі і фагів.

«*Променева стерилізація*. Використовують ультрафіолетове випромінювання (бактерицидні лампи). Цим методом знезаражують повітря, поверхні приміщень (операційної, пологових залів, боксів), предметів, обладнання, воду, харчові продукти. Радіаційне випромінювання використовують для знезараження шприців, систем для переливання крові, посуду та інших предметів одноразового використання.

Хімічний спосіб. Хімічну допоміжну стерилізацію застосовують тоді, коли неможливо використати термічну (табл. 4).

Таблиця 4. Хімічні способи стерилізації

<i>Хімічні речовини</i>	<i>Режим стерилізації</i>	<i>Призначення стерилізації</i>
1 % розчин дезоксону-1	18 °С, 45 хв	Вироби з полімерів, гуми, скла, корозійностійких металів
Хлороформ, толуол, ефір, фенол, формалін, етиловий спирт та ін.	Консервування	Ендоскопічний інструментарій, кетгут, апарат для штучного кровообігу, поживні середовища, вакцини, лікувальні та діагностичні сироватки
Гази або суміші газів: озон, оксид етилену, суміш ОБ (оксиду етилену і броміду метилу)	18–80 °С	Вироби медичного призначення із полімерів, скла, металу

Біологічний спосіб. Біостерилізація ґрунтується на застосуванні антибіотиків. Її використовують під час культивування вірусів і деяких видів бактерій (бордетел, менінгококів).

4. Проведення дезінфекції піпеток, робочого місця, патологічного матеріалу, рук

Завдання 4. Ознайомтеся з технікою проведення дезінфекції піпеток, інфікованого матеріалу, робочого місця.

Градуйовані, пастерівські піпетки, шпатель, металеві інструменти відразу після використання опускають у посудину з дезінфекційним розчином, яка стоїть на кожному робочому місці.

/Відпрацьований патологічний матеріал (кал, сеча, мокротиння, кров, спинномозкова рідина) обробляють сухими дезінфекційними засобами або їх розчинами. Патологічний матеріал (гній, сеча, кров, мокротиння тощо), посуд, меблі та приміщення знезаражують бактерицидними дезінфекційними засобами. Ці засоби застосовують у комбінації з детергентами та дією високої температури. Вибір дезінфекційного засобу, його концентрація, експозиція (термін дії) залежать від біологічних властивостей мікроорганізмів і властивостей патологічного матеріалу, в якому містяться ці мікроби. Так, для знезараження мокротиння хворого на туберкульоз застосовують 2,5 % розчин дезактину (експозиція — 360 хв), а випорожнень хворого на дизентерію — 0,5 % розчин дезактину (експозиція — 60 хв). Або засипають сухим хлорним вапном із розрахунку 200 г дезінфекційного

засобу на 1 кг виділень, перемішують і витримують 1 год. Посуд опускають в 1 % розчин хлораміну на 30 хв або 1 % розчин МедіДес чи Тетраліну на 60 хв.

Робоче місце після закінчення роботи протирають ганчіркою, змоченою дезінфекційним розчином (0,2 % розчином Сеп-гаміну, 0,75 % розчином МедіДес чи Тетраліну).

Завдання 5. *Проведіть дезінфекцію рук.*

Алгоритм "Дезінфекція рук":

- зробіть із вати дві кульки діаметром 1—2 см;
- візьміть пінцетом одну кульку, змочіть її у розчині дезінфектанту;
- протріть нею руки в такій послідовності: ліва рука — тильна сторона, долонна сторона, між пальцями, нігтьова пластинка, під нігтями; права рука — у такій самій послідовності;
- кульку опустіть у посудину з дезінфекційним розчином;
- візьміть пінцетом другу кульку і все повторіть;
- вимийте руки водою з милом;
- висушіть руки, змастіть їх кремом для рук.

Контрольні запитання

1. Що таке асептика й антисептика?
2. Що таке дезінфекція? Які є її види?
3. Які дезінфекційні засоби можуть бути використані в Україні?
4. Від чого залежить вибір дезінфекційного засобу і термін проведення дезінфекції?
5. Як дезінфекційні засоби впливають на макроорганізм? Як з ними слід поводитися?
6. Що таке стерилізація? Які існують види стерилізації?
7. Які апарати використовують для стерилізації?
8. Які умови стерилізації в паровому стерилізаторі, сухо-жаровій шафі, інактиваторі, в апараті для зсідання й інактивації сироватки?
9. Як контролюють режим роботи стерилізаторів?
10. Як проводять перевірку якості стерилізації?
11. В якому разі і як проводять механічну стерилізацію?
12. Як проводять дезінфекцію піпеток, патологічного матеріалу, робочого місця, рук?

Тести

1. Дія дезінфекційних засобів на мікроорганізми залежить від:
 - а) природи дезінфекційних засобів;
 - б) концентрації та температури їх розчинів;
 - в) тривалості дії;
 - г) усі відповіді правильні.
2. Для стерилізації бактеріологічних петель використовують:
 - а) фламбування;
 - б) сухожаровий метод;
 - в) тиндалізацію;
 - г) гласперленову стерилізацію.
3. Медичні вироби з гуми, полімерів, скла стерилізують:
 - а) 1 % розчином дезоксону-1;
 - б) хлороформом;
 - в) ефіром;
 - г) толуолом.
4. Неповним є метод стерилізації:
 - а) сухим жаром;
 - б) автоклавуванням;
 - в) ультрафіолетовим випромінюванням;

- г) кип'ятінням.
5. Медичні вироби одноразового використання (шприці) стерилізують:
- ультрафіолетовими випромінюванням;
 - радіаційним випромінюванням;
 - водяною парою;
 - сухим жаром.

Ситуаційні задачі

- У сухожарову шафу помістили металічні інструменти, вату, піпетки, флакони з ізотонічним розчином натрію хлориду, гумові рукавички і простерилізували за температури 180 °С протягом 60 хв. Дайте оцінку цим діям.
- Під час бактеріологічного дослідження вонни був виділений збудник сибірки. Після ідентифікації збудника лабораторний посуд, який був при цьому задіяний, і культуру збудника простерилізували в паровому стерилізаторі за температури 120 °С протягом 30 хв. Дайте оцінку цим діям.
- У корови, хворої на туберкульоз, мікобактерії виділяються з молоком. Чи можна пити молоко хворої тварини після пастеризації?
- Металеві хірургічні інструменти прокип'ятили у дистильованій воді протягом 30 хв. Чи можна їх вважати стерильними?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 5.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 5

- Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
- Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 136—164; практикум, с. 67—78).

Практичне заняття 5 СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета заняття:

- навчитися пояснювати роль антигенів як індукторів імунної відповіді;
- навчитися пояснювати роль антитіл в імунній відповіді;
- розуміти суть серологічного методу дослідження;
- мати поняття про діагностичні препарати;
- уміти проводити реакцію аглютинації.

Обладнання: адсорбована аглютинуюча полівалентна еше-рихіозна сироватка ОКА в ампулах і розчинена та розлита у стерильні пробірки, в які вмонтовані пастерівські піпетки, стерильний ізотонічний розчин натрію хлориду (у пробірках), стерильні піпетки об'ємом 1—2 см³, гумова груша, чиста культура *E. coli* на скошеному МПА, предметні стекла, бактеріологічні петлі, пінцети, спиртівка, сірники, маркери, дезінфекційний розчин, спирт, вата, заздалегідь поставлена розгорнута реакція аглютинації, бланк направлення.

План

- Серологічні реакції, їх застосування.
- Проведення орієнтовної реакції аглютинації на склі. Облік та оцінювання її результатів.
- Проведення розгорнутої реакції аглютинації. Облік та оцінювання її результатів.

Хід заняття 1. Серологічні реакції, їх застосування

Завдання 1. Ознайомтеся з умовами проведення серологічних реакцій та їх застосуванням.

Серологічні реакції ґрунтуються на взаємодії антигену зі специфічним антитілом. Оскільки ці реакції високоспецифічні, чутливі і можуть відбуватися *in vitro*, їх широко використовують у лабораторній практиці.

За допомогою серологічних реакцій можна вирішити дві проблеми:

- 1) визначити невідоме антитіло або невідомий антиген у сироватці крові хворого — *серологічна діагностика*;
- 2) визначити рід, вид, тип збудника, виділеного із патологічного матеріалу хворого, — *серологічна ідентифікація* культури мікроорганізмів.

Проведення серологічних реакцій потребує підготовки посуду, інструментів, апаратури й окремих інгредієнтів (від лат. *індгесНенс* — той, що входить), тобто окремих компонентів реакції: антитіла, антигену і неспецифічних компонентів.

Для постановки серологічних реакцій використовують чистий, сухий скляний посуд: аглютинаційні, преципітаційні, центрифужні пробірки, піпетки градуйовані (або піпеточний дозатор) і пастерівські, чашки Петрі, предметні стекла. Скло має бути прозорим, без плям і подряпин. Для проведення серологічної реакції у пробірках слід підібрати їх так, щоб вони були однаковими за висотою і діаметром, мали однакову конфігурацію дна, однаковий колір скла.

Замість пробірок часто використовують полістиролові планшети багаторазового й одноразового використання. На планшеті є лунки, однакові за розміром і конфігурацією дна. Їх використовують для постановки реакцій гемаглютинації, мікропреципітації, ІФА.

Використовують такі інструменти й апаратуру: бактеріологічну петлю, пінцет, штативи з гніздами, що відповідають діаметру пробірок, лупу, аглютиноскоп, термостат, холодильник, центрифугу на 2000—3000 об/хв.

Специфічними компонентами серологічних реакцій є імунна діагностична сироватка (відоме антитіло) і діагностикум (відомий антиген).

Імунними діагностичними називають сироватки, що містять відомі специфічні антитіла. Їх виготовляють із крові тварин (кроликів, коней, ослів, овець), яких попередньо імунізують (заражають) відповідним антигеном (мікробами чи токсином) за певною схемою. Після накопичення антитіл (приблизно через 2 тиж після останнього введення антигену) беруть кров і виробляють із неї сироватку. В отриманій сироватці визначають активність (титр). *Титр* — це найбільше розведення, в якому сироватка спричинює видиму реакцію з відповідним антигеном в умовах дослідження. Сироватки розливають в ампули, частіше їх ліофілізують, потім запаюють. На ампулі зазначають назву сироватки, її об'єм і титр. Перед використанням їх розчиняють у дистильованій воді або ізотонічному розчині натрію хлориду (як зазначено в інструкції). Зберігають сироватки у холодильнику за температури від 4 до 10 °С.

Імунні діагностичні сироватки бувають нативні (неадсорбовані) й адсорбовані.

Неадсорбовані сироватки містять природні антитіла, які накопичилися в крові упродовж життя тварини, групові антитіла, які здатні взаємодіяти з бактеріями, що мають однакові антигени (бактерії одного роду, родини), — це *неспецифічні антитіла* та *специфічні антитіла*, які здатні взаємодіяти з бактеріями, що були використані для імунізації тварин.

Імунна діагностична сироватка містить набагато більше специфічних антитіл, ніж неспецифічних. Після розведення неадсорбованих сироваток концентрація неспецифічних антитіл стає настільки малою, що вони не здатні спричинити видиму реакцію з антигеном, а концентрація специфічних антитіл хоч і зменшується, але залишається достатньою, щоб зумовити видиму реакцію з антигеном. Тому під час проведення серологічної реакції неадсорбовані сироватки обов'язково розводять до титру, вказаного на етикетці.

Адсорбовані імунні діагностичні сироватки високоспецифічні. Неспецифічні антитіла з них видаляють методом адсорбції.

Адсорбовані сироватки можуть бути *монорецепторними* (містять антитіла до одного антигену) і *полівалентними* (містять антитіла до 2 антигенів і більше). Титр антитіл в адсорбованих сироватках невисокий (від 1:20 до 1:320), тому їх не розводять. Адсорбовані сироватки використовують для проведення реакції аглютинації на склі з метою вивчення антигенної структури бактерій, тобто для серологічної ідентифікації культури.

Ампули з ліофілізованими сироватками вміщують у коробки, в кожену коробку кладуть інструкцію щодо використання сироватки.

На коробці зазначають назву сироватки, її призначення, кількість ампул, об'єм в 1 ампулі, серію, термін придатності, умови зберігання, адресу підприємства-виробника, крім того, для неадсорбованих сироваток зазначають титр.

В інструкції зазначають: назву сироватки, її призначення, спосіб застосування, схему проведення серологічної реакції і врахування її результатів, термін придатності сироватки, умови зберігання і транспортування, адресу підприємства, що виготовило препарат.

На ампулі зазначають: назву сироватки, об'єм, серію, контрольний номер, дату придатності, на ампулах з неадсорбованими сироватками — титр.

Перед використанням звертають увагу на термін придатності, цілість ампули, чіткість підписів на ампулі, відповідність підпису на ампулі, інструкції й на коробці, фізичні властивості препарату (відповідність зовнішнього вигляду до зазначеного в інструкції) і розчиняють в об'ємі ізотонічного розчину натрію хлориду, який зазначено на етикетці.

2. Проведення орієнтовної реакції аглютинації на склі. Облік та оцінка її результатів

Аглютинація (від лат. *аШВІиИпаИо* — приклеювання) — це склеювання і випадання в осад клітин (у мікробіології — бактеріальних клітин) після їх взаємодії зі специфічними антитілами. Тому результатом реакції аглютинації є утворення пластівців унаслідок склеювання бактеріальних клітин. Осад в реакції аглютинації називається *аглютинатом*.

Орієнтовна реакція аглютинації на склі частіше використовується для визначення антигенної структури мікроорганізмів, але інколи і для прискореної серологічної діагностики (реакція Хеддльсона для діагностики бруцельозу).

Завдання 2. *Проведіть орієнтовну реакцію аглютинації на склі та облік її результатів з метою ідентифікації культури бактерій.*

Проведення реакції аглютинації (РА) на склі з метою серологічної ідентифікації культури є завершальним етапом ідентифікації багатьох мікробних культур після попереднього їх вивчення за культуральними, морфологічними, тинкторіальними і ферментативними властивостями. Для постановки цієї реакції використовують інгредієнти: специфічну аглютинуючу адсорбовану сироватку (відоме антитіло), підготовлену згідно з інструкцією, ізотонічний розчин натрію хлориду і невідому, але підозрілу культуру (невідомий антиген).

Алгоритм "*Проведення та облік результатів орієнтовної РА*":

- знежирте предметне скло, нанесіть маркером три кола діаметром близько 1 см на однаковій відстані одне від одного, скло переверніть;
- підпишіть: під I колом — Д (дослід), під II — КС (контроль сироватки), під III — КА (контроль антигену), зазначте номер аналізу;
- зафламбуйте предметне скло, покладіть його у кришку чашки Петрі;
- нанесіть пастерівською піпеткою на кола Д і КС по 1 краплі аглютинуючої сироватки, на коло КА — 1 краплю ізотонічного розчину натрію хлориду;
- розітріть і змішайте бактеріологічною петлею досліджувану культуру з краплею ізотонічного розчину натрію хлориду (КА);
- змішайте досліджувану культуру з краплею сироватки (Д);
- оцініть результати через 1—3 хв;

Увага! Оцінювання результату починають з оцінювання контролів: КА — рівномірне помутніння, КС — крапля прозора. У разі появи пластівців у колі Д на фоні прозорої рідини реакція позитивна (антиген відповідає антитілу), а в

разі рівномірного помутніння — реакція негативна (антиген не відповідає антитілу). Іноді результат оцінюють за допомогою лупи або мікроскопа (реакція мікроаглютинації).

— помістіть предметне скло в дезінфекційний розчин.

3. Проведення розгорнутої реакції аглютинації. Облік та оцінювання її результатів

Завдання 3. *Ознайомтеся з технікою проведення та обліком результатів розгорнутої реакції аглютинації.*

Розгорнуту реакцію аглютинації здебільшого використовують для серологічної діагностики інфекційних хвороб: для діагностики черевного тифу — реакцію Відаля, для діагностики бруцельозу — реакцію Райта й інші, визначення титру імунної аглютинуючої сироватки, а також для серологічної ідентифікації культури бактерій (*E. coli*, бруцел).

Для проведення розгорнутої реакції аглютинації з метою серологічної діагностики використовують такі інгредієнти: *сироватку крові хворого* (невідоме антитіло), *діагностикум* (відомий антиген) та *ізотонічний розчин натрію хлориду*.

Для серологічного дослідження у хворого беруть кров на 5—7-й день від початку захворювання, коли в ній накопичиться достатня кількість антитіл; у реконвалесцента — з метою ретроспективного діагнозу; у здорової людини — з метою виявлення латентної інфекції або бактеріоносійства.

Кров слід брати натще або не раніше ніж через 6 год після споживання їжі, оскільки в ній можуть накопичуватися краплі жиру, що робить сироватку каламутною (хільозна сироватка) та непридатною для дослідження. Найчастіше кров забирають із ліктьової вени або з пучки IV пальця, можна брати із мочки вуха, у дітей грудного віку — із п'ятки.

Забір крові потрібно проводити в асептичних умовах та з дотриманням правил техніки безпеки.

На суху чисту стерильну пробірку наклеюють етикетку, в якій зазначають: номер і назву матеріалу, заклад (відділення), або місце, де був взятий матеріал, прізвище, ім'я та по батькові хворого, дату і час взяття матеріалу. Окремо заповнюють бланк направлення встановленого зразка, в якому зазначають: номер і назву матеріалу, заклад (відділення) або місце, де був взятий матеріал, кратність направлення матеріалу (первинно чи повторно), прізвище, ім'я та по батькові хворого, його вік, дату захворювання, попередній діагноз, мету дослідження, дату і час взяття матеріалу, прізвище та посаду особи, яка направляє матеріал на мікробіологічне дослідження.

Потім одягають маску і гумові рукавички, ретельно обробляють ділянку шкіри на ліктьовому згині послідовно двома ватними тампонами, змоченими 70 % етиловим спиртом. Кров беруть стерильним шприцом в об'ємі 3—5 см³. Для запобігання гемолізу голку знімають зі шприца, а кров обережно виливають через канюлю у стерильну пробірку так, щоб вона стікала по стінці пробірки. Пробірку закривають гумовою пробкою. Краще збирати кров у спеціальну пробірку типу "Епендорф". Потім кров доставляють до лабораторії не пізніше 2—3 год у спеціальних контейнерах або біксах, на дно яких кладуть серветку з адсорбтивного матеріалу. Направлення на дослідження упаковують окремо.

Забороняється обертати направлення навколо посудини з об'єктом дослідження та вкладати його в контейнер або бікс!

Для отримання сироватки кров вміщують у термостат за температури 37 °C на 30 хв (довше залишати не можна, оскільки відбудеться гемоліз). Утворений згусток відокремлюють від стінок пробірки стерильною запаюною пастерівською піпеткою або скляною паличкою і ставлять у холодильник за температури 4—10 °C на 1—2 год, а для кращого відстоювання — на 18—20 год. Можна відділяти сироватку центрифугуванням.

Сироватку можна зберігати над згустком не довше ніж 48 год (пізніше настає гемоліз). Якщо сироватка буде використана пізніше ніж через 48 год, її відсмоктують стерильною піпеткою з гумовою грушею і переносять у стерильну

пробірку. Чиста стерильна сироватка зберігається у холодильнику до 1 міс. Головна вимога до сироватки — її прозорість.

Для постановки розгорнутої реакції аглютинації з метою серологічної діагностики використовують здебільшого стандартні антигени, які виробляють у науково-дослідних закладах. Вони містять інактивовані мікроорганізми або їх антигени. Ці антигени називають діагностикумами (від грец. *diagnostikos* — здатний розпізнавати). Діагностикуми для реакції аглютинації випускають у рідкому або ліофілізованому стані в ампулах або флаконах.

Перед використанням діагностикум перевіряють на придатність. Звертають увагу на цілість посудини, чіткість надпису на ампулі чи флаконі, відповідність його надпису, зазначеному в інструкції та на коробці, відповідність зовнішнього вигляду до зазначеного в інструкції, термін придатності.

Перед використанням рідкий діагностикум збовтують, ліо-філізований — розчиняють. Він повинен бути рівномірно каламутним, не утворювати пластівців.

Розгорнуту реакцію аглютинації з метою серологічної діагностики проводять здебільшого для виявлення антитіл у сироватці крові хворого. Оскільки використовують нативну сироватку, перед постановкою реакції її розводять. Розведення сироватки називається титруванням.

Алгоритм "Проведення розгорнутої реакції аглютинації": — підберіть 7 аглютинаційних пробірок однакового розміру, кольору скла, однакової конфігурації дна і 1 пробірку для робочого розведення;

- візьміть стерильні градуйовані піпетки об'ємом 5 см³ і 1 см³; 1 пастерівську піпетку;
- поставте у штатив 3 стерильні пробірки і позначте, для яких піпеток вони призначені;
- розгорніть стерильні піпетки і поставте у відповідні пробірки;

Увага! Піпетки мають зберігатися до кінця досліду!

- підпишіть пробірки: I — номер, вид антигену, 1:50; II — 1:100; III — 1:200; IV — 1:400; V — 1:800; VI — КС (контроль сироватки); VII — КА (контроль антигену); окрему пробірку позначте літерами Рр (робоче розведення);
- внесіть у пробірку, позначену Рр, піпеткою об'ємом 5 см³ 4,9 см³ ізотонічного розчину натрію хлориду, у дослідні (крім першої і КС) — по 1 см³;
- внесіть піпеткою об'ємом 1 см³ 0,1 см³ досліджуваної сироватки в пробірку, позначену Рр, перемішайте (розведення 1:50);
- внесіть по 1 см³ розведеної (1:50) сироватки у пробірки першу, другу і КС;
- перемішайте та перенесіть 1 см³ сироватки з другої пробірки у третю, 1 см³ із третьої у четверту, 1 см³ із четвертої у п'яту, 1 см³ із п'ятої у дезінфекційний розчин;
- додайте пастерівською піпеткою у кожен пробірку (крім КС) по 2 краплі діагностикуму;

Увага! Діагностикум додається у кожен пробірку обов'язково в однаковій кількості!

- струсіть пробірки та поставте їх у термостат (37 °С);
- вийміть пробірки з термостата через 2 год;
- проведіть попередній облік результатів, поставте пробірки в штатив і залиште їх за кімнатної температури;
- проведіть остаточний облік результату реакції через 18—20 год.

Облік результату розгорнутої реакції аглютинації починають з контролю: КС — рідина прозора, КА — рівномірне помутніння або осад у вигляді гудзика, а під час збовтування утворюється рівномірне помутніння (реакція негативна).

Потім оглядають дослідні пробірки, порівнюючи пробірки першу і другу, другу і третю, третю і четверту, четверту і п'яту.

Увага! У разі позитивної реакції утворюється осад, що покриває все дно пробірки у вигляді перевернутої парасольки, під час збовтування видно пластівці.

Реакція різко позитивна (++++) — осад у вигляді перевернутої парасольки на все дно, рідина прозора.

Реакція позитивна (+++) — розмір осаду менший, відсутнє повне просвітління рідини.

Реакція слабопозитивна (++) — розмір осаду ще менший, рідина каламутна.

Сумнівний результат реакції (+) — незначний осад, рідина каламутна.

Реакція негативна — осаду немає або осад у вигляді гудзика, рідина рівномірно каламутна.

Позитивним вважають результат з оцінкою осаду (++++) або (+++).

Останнє розведення, в якому реакція аглютинації має позитивне значення, називається титром сироватки, його зазначають у відповіді.

Здебільшого діагностичним вважають титр сироватки 1:100. Але ніколи не обмежуються одноразовим проведенням реакції аглютинації. Зазвичай її повторюють через 1—2 тиж. За наявності захворювання кількість антитіл (титр сироватки) у крові зростає, тому під час повторного проведення реакції аглютинації спостерігається наростання титру антитіл у сироватці у 2—4 рази. Це дає змогу відрізнити хворого від тієї людини, яка перехворіла або якій було зроблено щеплення. В останніх двох випадках зростання титру антитіл у сироватці крові не спостерігається.

Контрольні запитання

1. На чому ґрунтується серологічний метод діагностики?
2. Які серологічні реакції найбільш широко використовуються в лабораторній практиці?
3. На яких властивостях серологічних реакцій ґрунтується їх застосування?
4. Які проблеми вирішують за допомогою серологічних реакцій?
5. Який посуд використовують для проведення серологічних реакцій? Яким вимогам він має відповідати?
6. Які інструменти і яку апаратуру використовують для проведення серологічних реакцій?
7. Які сироватки називають імунними діагностичними? Як їх виготовляють?
8. Чим відрізняються нативні імунні діагностичні сироватки від адсорбованих? Яка різниця у їх використанні?
9. Що таке титр сироватки?
10. Які антитіла називають специфічними, які — неспецифічними?
11. Які адсорбовані сироватки називають монорецепторними, які — полівалентними?
12. Що таке аглютинація? За якою ознакою її виявляють?
13. З якою метою проводять реакцію аглютинації на склі?
14. У чому полягає принцип проведення реакції аглютинації на склі?
15. Як враховують результати реакції аглютинації на склі?
16. З якою метою використовують розгорнуту реакцію аглютинації?
17. Які інгредієнти використовують у разі проведення розгорнутої реакції аглютинації?
18. Яких умов слід дотримуватися у разі забору крові на серологічне дослідження?
19. Як оформляють і доставляють у лабораторію взяті на дослідження крові?
20. Як отримують і за яких умов зберігають сироватку крові?
21. Який антиген використовують для серологічної діагностики захворювання? У якій формі його випускають? Як перевіряють його на придатність?
22. Який посуд використовується у разі проведення розгорнутої реакції аглютинації?
23. За якими ознаками слід підбирати пробірки?
24. Як маркують посуд для проведення реакції аглютинації?
25. Як проводять титрування сироватки?

26. За яких умов і впродовж якого часу відбувається розгорнута реакція аглютинації?
27. Як враховують результат реакції аглютинації?
28. Як визначають титр сироватки, як його зазначають у відповіді?
29. Як за допомогою реакції аглютинації відрізнити хворого від того, що перехворів або був щеплений?

Тести

1. Під час серологічної діагностики у сироватці крові виявляють:
 - а) невідоме антитіло;
 - б) невідомий антиген;
 - в) усі відповіді правильні.
2. Серологічна ідентифікація культури мікроорганізмів полягає у визначенні:
 - а) антигенної структури;
 - б) форми клітини;
 - в) здатності розчинятися специфічним фагом;
 - г) спорідненості до барвників.
3. Імунні діагностичні адсорбовані сироватки містять:
 - а) відомий антиген;
 - б) специфічні антитіла;
 - в) неспецифічні та специфічні антитіла;
 - г) всі відповіді правильні.
4. Кров на серологічне дослідження відбирають:
 - а) у 1-й день захворювання;
 - б) на 2-й день захворювання;
 - в) наприкінці 1-го тижня захворювання;
 - г) всі відповіді правильні.
5. Як діагностиком у серологічних реакціях можуть бути використані:
 - а) живих мікроорганізмів;
 - б) убитих мікроорганізмів;
 - в) окремі антигени мікроорганізмів;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. Оцініть результати реакції аглютинації на склі із прозою краплею у КС:
 - 1) у КА — рівномірне помутніння, у Д — пластівці;
 - 2) у КА І Д — рівномірне помутніння;
 - 3) у КА І Д — пластівці.
2. Під час проведення розгорнутої реакції аглютинації з сироваткою крові, відібраної на 6-й день хвороби, титр сироватки з черевнотифозним діагностиком виявився 1:50. Під час повторного проведення реакції через 2 тиж після першого титр сироватки становив 1:200. Як оцінити цей результат?
3. Під час проведення розгорнутої реакції аглютинації з сироваткою крові, відібраної на 6-й день хвороби, титр сироватки з черевнотифозним діагностиком виявився 1:50, під час повторного проведення реакції через 2 тиж після першого титр сироватки становив 1:50. Як оцінити цей результат?
4. Під час проведення розгорнутої реакції аглютинації сироватку крові хворого розвели у співвідношенні від 1:50 до 1:1600. У першій і другій дослідних пробірках осад оцінюється (++++), у третій — (+++), у четвертій — (++) , у п'ятій — (+), у шостій — (-). Який титр цієї сироватки?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 6.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 6

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 165—189; практикум, с. 79—89).

Практичне заняття 6

ВАКЦИНИ. СИРОВАТКИ. МЕТОДИ АЛЕРГОДІАГНОСТИКИ

Мета заняття:

— знати види препаратів для специфічної імунопрофілактики, імунотерапії інфекційних хвороб та алергодіагностики.

Оснащення: витяг з Наказу МОЗ України № 48 від 03.02.2006 р., препарати вакцин, сироваток, імуноглобулінів.

План

1. Ознайомлення з препаратами вакцин, інструкціями щодо їх застосування. *У2.* Ознайомлення з основними положеннями Наказу МОЗ України № 48 від 03.02.2006 р. "Про порядок проведення профілактичних щеплень в Україні".
3. Поняття про автовакцини.
4. Ознайомлення з препаратами сироваток, імуноглобулінів, методами їх отримання та застосування.
5. Алергодіагностика.

Хід заняття

1. Ознайомлення з препаратами вакцин, інструкціями щодо їх застосування

Вакцини і сироватки використовують для проведення специфічної імунопрофілактики та імунотерапії.

(Специфічна імунопрофілактика — це система заходів, спрямована на запобігання, обмеження поширення і ліквідацію інфекційних хвороб шляхом проведення профілактичних щеплень.

Специфічна імунотерапія — це метод лікування, оснований на введенні в організм вакцин і сироваток.

Профілактичні щеплення — це вирішальний засіб боротьби з інфекційними хворобами. До виробництва і контролю вак-

цинних препаратів пред'являються особливо жорсткі вимоги, що зумовлено використанням патогенних мікробів для їх виготовлення.

Виготовлення вакцинних препаратів проводять з урахуванням рекомендацій ВООЗ. Відповідальність за якість випущених препаратів несе підприємство-виробник. Контроль за випуском і використанням імунобіологічних препаратів покладено на Управління профілактики інфекційних захворювань ГССУ МОЗ України та Державне підприємство "Центр імунобіологічних препаратів".

Завдання 1. *Ознайомтеся з препаратами вакцин, інструкціями щодо їх застосування.*

Прочитайте, які дані про вакцину зазначено на коробці: назва вакцини, адреса підприємства-виробника, кількість вакцини, серія, контрольний номер, термін придатності, спосіб введення.

Прочитайте інструкцію щодо застосування вакцини. Зверніть увагу на склад вакцини, її імунобіологічні властивості, призначення, спосіб застосування, реакції на введення, протипоказання, форму випуску, умови зберігання та транспортування, термін придатності та в які організації посилається рекламація (від лат. *gestamano* — голосне заперечення) на препарат у разі підвищеної реактогенності вакцини чи розвитку поствакцинальних ускладнень (методи виготовлення вакцин — див. підручник, тема 7).

2. Ознайомлення з основними положеннями Наказу МОЗ України № 48 від 03.02.2006 р. "Про порядок проведення профілактичних щеплень в Україні"

Завдання 2. *Ознайомтеся з вимогами щодо проведення вакцинації.*

Профілактичні щеплення проводять в кабінетах при лікувально-профілактичних закладах, медичних кабінетах дошкільних і шкільних установ (спеціальних освітніх установ), медпунктах підприємств та кабінетах щеплень суб'єктів підприємницької діяльності, які мають відповідну ліцензію на медичну практику із застосуванням профілактичних щеплень.

Профілактичні щеплення проводять медичні працівники, що володіють правилами організації та техніки проведення щеплень, а також заходами невідкладної допомоги у разі розвитку поствакцинальних реакцій і ускладнень.

Обсяги профілактичних щеплень узгоджують з територіальними санітарно-епідеміологічними станціями.

Перед проведенням профілактичного щеплення обов'язково проводиться медичний огляд з термометрією для виключення наявності гострого захворювання.

Після проведення профілактичного щеплення потрібно забезпечити медичний нагляд протягом терміну, визначеного інструкцією.

У разі розвитку незвичайної реакції або ускладнення на введення вакцини необхідно негайно повідомити керівника лікувально-профілактичного закладу і направити екстрене повідомлення (форма № 58) до територіальної санітарно-епідеміологічної станції.

Кабінет щеплень має бути оснащений:

- інструкціями щодо застосування вакцин та інструктивно-методичними рекомендаціями;
- холодильником, призначеним тільки для зберігання вакцин;
- шафою для інструментів і медикаментів;
- біксами зі стерильним матеріалом;
- медичною кушеткою та повивальним столиком;
- столами для підготовки препаратів до використання та для збереження документації;
- посудиною з дезінфекційним розчином;
- нашатирним і етиловим спиртом, сумішшю ефіру зі спиртом або ацетоном;
- тонометром, термометром, одноразовими шприцами;
- засобами протишокової терапії.

У кабінеті для проведення масових щеплень підлога, панелі, стіни та столи миють гарячою водою з милом або протирають серветками, змоченими 0,2 % розчином дезактіну або іншого дезінфекційного засобу. Стіл для інструментів накривають стерильним простирадлом. Після цього в кімнату допускаються лише

ті особи, які беруть участь у проведенні щеплень. Усі медичні працівники повинні зняти обручки, годинники, браслети, коротко підстригти нігті, надягти чисті, щойно попрашовані халат і шапочку, помити руки водою з милом та щіткою, надягти продезінфіковані рукавички. Після кожної маніпуляції рукавички миють і обробляють стериліумом. Через кожні 2 год рукавички знімають і занурюють у розчин дезінфекційного засобу на 1 год, потім промивають водою, висушують. Після кожного необережного доторкування до нестерильного предмета рукавички обробляють дезінфекційним розчином.

Перед використанням препарату треба звернути увагу на правильність розфасовки, цілість етикеток і ампул, а також на фізичні особливості препарату. Кожна коробка, в яку були розфасовані ампули або флакони з препаратом, повинна мати етикетку. На цій етикетці мають бути вказані назва установи-виробника, її адреса, повна назва препарату та його дози, номер серії, контрольний номер, термін використання та умови зберігання. На кожній ампулі також має бути чітка етикетка, де зазначено кількість препарату в ампулі, номер, серію, контрольний номер, термін зберігання.

Препарати не можна використовувати:

- 1) за відсутності етикеток або повних даних;
- 2) за наявності будь-яких пошкоджень ампули або сторонніх включень (скло, пластівці, нитки та ін.);
- 3) у разі зміни фізичних властивостей препарату, не передбачених інструкцією;
- 4) у разі закінчення терміну придатності;
- 5) у разі порушення умов зберігання.

Відкриття ампул, розчинення ліофілізованих вакцин, вакцинацію проводять відповідно до інструкції за чіткого дотримання правил асептики. Безпосередньо перед використанням препарату кінець ампули протирають спочатку етиловим спиртом, а потім досуха стерильною ватою або серветкою. Надрізають пилочкою, після чого вдруге протирають етиловим спиртом, накривають серветкою, обламають і через отвір набирають препарат у шприц. Перед використанням сухих препаратів їх попередньо розчиняють дистильованою водою, ізотонічним розчином натрію хлориду або спеціальним розчинником, які вводять в отвір ампули за допомогою шприца в кількості, вказаній на етикетці. Якщо сухий препарат знаходиться у флаконі або ампулі, розчинник вводять у флакон шляхом проколу гумової пробки, попередньо знявши пінцетом металевий ковпачок та протерши поверхню пробки етиловим спиртом. Після введення розчинника в ампулу або флакон та змочування сухого препарату ампулу або флакон злегка струшують та залишають стояти до повного розчинення. Отвір ампули накривають стерильною марлевою серветкою. Шприц, яким вводили розчинник в ампулу чи флакон, загортають у стерильну марлеву серветку. Після повного розчинення вмісту ампули чи флакона препарат вводять пацієнту тим самим шприцом, яким вводили розчинник.

Розкрити ампулу чи флакон слід використати в перші години після відкриття (згідно з інструкцією до кожного препарату), зберігання не підлягає. Шкіру на місці щеплення безпосередньо перед ін'єкцією протирають 70 % етиловим спиртом, якщо немає інших вказівок. Знезаражену шкіру захоплюють у складку лівою рукою, а голку вводять в основу складки зверху вниз. Інструменти, які використовують для вакцинації, мають бути одноразовими. Їх потрібно приводити у непридатність у присутності пацієнта.

Календар профілактичних щеплень

(витяг з Наказу ІУОЗ України № 48 від 03.02.2006 р.)

Вік	Щеплення проти				
1 день		Гепатиту В			
3–7 днів	Туберкульозу				
1 міс		Гепатиту В			
3 міс			Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту (ІПВ)	Гемофільної інфекції
4 міс			Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту (ІПВ)	Гемофільної інфекції
5 міс			Дифтерії, коклюшу, правця	Поліомієліту (ОПВ)	Гемофільної інфекції
6 міс		Гепатиту В			
12 міс					Кору, краснухи, епідемічного паротиту

Вік	Щеплення проти				
18 міс			Дифтерії, коклюшу, правця (АаКДП)	Поліомієліту (ОПВ)	Гемофільної інфекції
6 років			Дифтерії, правця	Поліомієліту	Кору, краснухи, епідемічного паротиту
7 років	Туберкульозу				
14 років	Туберкульозу		Дифтерії, правця	Поліомієліту	
18 років				Краснухи (дівчата), епідемічного паротиту (хлопці)	
Дорослі			Дифтерії, правця		

Примітка. ІПВ — інактивована поліомієлітна вакцина; ОПВ — оральна поліомієлітна вакцина; АаКДП — вакцина зі зменшенням коклюшного компоненту (дітям з високим ризиком розвитку післявакцинальних ускладнень).

і/

* Наказ МОЗ України № 48 регламентує три види щеплень:

- 1) планові, які проводять у терміни, визначені національним календарем профілактичних щеплень (щеплення за віком);
- 2) щеплення, які проводять на ендемічних і ензоотичних (від грец. *en* — в і *20on* — тварина) територіях, тобто територіях, на яких постійно циркулює певна інфекція серед певного виду тварин, та за епідемічними показаннями;
- 3) рекомендовані щеплення, які проводять особам, які входять до групи підвищеного ризику (медичні працівники, військові, мисливці тощо), а також у разі звернення за медичною допомогою з приводу укусів, подряпин, ослинення хворими або підозрюваними на сказ тваринами.

У Наказі висвітлені питання: яку вакцину слід використовувати залежно від стану здоров'я, наявності тимчасових медичних протипоказань; наведена схема вакцинації ВІЛ-інфікованих та хворих на СНІД дітей (дітям з діагнозом "СНІД"

вакцинацію не проводять), а також схема вакцинації проти вірусного гепатиту В дітей із злоякісними новоутвореннями, дітей, що перебувають на гемодіалізі та отримують багаторазові довготривалі переливання донорської крові або її препаратів.

3. Поняття про автовакцини

Завдання 3. Ознайомтеся з принципом виготовлення автовакцин.

Автовакцини — це вакцини, виготовлені із штаму збудника, виділеного від хворого, і призначені для лікування цього ж хворого.

Для цього проводять посів патологічного матеріалу на щільне поживне середовище, виділяють чисту культуру, потім її змивають стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду і доводять до певної густини за стандартом мутності. Культуру мікроорганізмів інактивують (частіше за умови підвищеної температури). Виготовлену вакцину перевіряють на стерильність, розливають в ампули і запаюють. Термін придатності автовакцини — 6 міс.

Оскільки автовакцина виготовляється з тієї самої мікрофлори, яка спричинила хворобу, її застосування дає більший ефект, ніж гетерогенна вакцина. Автовакцини використовують для лікування фурункульозу, фолікуліту, гідраденіту, отиту, рецидивуючих хвороб верхніх дихальних шляхів (риніт, синусит, фарингіт, бронхіт), циститу, уретриту, пієліту й інших хронічних і рецидивуючих захворювань стафілококової етіології. Інколи автовакцини використовують для лікування вірусних інфекцій (герпес). Після перевірки на наявність в організмі гіперчутливості автовакцини вводять за певною схемою.

4. Ознайомлення з препаратами сироваток, імуноглобулінів, методами їх отримання та застосування

Завдання 4. Ознайомтеся з препаратами сироваток та імуноглобулінів, методами їх отримання і застосування.

Прочитайте, які дані про препарат зазначено на коробці, які — в інструкції про застосування препарату. Зверніть увагу, з чого виробляють препарат, для чого використовують, як вводять, за яких умов зберігають (види сироваток, імуноглобулінів, методи їх отримання — див. підручник, тема 7).

5. Алергодіагностика

Завдання 5. Ознайомтеся з принципами алергодіагностики.

Накопичення в макроорганізмі під впливом мікроорганізмів факторів імунної відповіді (сенсibilізованих лімфоцитів), які виконують не тільки функцію специфічного захисту, а й сенсibilізують макроорганізм, призводить до формування специфічної гіперчутливості. На виявленні специфічної гіперчутливості ґрунтується алергодіагностика. Сенсibilізовані Т-лімфоцити специфічно взаємодіють з алергеном і продукують медіатори запалення. Специфічність цих реакцій використовують у діагностиці багатьох інфекційних хвороб. При цьому специфічний алерген вводять підшкірно (за Кохом), нашкірно (за Пірке) або внутрішньошкірно (за Ман-ту). Як алерген використовують фільтрат бульйонної культури (туберкулін), лізат бульйонної культури (актинолізат), завис убитих бактерій (тулярин, бруцелін). За наявності гіперчутливості на місці введення алергену виникає місцева реакція, яка проявляється інфільтратом, гіперемією, болем. Іноді виникають і загальні реакції: загальна слабкість, загострення інфекційного процесу. Найчастіше діагностичні алергійні реакції проводять за Манту. Для цього 0,1 см³ алергену вводять внутрішньошкірно у верхню третину дольної поверхні передпліччя. Результати враховують через 2 доби. Діаметр інфільтрату вимірюють прозорою лінійкою і роблять висновок про наявність відповідного збудника в організмі. При туберкульозі, туляремії позитивною вважають реакцію, за якої діаметр інфільтрату становить 5 мм і більше. Алергодіагностика використовується обмежено через небезпеку виникнення системної анафілактичної або місцевої відстроченої реакції.

Контрольні запитання

1. Дайте характеристику вивченого Вами препарату вакцини.
2. Визначте, чи придатний цей препарат для використання.
3. У якому разі та в які організації надсилають рекламації на вакцинні препарати?
4. Які види щеплень проводять в Україні згідно з Наказом МОЗ України № 48?
5. Що таке національний календар профілактичних щеплень?
6. У якому разі вакцину не можна використовувати?
7. Яким вимогам має відповідати кабінет щеплень?
8. Яких санітарно-гігієнічних норм повинен дотримуватися персонал кабінету щеплень?
9. Що таке автовакцина? Для чого вона використовується?
10. У чому полягає принцип виготовлення автовакцини?
11. Дайте характеристику вивчених Вами препаратів лікувальної сироватки, імуноглобуліну.
12. Що таке алергодіагностика?

Тести

1. Атенуйовані вакцини містять:
 - а) живі мікроби;
 - б) убиті мікроби;
 - в) анатоксин;
 - г) убиті мікроби й анатоксин.
2. Не підлягають використанню вакцини:
 - а) які не відповідають за фізичними властивостями;
 - б) що мають нечітке маркування на ампулі;
 - в) сорбовані вакцини, які були заморожені;
 - г) всі відповіді правильні.
3. Гетеро логічні імуноглобуліни виготовляють із сироватки крові:
 - а) імунізованих донорів;
 - б) перехворілих людей;
 - в) гіперімунізованих тварин;
 - г) всі відповіді правильні.
4. Чи можна використовувати вакцину після закінчення терміну придатності:
 - а) так, якщо вона пройшла перереєстрацію в НДІ з контролю і стандартизації біологічних препаратів;
 - б) так, якщо правильно зберігалась;
 - в) ні, вакцини не підлягають переконтролю;
 - г) так, якщо не змінилися її фізичні властивості.
5. Метод Безредки дає змогу:
 - а) виявити чутливість макроорганізму до препарату;
 - б) провести десенсибілізацію організму;
 - в) провести гіпосенсибілізацію організму;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. Після введення корової вакцини дитина нездужає, температура тіла 37,5 °С, спостерігається висип на шкірі, загальна слабкість, апатія, відсутність апетиту. Як оцінити цей стан: реакція на вакцину чи ускладнення?
2. У день проведення планових профілактичних щеплень під час проведення медичного огляду дитини виявлена гіперемія зів, температура тіла 37,5 °С. Чи можна цій дитині проводити планове профілактичне щеплення?

3. У дитини алергія на курячі яйця. Чи можна їй провести планове щеплення проти кору вакциною, виготовленою з вірусів, вирощених на курячому ембріоні?

4. Холодильник, у якому зберігалися вакцини, зіпсувався. Протягом однієї доби вакцини зберігалися за кімнатної температури. Як вчинити з вакцинами: використати за призначенням, відправити на переконтроль чи знищити?

5. Людина перебувала в контакті з хворим на грип. Який препарат (грипову вакцину чи протигриповий імуноглобулін) їй слід ввести для профілактики грипу? Чому?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 7.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 7

Підготуйтеся до модульного контролю із загальної мікробіології (див. підручник, с. 6—189; практикум, с. 10—91).

Практичне заняття 7

МОДУЛЬНИЙ КОНТРОЛЬ З РОЗДІЛУ "ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ"

Мета заняття:

- знати морфологію мікроорганізмів, методи визначення морфологічних і тинкторіальних властивостей;
- знати фізіологію мікроорганізмів, методи вивчення їх біохімічних властивостей;
- знати вплив чинників навколишнього середовища на мікроорганізми;
- знати генетику мікроорганізмів, фаги і їх роль у формуванні мінливості;
- знати антибактеріальні препарати і методи їх раціонального застосування;
- знати умови і механізми розвитку інфекційного процесу;
- знати захисні механізми макроорганізму, форми прояву імунної відповіді; використання факторів імунної відповіді для діагностики інфекційних хвороб;
- знати види препаратів для формування специфічного імунітету;
- уміти обладнати робоче місце, провести дезінфекцію робочого місця, рук; підготувати препарати з нативного матеріалу і культури мікроорганізмів, пофарбувати їх простим методом і за Грамом, провести мікроскопію з використанням імерсійної системи; провести взяття і посів патологічного матеріалу та культури мікроорганізмів; провести ідентифікацію культури за культуральними та біохімічними властивостями; провести реакцію аглютинації на склі.

Рекомендації щодо проведення модульного контролю

Модульний контроль проводять як семінар-практикум за схемою:

1. Комп'ютерне тестування.
2. Виконання практичних навичок.
3. Розв'язування ситуаційних задач.

Виконання практичних навичок і відповіді студентів коментують самі студенти. Таким чином, контролюючи, навчаються. Оцінки виставляються за кожне завдання окремо, додаткова оцінка — за коментар щодо виконання практичних навичок і відповідей. Підсумкова оцінка виставляється з урахуванням усіх видів роботи студента.

Орієнтовний перелік практичних навичок

1. Підготувати мікроскоп, визначити морфологію і тинк-торіальні властивості мікроорганізмів у виготовленому препараті.
2. Виготовити препарат із бульйонної культури ешерихій, пофарбувати фуксином Пфейффера. Визначити під мікроскопом морфологію бактерій.
3. Виготовити препарат із агарової культури стафілокока, пофарбувати за Грамом. Визначити під мікроскопом морфологію і тинкторіальні властивості бактерій.
4. Виготовити препарати із крові (мазок і "товсту краплю").
5. Виготовити препарат із в'язкого матеріалу.
6. Провести взяття патологічного матеріалу з носа тампоном, виконати посів на середовище ЖСА.
7. Описати культуральні властивості ешерихій на середовищі Ендо.
8. Провести посів випорожнень петлею на середовище Ендо.
9. Провести посів шпателем на пластинчасте поживне середовище.
10. Визначити ферментативні властивості культури мікроорганізмів на строкатому ряду Гісса.
11. Визначити ферментативні властивості культури на ЖСА і кров'яному агарі.
12. Описати культуральні властивості мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі.
13. Провести дезінфекцію рук, робочого місця.
14. Провести орієнтовну реакцію аглютинації на склі.
15. Врахувати результати розгорнутої реакції аглютинації.
16. Дати характеристику препарату (вакцини, сироватки, імуноглобуліну, антибактеріального препарату).

Зразки тестів і ситуаційних задач подані до кожної теми.

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 8.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 8

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 190— 217; практикум, с. 93—104).

Модуль II СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Практичне заняття 8

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ ПАТОГЕННИМИ КОКАМИ

Мета заняття:

- знати особливості взяття патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування в бактеріологічну лабораторію;
- проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження;
- проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища;
- знати препарати для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними коками.

Оснащення: поживні середовища (ЖСА, КА, СА, цукровий бульйон — у пробірках і флаконі), тампони для зів, шпатель для зів, бланки направлень, бікс, серветка з адсорбтивного матеріалу, шпатель для посіву, спиртівка, сірники, маркер, штативи, папка чи поліетиленовий пакет, ріст культури стафілокока на КА і ЖСА, плазмі, середовищі з манітом, пластинчастому середовищі з

паперовими дисками, просякнутими антибіотиками, фантом для демонстрації взяття патологічного матеріалу з носа і зів'я, препарати для профілактики і лікування хвороб кокової етіології, препарати фагів стафілококових типів.

План

1. Взяття слизу із зів'я і носа, оформлення направлення, підготовка матеріалу до транспортування.
2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на ЖСА, КА і цукровий бульйон.
3. Вивчення схеми лабораторного дослідження з метою виявлення й ідентифікації стафілокока.
4. Ознайомлення з методикою взяття крові при сепсисі, проведення посіву.
5. Ознайомлення з методами взяття патологічного матеріалу і лабораторної діагностики хвороб менінгокової та гонокової етіології.
6. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними коками.

Хід заняття

1. Взяття слизу із зів'я і носа, оформлення направлення, підготовка матеріалу до транспортування

Завдання 1. **Проведіть взяття слизу із зів'я і носа з метою обстеження на стафілококове носійство.**

Обстеження на стафілококове носійство проводять для профілактики внутрішньолікарняної інфекції в акушерських, хірургічних, опікових стаціонарах, дитячих лікарнях, а також для профілактики харчових токсикоінфекцій на підприємствах харчової промисловості. Під час планових профілактичних обстежень виявляють тільки *S. aureus*, під час діагностичних досліджень виявляють всі види стафілококів.

Взяття патологічного матеріалу проводять відповідно до вимог нормативних документів, що регламентують (від франц. *regle* — правило) санітарно-гігієнічний стан певного закладу.

Оскільки патогенні стафілококи зазвичай потрапляють в організм людини через дихальні шляхи, для профілактичного обстеження відбирають матеріал з носа або з носа і зів'я (інколи роблять змиви з рук або відбирають кал).

Взяття матеріалу з носа і зів'я проводять окремими сухими стерильними ватними тампонами натще або не раніше ніж через 2—3 год після споживання їжі. На пробірках з тампонами підписують номер аналізу, на одному тампоні ставлять літеру "Н", що означає "ніс", на іншому — літеру "З", що означає "зів'я".

Алгоритм **"Взяття патологічного матеріалу ватним тампоном із зів'я"**:

Увага! Під час взяття патологічного матеріалу дотримуйтеся правил асептики та техніки безпеки.

- поставте в штатив дві пробірки зі стерильними тампонами;
- проведіть маркування пробірок (поставте номер, "З" і "Н");
- запропонуйте пацієнту сісти проти джерела світла, відкинути голову назад і широко відкрити рот;
- візьміть тампон "З" у праву руку, звільніть його від пробірки;
- візьміть стерильний шпатель у ліву руку, притисніть ним корінь язика;
- зберіть матеріал обертальними рухами, злегка натискаючи на тампон, з мигдаликів, дужок піднебіння, язичка і задньої стінки глотки;
- виведіть тампон із зів'я, не торкаючись тампоном язика, слизової оболонки щік та зубів;
- опустіть тампон у пробірку;

Увага! Алгоритм "Взяття патологічного матеріалу ватним тампоном із носа" див. практичне заняття 3, завдання 5.

— скріпіть дві пробірки одного пацієнта гумовим кільцем, покладіть у лоток.

Примітка. Тампоном, яким був відібраний матеріал із зівя, можна робити посіви для виявлення і стафілококів, і стрептококів.

Завдання 2. *Оформіть направлення.*

Зверніть увагу на уніфікованість медичної документації. Кожний вид документації має свій код. Всі пункти направлення мають бути заповнені, тому що всі дані використовують під час приймання матеріалу в лабораторію (наприклад, час взяття матеріалу: якщо не витриманий термін доставки матеріалу, про це обов'язково зазначається у відповіді), під час проведення дослідження (лаборанти повинні знати, які мікроорганізми слід виявити), проведення протиепідемічних заходів (адреса хворого, місце роботи, навчання чи лікарня, де перебуває хворий), для призначення раціонального лікування тощо.

Завдання 3. *Ознайомтеся з підготовкою матеріалу до транспортування.*

Алгоритм "Підготовка матеріалу до транспортування":

- відкрийте бікс;
- покладіть на дно бокса серветку з адсорбтивного матеріалу, бавовняну або бязеву пелюшку;
- покладіть на серветку пробірки з тампонами;
- закрийте пробірки з тампонами кінцями серветки;
- закрийте бікс;
- складіть направлення у поліетиленовий пакет чи папку.

Увага! До лабораторії матеріал у біксі чи контейнері і окремо направлення у папці або пакеті відносять або перевозять на спеціальному транспорті.

2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на ЖСА, КА і цукровий бульйон

Завдання 4. *Проведіть первинний посів патологічного матеріалу на ЖСА, КА і цукровий бульйон (середовище накопичення).*

Алгоритм "Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на ЖСА, КА і цукровий бульйон":

- поділіть маркером дно чашки із середовищами ЖСА і КА на 2 частини по діаметру;
- підпишіть чашки для посіву (див. практичне заняття 3, завдання 2), поставте на одному секторі "Н", на другому — "З";
- підпишіть на пробірці з цукровим бульйоном номер аналізу, дату посіву і назву середовища;
- візьміть у праву руку тампон "Н", зробіть посів зигзагоподібними штрихами на відповідний сектор чашки Петрі із середовищами ЖСА і КА (алгоритм — див. практичне заняття 3, завдання 6);
- опустіть тампон у пусту пробірку "Н";
- візьміть у праву руку тампон "З", зробіть посів зигзагоподібними штрихами на відповідний сектор чашки Петрі із середовищами ЖСА і КА;
- візьміть у ліву руку пробірку з цукровим бульйоном, відкрийте її мізинцем правої руки (пробку весь час тримайте у руці!);
- зафламбуйте отвір пробірки, опустіть тампон "З" у пробірку до дна;
- струшуйте пробірку з бульйоном і тампоном протягом 10 хв (пробірку тримайте у правій руці і злегка ударяйте по долоні лівої руки);
- вийміть тампон із бульйону, віджавши його об стінки пробірки;
- зафламбуйте отвір пробірки, зафламбуйте пробку, закрийте пробірку цією пробкою, поставте її у штатив;

— опустіть тампон у пусту пробірку "З".

Завдання 5. *Поставте чашки Петрі і пробірки з посівами у термостат.*

Увага! Включіть термостат. Якщо він уже включений, перевірте показання термометра.

Завдання 6. *Приберіть робоче місце.*

Зітріть написи на пробірках з тампонами, поставте їх у штатив (підготуйте до стерилізації). Протріть робоче місце, вимийте руки.

3. Вивчення схеми лабораторного дослідження з метою виявлення й ідентифікації стафілокока

Завдання 7. *Вивчіть схему виділення й ідентифікації стафілококів.*

Схема виділення й ідентифікації стафілококів

/ *етап*. Посів досліджуваного матеріалу або із середовища накопичення на ЖСА (МСА), КА.

77 етап. Визначення лецитинази і попереднє визначення пігменту на ЖСА, гемолізу — на КА (демонстрація росту стафілококів на КА і ЖСА).

Виготовлення мазків, фарбування за Грамом, визначення морфології і тинкторіальних властивостей.

Постановка реакцій з метою виявлення каталази і плазмо-коагулази.

Пересів підозрілої колонії на скошений МПА з метою виділення чистої культури.

/77 етап. Остаточне визначення пігменту. Перевірка чистоти культури.

Виявлення плазмокоагулюючої активності (демонстрація росту стафілококів на плазмі).

Далі диференціацію стафілококів продовжують по-різному, залежно від попередніх результатів.

Ферментацію вуглеводів (маніту) в аеробних умовах досліджують на щільному поживному середовищі, в яке додають вуглевод і індикатор. Результат визначають за зміною (не зміною) кольору індикатора (демонстрація росту стафілококів на середовищі з манітом).

Визначення чутливості до антибіотиків (демонстрація чашки Петрі з ростом стафілококів за наявності паперових дисків, просякнутих антибіотиками).

Визначення фаговаріанта (демонстрація препаратів "фаги стрептококові типові").

IV—V етапи. Проведення обліку і виписування результатів дослідження.

4. Ознайомлення з методикою взяття крові при сепсисі, проведення посіву

Завдання 8. *Ознайомтеся з методикою посіву крові при сепсисі.*

Кров відбирають на дослідження при сепсисі. Сепсис можуть спричинити будь-які гноетворні коки й інші мікроорганізми, а в ослабленому організмі й умовно-патогенні у разі їх проникнення у кров. Культура бактерій, виділена із крові, називається ге-мокультурою. Кров на гемокультуру відбирають з перших днів захворювання стерильним шприцом від 5 до 20 см³ (залежно від строків захворювання і вираженості клінічних симптомів). Одразу після взяття біля ліжка хворого в асептичних умовах кров висівають у рідке поживне середовище (цукровий бульйон — для виявлення аеробів, або на середовище Кітта—Тароцці — для виявлення анаеробів) у співвідношенні 1:10. За наявності такої кількості поживного середовища пригнічується бактерицидна дія крові і мікроби здатні давати масивний ріст. Для виділення чистої культури роблять пересів з бульйону на щільне поживне середовище: у перші 3 дні — кожного дня, потім тричі через день, потім — 1 раз на тиждень. Якщо через 4—6 тиж ріст культури відсутній, результат вважають негативним. У разі появи колоній на щільному поживному

середовищі виділяють чисту культуру й ідентифікують за схемою (див. завдання 7).

5. Ознайомлення з методами взяття патологічного матеріалу і лабораторної діагностики хвороб менінгококової та гонококової етіології

Завдання 9. Ознайомтеся з методами лабораторної діагностики хвороб менінгококової етіології.

Лабораторне обстеження проводять з діагностичною метою і за епідеміологічними показаннями. З діагностичною метою обстежують хворих з клінічно вираженою формою хвороби, стертою формою (назофарингіт), з підозрою на менінгококову інфекцію та менінгіти іншої етіології. За епідеміологічними показаннями обстежують осіб, що перебували у контакті з хворим на менінгококову інфекцію.

Лабораторну діагностику проводять бактеріологічним методом (виділення й ідентифікація збудника) і серологічним (виявлення специфічного антигену у рідинах організму (спинномозковій рідині, крові) або антитіл у сироватці крові).

Патологічний матеріал відбирають із задньої стінки глотки натще або через 3—4 год після їди стерильним ватним тампоном, закріпленим на алюмінієвому дроті і опущеним у стерильну пробірку. Матеріал, взятий на сухий тампон, негайно засівають на поживне середовище.

Алгоритм "Взяття носоглоткового слизу за підозри на менінгококову інфекцію":

- запропонуйте пацієнту сісти обличчям до джерела світла;
- візьміть із штативу у ліву руку пробірку з тампоном, напишіть на пробірці номер аналізу;
- вийміть правою рукою із пробірки тампон, зігніть його об край отвору пробірки під кутом 135° на відстані 2—3 см від кінця;

Увага! Щоб не допустити розтріскування скла пробірки і травми рук, великий палець лівої руки тримайте на краю отвору пробірки, а великим пальцем правої руки натисніть на дрот тампона!

- поставте у штатив пробірку, зігнутий тампон тримайте у правій руці;
- візьміть у ліву руку стерильний шпатель для зіву;
- запропонуйте пацієнту відкрити широко рота;
- натисніть шпателем на корінь язика;
- уведіть тампон зігнутим кінцем догори за м'яке піднебіння в носоглотку, проведіть 2—3 рази тампоном по задній стінці глотки;

Увага! Під час введення і виведення тампон не повинен торкатися зубів, слизової оболонки щік, язика і язичка!

- виведіть тампон із ротової порожнини, опустіть його у пробірку, розгинаючи тампон об край пробірки;

Увага! Якщо тампон потрібно відправити до лабораторії, то перед взяттям матеріалу його зволожують. Якщо матеріал відбирається сухим тампоном, то його опускають у середовище накопичення.

- проведіть посів на середовище СА шпателем (див. практичне заняття 3, завдання 7).

Спинномозкову рідину відбирають у хворого одразу після прибуття хворого у стаціонар з дотриманням усіх правил асептики (маніпуляцію виконує лікар). Хворому пропонують лягти на бік, зігнути ноги в колінах і привести їх до живота, голову нахилити до грудей. Шкіру у місці пункції протирають спиртом, знеболюють місце проколу і проводять прокол спинномозкового каналу між III і IV або між IV і V поперековими хребцями довгою (9—12 см) голкою Біра з мандреном. Відчувши "провал", обережно виймають мандрен і підставляють під

канюлю голки суху чисту пробірку, в яку збирають 1 см³ спинномозкової рідини для проведення її загального клінічного дослідження. Другу порцію (2—4 см³) для бактеріологічного дослідження збирають у стерильну центрифужну або аглютинаційну пробірку. Потім видаляють голку, шкіру на місці проколу обробляють антисептиком і накладають асептичну пов'язку. Після пункції протягом доби хворий повинен суворо дотримуватися постільного режиму.

Увага! Менінгококи надто чутливі до коливань температури. Взятий на аналіз матеріал відразу висівають на тепле поживне середовище або укутують у вату, вміщують у термос чи бікс і обкладають грілками з водою, підігрітою до 37—40 °С.

Завдання 10. *Ознайомтеся з методами лабораторної діагностики гонококової етіології.*

Для якісного проведення лабораторної діагностики важливе значення має правильне взяття патологічного матеріалу від хворого.

У чоловіків досліджують виділення із сечівника, парауре-тральних ходів, у деяких випадках — з прямої кишки, гортані, мигдаликів.

Взяття матеріалу із сечівника проводять не раніше 4—5 год після сечовиділення. Отвір сечівника протирають ватним тампоном, змоченим стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду, натискають на сечівник, перші краплі виділень витирають тампоном, а подальші використовують для виготовлення мазків і для посівів на поживні середовища.

Матеріал можна відбирати ложкою Фолькмана, а для посіву — бактеріологічною петлею. Для цього ложку або петлю просувають у сечівник на глибину 3—4 см.

Під час обстеження жінок обов'язково беруть матеріал із сечівника, цервікального каналу і піхви, а в разі потреби — із прямої кишки, горла, мигдаликів. Отвір сечівника протирають сухим ватним тампоном, сечівник притискають до лобкової кістки, матеріал відбирають ложкою Фолькмана або жолобкуватим зондом, уводячи інструмент у сечівник на 1,5—2 см.

Шийку матки протирають сухим ватним тампоном, виділення беруть довгим гінекологічним пінцетом, просуваючи його у цервікальний канал на 2 см. У дівчаток досліджують виділення слизової оболонки сечівника, піхви і прямої кишки. Матеріал забирають так само, як у жінок, але з піхви беруть обережно жолобкуватим зондом або вушною ложкою через гіменальний отвір.

Відібраний патологічний матеріал досліджують мікроскопічним або бактеріологічним методами.

Для мікроскопічного дослідження матеріалу, взятого у жінок, виготовляють 3 мазки на одному предметному склі. Одночасно роблять мазки на двох предметних стеклах, тобто виготовляють 2 препарати. Скло ділять маркером на 3 ділянки, підписують номер аналізу і позначають ділянки: I — U (лат. *uretra* — сечівник), II — C (цервікальний канал), III — V (вагіна, піхва). На цих ділянках роблять мазки з матеріалу, відібраного із сечівника, шийки матки і піхви. Один препарат фарбують метиленовим синім, другий — за Грамом.

6. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними коками

Завдання 11. *Ознайомтеся з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними коками.*

Розгляньте препарати, що використовують для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених гностворними коками, визначте придатність їх до використання.

Контрольні запитання

1. На які поживні середовища проводять первинний посів на стафілокок? Які властивості культури на них вивчають?
2. З якою метою проводять профілактичне обстеження на носійство стафілокока?

3. Як проводять взяття патологічного матеріалу під час профілактичного обстеження на стафілокок?
4. Яких правил слід дотримуватись, оформлюючи направлення?
5. Як проводять транспортування патологічного матеріалу і супровідної документації до лабораторії?
6. Яких правил слід дотримуватися під час посіву патологічного матеріалу на поживні середовища?
7. Які властивості стафілококів враховують для їх виявлення?
8. Які властивості стафілококів враховують для їх диференціації?
9. Яке значення мають визначення фаговаріанта і чутливості стафілокока до антибіотиків?
10. Як проводять взяття крові при сепсисі? На які поживні середовища і в якому відношенні проводять посів?
11. Як проводять взяття матеріалу при назофарингіті? Як його досліджують?
12. Як проводять взяття спинномозкової рідини? Як її досліджують?
13. Як проводять взяття матеріалу при гонорейі? Як його досліджують?

Тести

1. Під час обстеження на стафілококове носійство матеріал відбирають із:
 - а) носа, мигдаликів;
 - б) задньої стінки глотки;
 - в) носоглотки;
 - г) носа і зів.
2. Під час обстеження на стафілококове носійство первинний посів проводять на середовища:
 - а) МПА, МПБ;
 - б) ЖСА, кров'яний агар;
 - в) сироватковий агар, МСА;
 - г) цукровий бульйон, МПА.
3. Для дослідження при менінгококовій інфекції матеріал транспортують за температури:
 - а) 37—40 °С;
 - б) 30—37 °С;
 - в) 35—45 °С;
 - г) не нижче ніж 25 °С.
4. Для діагностики гонорейі матеріал у хворих чоловіків відбирають із:
 - а) сечівника;
 - б) сечівника і прямої кишки;
 - в) сечівника, глотки, мигдаликів;
 - г) всі відповіді правильні.
5. Під час дослідження на сепсис посів крові проводять на:
 - а) кров'яний агар;
 - б) ЖСА;
 - в) цукровий бульйон;
 - г) МПБ.
6. У разі підозри на сепсис кров для виділення гемокультури відбирають:
 - а) у день, коли хворий надійшов до стаціонару;
 - б) наприкінці 1-го тижня хвороби;
 - в) через 2—3 дні після прибуття хворого у стаціонар;
 - г) на початку 2-го тижня хвороби.
7. Під час відбирання матеріалу на мікробіологічне дослідження слід дотримуватися таких умов:
 - а) відбирати до початку антимікробного лікування;
 - б) відбирати натще;
 - в) відбирати у сухий чистий посуд;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. У пацієнта відібрали матеріал для профілактичного обстеження на стафілокок. Через скільки днів він може отримати негативну відповідь, через скільки — позитивну?
2. У пологовому будинку виявлений стафілокок у новонародженої дитини, медичної сестри палати догляду за новонародженими й акушерки. Як визначити, хто є джерелом інфекції?
3. У хворого з діагнозом "назофарингіт" матеріал відбирають з носоглотки. Який тампон (сухий чи зволожений) слід використати і за яких умов його транспортувати до лабораторії?
4. Під час дослідження на менінгокок слиз із носоглотки засівають на сироватковий агар з лінкоміцином. З якою метою в поживне середовище додають антибіотик?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 9.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 9

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 218—250; практикум, с. 105—113).

Практичне заняття 9

У ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ КИШКОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Мета заняття:

- знати особливості взяття патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування до бактеріологічної лабораторії;
- навчитися проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження;
- навчитися оформляти супровідну документацію;
- навчитися проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища;
- знати препарати для специфічного лікування та профілактики хвороб, спричинених кишковими бактеріями.

Оснащення: поживні середовища виготовлені та з ростом культури ешерихій і сальмонел, поживні середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар, Ресселя, Гісса, МПБ з інді-каторними папірцями, фантом, ректальний тампон, ізотонічний розчин натрію хлориду у флаконі, бланки направлення, стерильна баночка з дерев'яною паличкою (для демонстрації), стерильні баночки з розведеними фекаліями у відношенні 1:10, бактеріологічні петлі, шпатель для посіву, пінцети, маркер, сірники, спиртівки, вакцини, лікувальні препарати.

План

1. Взяття фекалій для дослідження, оформлення направлення.
2. Посів калу на середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар.
3. Вивчення росту ешерихій, сальмонел, шигел на середовищах Ендо, Плоскирева, Ресселя, Гісса, вісмут-сульфіт агарі.
4. Ознайомлення з методикою проведення серологічного методу діагностики.
5. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених кишковими бактеріями.

Хід заняття

1. Взяття фекалій для дослідження, оформлення направлення

Завдання 1. *Ознайомтеся з методами взяття фекалій на бактеріологічне дослідження.*

Оскільки ентеробактерії (ешерихії, шигели, сальмонели) уражують переважно кишечник, на аналіз найчастіше відбирають фекалії. Відбір проводять двома способами: фекалії відбирають із суден, горшків чи лотків у стерильну баночку або забирають ректальним тампоном.

Оптимальний для виділення культури ентеробактерій відбір фекалій слід провести одразу після дефекації. Посуд, у який збирають фекалії від хворого, дезінфікують освітленим розчином хлорного вапна, потім багаторазово промивають гарячою водою до повного видалення слідів дезінфектанту. Фекалії відбирають із посуду (у немовлят — із пелюшок) стерильною дерев'яною паличкою у кількості 3—5 г із останніх порцій (більшість ентеробактерій уражує тонку кишку) і вміщують у стерильну баночку. Якщо у фекаліях є домішки, то їх обов'язково включають у пробу: гній, слиз, пластівці (але не кров!). У разі неможливості отримати фекалії після дефекації матеріал відбирають безпосередньо із прямої кишки ректальним тампоном.

Завдання 2. *Проведіть (на фантомі) відбір фекалій ректальним (від лат. *rectum* — пряма кишка) тампоном.*

Алгоритм *"Взяття фекалій ректальним тампоном"*:

- надягніть гумові рукавички;
- покладіть фантом на лівий бік (пацієнту пропонують лягти на лівий бік і зігнути ноги в колінах);
- візьміть ректальний тампон (без пробірки) у праву руку;
- візьміть у ліву руку флакон зі стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду, зніміть з нього пробку мізинцем правої руки;
- опустіть ректальний тампон у флакон з ізотонічним розчином натрію хлориду;
- видаліть ректальний тампон з флакона, віджимаючи його об стінки флакона;
- закрийте флакон пробкою (тампон тримайте правою рукою);

Увага! Не можна відбирати матеріал сухим тампоном. Не можна вводити тампон силою. За наявності набряку слизової оболонки прямої кишки і виразок це призведе до додаткового травмування і спричинить біль у пацієнта.

- розведіть сідниці пацієнта великим і вказівним пальцями лівої руки;
- уведіть тампон у пряму кишку на 3—5 см у напрямку пупка, поверніть його паралельно до хребта і введіть ще на 5—7 см;

Увага! У дорослих тампон вводять на глибину 8—10 см, у дітей — на 3—5 см.

- видаліть тампон із прямої кишки, опустіть його у стерильну пробірку (з якої був взятий), підпишіть на пробірці номер аналізу;
- поставте тампон у штатив, вимийте руки;
- заповніть направлення.

2. Посів калу на поживні середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар

Завдання 3. *Проведіть лосів фекалій на середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар.*

Фекалії, відібрані у стерильні баночки, мають бути посіяні не пізніше 2 год від моменту взяття.

Доставлені фекалії розводять ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:5 або 1:10 і дають відстоятися протягом 30—60 хв. Грубі часточки фекалій осідають на дно. Енте-робактерії як факультативні аероби скупчуються на поверхні, тому під час посіву матеріал відбирають з баночки бактеріологічною петлею або піпеткою з поверхні і наносять 1—2 краплі на поверхню поживного середовища. Поверхня пластинчастих середовищ повинна бути підсушеною, на ній не має бути крапель конденсаційної води.

Посів проводять петлею або шпателем.

Методику посіву на пластинчасте середовище петлею див. у практичному занятті 3, завдання 2; методику посіву шпателем див. у практичному занятті 3, завдання 7.

Чашки з посівами ставлять у термостат за температури 37 °С.

3. Вивчення росту ешерихій, сальмонел, шигел на середовищах Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агарі,
Ресселя, Гісса

Завдання 4. *Опишіть культуральні властивості ентеро-бактерій на середовищах Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агарі, Ресселя, Гісса, (алгоритм див. у практичному занятті 3, завданнях 9, 10, 11).*

Порівняйте стерильне середовище Ресселя із посівом культури ентеробактерій, зробіть висновок, орієнтовно до якого роду можна віднести культуру: ешерихій, сальмонел чи шигел.

Оскільки ешерихії ферментують лактозу і глюкозу, у середовищі змінюється колір індикатора в косячку і в стовпчику. Сальмонели і шигели ферментують тільки глюкозу, тому колір індикатора змінюється тільки в стовпчику. Наявність газу визначають за наявністю кульок газу або розриву середовища.

Невелика кількість ознак, що виявляються у культури ентеробактерій на середовищі Ресселя, не дає змоги достовірно визначити її родову приналежність, тому з метою диференціації родів використовують середовища Гісса і МБП.

Порівнюючи контрольні й дослідні ряди середовищ Гісса і враховуючи колір індикаторних папірців, роблять висновок про сахаролітичні і протеолітичні властивості ентеробактерій. На середовищах Гісса визначають також рухливість мікроорганізмів. Якщо культура росте вздовж уколу, а середовище залишається прозорим, мікроби нерухливі, якщо культура росте по всьому об'єму середовища, то мікроби рухливі.

Найточніше визначають рід виділеної культури за антигенною структурою в РА на склі з імунними сироватками.

4. Ознайомлення з методикою проведення серологічного методу діагностики

Завдання 5. *Ознайомтеся з проведенням серологічного методу діагностики при захворюваннях сальмонельозної етіології.*

Для серологічної діагностики черевного тифу, паратифів А і В та інших сальмонельозів використовують реакцію Відаля.

Антитіла у хворих на черевний тиф і паратифи А і В з'являються у крові уже на 4-у добу хвороби, і їх кількість різко збільшується на 8—10-у добу.

Оскільки клінічно черевний тиф і паратифи А і В дуже схожі, серологічні реакції, в тому числі і реакцію Відаля, ставлять одночасно з діагностикумами *S. typhi* (O- і H-) і *S. paratyphi* А і В (OH-). Збудником хвороби вважають той мікроорганізм, діа-гностикум з якого дає позитивну реакцію аглютинації з сироваткою крові хворого. Збудники черевного тифу і паратифів А і В мають спільні групові антигени, тому їх діагностикуми здатні давати групову РА. Позитивним вважається результат у тому ряду пробірок, де аглютинація відбувається у більшому розведенні сироватки.

Щоб відрізнити РА у хворого від щеплювальної або анамнестичної, реакцію Відаля ставлять повторно через 5—7 діб. У хворого титр антитіл зростає, а у щепленого або перехворілого не змінюється. Не змінюється також і результат групової реакції (табл. 5).

У період реконвалесценції титр антитіл зменшується, що також є діагностичною ознакою.

При інших сальмонельозах реакція Відаля може бути використана для ретроспективної (від лат. *retro* — назад) діагностики, тобто діагностики після одужання. Однак необхідно враховувати індивідуальні відхилення від нормального циклу імуногенезу. В ослабленому організмі зі зниженою реактивністю, а також у дітей 1-го року життя антитіла накопичуються повільно.

Після проведення обліку РА може бути 2 варіанти відповіді: 1) негативна РА — реакція з діагностикомом... негативна; 2) позитивна РА — реакція з

Таблиця 5. Можливий результат реакції аглютинації

Діагностикуми із сальмонел	Первинне дослідження				Повторне дослідження			
	Розведення сироватки хворого							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
Тиф –О	+	+	–	–	+	+	+	+
Тиф –Н	+	–	–	–	+	+	–	–
Паратиф А –ОН	+	–	–	–	+	–	–	–

діагностикомом... позитивна до титру...

Крім О- і Н-антигену *S. typhi* містять Vi-антиген. Оскільки ці форми *S. typhi* більш стійкі до захисних механізмів макроорганізму, вони здатні спричинити хронічне бактеріоносійство. При цьому у крові носія накопичуються Vi-антитіла. Отже, виявлення Vi-антитіл у крові є прямим доказом носійства збудників черевного тифу. Для виявлення Vi-антитіл найбільш чутливою є реакція Vi-гемаглютинації.

Для встановлення більш обґрунтованого діагнозу проводять визначення антитіл, що належать до певного класу імуноглобулінів — IgM і IgG. Анамнестичні і щеплювальні належать в основному до класу IgM.

У разі вираженого гострого і особливо хронічного бактеріо-носійства зростає титр IgG.

5. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених кишковими бактеріями

Завдання 6. *Ознайомтеся з інструкціями щодо застосування препаратів для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених кишковими бактеріями, визначте їх придатність до використання.*

Контрольні запитання

1. Які поживні середовища використовують для первинного посіву матеріалу з метою виділення ентеробактерій?
2. Які існують методи відбору фекалій при хворобах, спричинених ентеробактеріями?
3. Як проводять відбір матеріалу після дефекації? Як його готують до посіву?
4. Як проводять відбір матеріалу ректальним тампоном?
5. Як проводять первинний посів відібраного матеріалу?
6. За якими ознаками проводять первинну ідентифікацію ентеробактерій?
7. Які середовища використовують для вивчення ферментативної активності ентеробактерій?
8. Які визначення слід провести для остаточної ідентифікації культури?
9. Які серологічні реакції використовують для діагностики сальмонельозу? Як відрізнити реакцію аглютинації у хворого від щеплювальної або анамнестичної?
10. Яку серологічну реакцію використовують для виявлення хронічних носіїв інфекції?

Тести

Ешерихії, що спричинюють дезинтерієподібну форму хвороби:

- а) ЕПЕК;
- б) ЕІЕК;
- в) ЕТЕК;
- г) ЕГЕК.

Патогенні ешерихії здатні спричинити інфекції:

- а) тільки ендогенні;
- б) тільки екзогенні;
- в) ендогенні й екзогенні.

Колієнтерити у дітей раннього віку спричинюють:

- а) ЕПЕК;
- б) ЕІЕК;
- в) ЕТЕК;
- г) ЕГЕК.

Товсту кишку уражають:

- а) ЕПЕК;
- б) сальмонели;
- в) ЕТЕК;
- г) шигели.

На бактеріологічне дослідження відбирають:

- а) кал, гній і слиз;
- б) кал, кров і слиз;
- в) кал, гній і кров;
- г) кал без домішок.

Середовища для виділення ентеробактерій під час первинного посіву:

- а) ЖСА і кров'яний агар;
- б) Ендо і Плоскирева;
 - в) Плоскирева і сироватковий агар;
 - г) Сабуро і тіогліколеве.

7. Для серологічної діагностики черевного тифу використовують реакції:

- а) Вассермана;
 - б) Вейля—Фелікса;
 - в) Відаля;
 - г) Райта.
8. Для виявлення хронічних носіїв збудників черевного тифу найефективнішими є:
- а) виявлення збудника у випорожненнях;
 - б) виявлення О- і Уі-антитілу у сироватці крові;
 - в) виявлення збудника у крові;
 - г) виявлення О- і Н-антитілу у сироватці крові.
9. Для профілактики внутрішньолікарняних інфекцій, спричинених ентеробактеріями, використовують:
- а) піобактеріофаг;
 - б) колі-протейний фаг;
 - в) еубютики;
 - г) антибіотики.

Ситуаційні задачі

1. Після посіву випорожнень на середовища Ендо і Плоскирева вирости яскраво забарвлені і безбарвні колонії. Які колонії дають підставу запідозрити наявність патогенних ентеро-бактерій у досліджуваному матеріалі?

2. Випорожнення хворого на дизентерію залили 3 % розчином хлораміну і витримали 3 год. Чи достатньо цього для знезараження матеріалу?

3. Хвороба проявляється нудотою, блюванням, частими випорожненнями, які спочатку виділяються у великій кількості, можуть мати вигляд м'ясних помиїв або мутного слизу і крові — "ректальний плювок". Які мікроорганізми могли спричинити такі клінічні ознаки? Як підтвердити діагноз?

4. Для діагностики черевного тифу поставили реакцію аглютинації з черевнотифозним О- і Н-діагностиком. Титр сироватки з О-діагностиком—

1:50, з Н-діагностикумом — 1:200. Який висновок можна зрбити, виходячи з цих результатів?

5. Проводячи облік реакції Відала, виявили, що О-антитіла виявляються у титрі 1:800, Н-антитіла — 1:200. Про який період хвороби це свідчить?

6. Під час профілактичного обстеження на черевний тиф у сироватці крові виявили О-, Н- і Уі-антитіла. Про що свідчать результати цього дослідження?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 10.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 10

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 251— 277; практикум, с. 114—122).

Практичне заняття 10

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ ЗБУДНИКАМИ ОСОБЛИВО НЕБЕЗПЕЧНИХ ІНФЕКЦІЙ

Мета заняття:

- знати особливості забору патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування до бактеріологічної лабораторії;
- уміти проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження;
- уміти оформляти супровідну документацію;
- уміти проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища;
- знати препарати для специфічного лікування та профілактики особливо небезпечних інфекцій.

Оснащення: мікроскопи, системи індикаторні паперові для ідентифікації вібріонів, мікропрепарати промислового виробництва, імерсійне масло, протичумний костюм, препарати для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій.

План

1. Ознайомлення з особливостями взяття матеріалу від хворого або підозрілого на особливо небезпечну інфекцію для бактеріологічного дослідження та його транспортування.
2. Ознайомлення з типами протичумних костюмів, правилами їх використання.
3. Вивчення морфологічних і тинкторіальних властивостей збудників особливо небезпечних інфекцій.
4. Ознайомлення з методами діагностики особливо небезпечних інфекцій.
5. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Хід заняття

1. Ознайомлення з особливостями взяття матеріалу від хворого або підозрілого на особливо небезпечну інфекцію для бактеріологічного дослідження та його транспортування

** Завдання 1. Ознайомтеся з правилами взяття матеріалу від хворого або підозрілого на особливо небезпечну інфекцію для бактеріологічного дослідження.*

Для забезпечення постійної готовності лікувальних закладів до роботи в умовах епідемічних спалахів існують спеціальні укладки для взяття патологічного матеріалу від хворих з підозрою на особливо небезпечну інфекцію і укладки спеціального захисного одягу. В укладку для відбору матеріалу поміщають посуд і інструменти для взяття матеріалу, інструкцію, відповідно до якої слід проводити взяття, направлення, дезінфекційні засоби. Як спеціальний одяг використовують протичумний костюм I типу. Усі медичні заклади повинні мати запас засобів особистої екстреної профілактики та схеми їх використання. У період епідемічного благополуччя вони постійно зберігаються у відділеннях лікарень і бактеріологічних лабораторіях. Існує декілька різних укладок для взяття патологічного матеріалу від хворого або підозрілого на хворобу, а також від трупа і для взяття патологічного матеріалу із об'єктів навколишнього середовища. Посуд та інструментарій складають в окремий бікс або ящик. Стерилізація елементів укладки проводиться один раз на 3 міс. Дезінфекційні засоби зберігають у спеціальному біксі, вони періодично підлягають заміні.

Матеріал від хворого або підозрілого на захворювання відбирають негайно після виявлення хвороби, обов'язково до початку антибіотикотерапії.

Після взяття патологічного матеріалу для дослідження на посуд із матеріалом наклеюють лейкопластир, на якому простим олівцем ставлять номер, пишуть назву матеріалу. В направленні зазначають також номер, прізвище, ім'я та по батькові хворого, місце роботи або навчання, професію, дату захворювання, дату і час взяття матеріалу. Направлення підписує особа, що забирила матеріал. Матеріал пакують в окремий бікс або в ящик з перегородками, опечатують, на кришці зазначають "верх", "обережно", направлення вміщують у поліетиленовий пакет і відправляють у лабораторію з посиленням на спеціальному транспорті.

Дослідження проводять у спеціалізованих лабораторіях, що мають дозвіл Центральної режимної комісії МОЗ України на роботу з матеріалом, зараженим або підозрілим на зараження мікроорганізмами I—II груп патогенності.

2. Ознайомлення з типами протичумних костюмів, правилами їх використання

Завдання 2. *Ознайомтеся з типами протичумних костюмів, правилами їх використання.*

Захисний протичумний костюм призначений для захисту від зараження збудниками інфекційних захворювань I—II груп небезпеки при всіх основних механізмах передачі: через укуси кровосисними комахами, повітряно-краплинним шляхом і під час безпосереднього контакту із зараженим матеріалом.

До складу захисного костюма (мал. 7) входять: комбінезон або піжама, шкарпетки, капці, медична шапочка або косинка, гумові рукавички, гумові або кирзові чоботи чи глибокі калози, ватно-марлева маска (протипилловий респіратор) або фільтруючий чи киснево-ізолюючий протигаз, захисні окуляри типу "пілотні", рушник. За потреби костюм доповнюють прогумованим або поліетиленовим фартухом і такими самими нарукавниками.

Комбінезон шиють із щільної тканини (бязі або полотна); спереду роблять глуху застібку на гудзиках, на кінцях штанин і рукавів — зав'язки.

Халат шиють також із бязі або полотна за типом хірургічного але значно довший — до нижньої третини гомілки; поли мають глибоко заходити одна за одну; поясок складається з

2 частин, які окремо пришиті до кожної поли; довжина поясу повинна бути такою, щоб його можна було зав'язати петлею. Біля високого комірця пришивають зав'язки за тим самим типом, що і поясок. До рукавів пришивають одну довгу зав'язку.

Капюшон шиють з тієї самої тканини, він має повністю закривати лоб, щоби, шую і підборіддя.

Косинка повинна мати розміри 90x90x125 см.

Ватно-марлеву маску виготовляють із марлі завдовжки 125 см і завширшки 50 см. Посередині кладуть шар вати завдовжки 25 см, завширшки 17 см, завтовшки 1,5—2 см (20 г). Краї марлі загинають і під верхній її край кладуть 3 шматочки вати. Довгі кінці марлі розрізають вздовж, не доходячи до ватного шару (довжина розрізу 50 см). Після цього маску складають, загортають у папір, у якому потім стерилізують.

Окуляри використовують "пілот-ні", з вигнутими скельцями і широкими краями, які щільно прилягають до обличчя. Окуляри можуть мати іншу конструкцію, яка забезпечує їх герметичність. Для одноразового використання замість окулярів можна використовувати прозорий целофан.

Гумові рукавички беруть хірургічні або анатомічні.

Залежно від характеру роботи використовують різні типи захисних костюмів:

костюм

- I тип: комбінезон, велика косинка (капюшон), протичумний халат (зав'язка позаду), ватно-марлева маска (респіратор, протигаз), окуляри, гумові рукавички, рушник, шкарпетки, капці, чоботи (гумові або кирзові), фартух, нарукавники і друга пара рукавичок;

II тип: все перераховане, але без окулярів; I і II тип костюма надягають для роботи в заразному блоці або в осередку інфекції;

III тип: замість комбінезону — піжама, замість чобіт — калоші, немає окулярів і ватно-марлевої маски;

IV тип: піжама, шапочка, хірургічний халат, шкарпетки, капці; його використовують у бактеріологічній лабораторії.

Надягаючи костюм, слід чітко дотримуватися певної послідовності: комбінезон (чи піжама), шкарпетки, тапці, капюшон (чи велика косинка), халат, чоботи. Зав'язки біля комірця халата, а також поясок зав'язують спереду на лівому боці обов'язково петлею, після чого закріплюють зав'язки на рукавах. Респіратор (чи маску) надягають на обличчя так, щоб були закриті рот і ніс, тому верхній край маски має розміщуватися на рівні нижньої частини орбіт, а нижній — під підборіддям. Верхні зав'язки маски зав'язують петлею на потилиці, а нижні — на тім'ї (за типом працювальної пов'язки). Після надягання респілятора (чи маски) по боках носа закладають ватні тампони для того, щоб повітря не проходило поза маскою.

Окуляри перевіряють на герметичність і міцність скелець, натирають спеціальним олівцем або сухим милом, щоб не пітніли. У місцях можливого проникнення повітря закладають ватні тампони.

Гумові рукавички перед надяганням перевіряють на цілість.

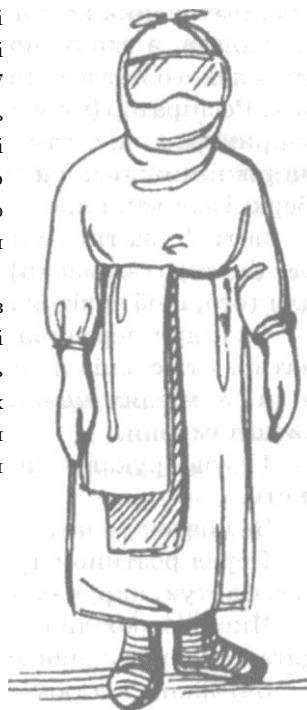
За поясок халата з правого боку закладають рушник.

Перед розтином трупу людей чи тварин додатково надягають фартух, нарукавники, другу пару гумових рукавичок.

Якщо необхідно користуватися фонендоскопом, його надягають перед капюшоном або великою косинкою.

Знімають костюм повільно, у певній послідовності. Після знімання кожної частини костюма руки в рукавичках опускають у дезінфекційний розчин.

Спочатку протирають у напрямку зверху до низу чоботи або калоші тампоном, змоченим дезінфекційним розчином; знімають рушник; протирають дезінфекційним розчином фартух, знімають його і складають внутрішньою поверхнею всередину; знімають нарукавники і другу пару рукавичок; потім знімають фонендоскоп; окуляри відтягують двома руками вперед, уверх і назад за голову; маску розв'язують і знімають, не торкаючись обличчя зовнішньою її поверхнею; розв'язують зав'язки комірця халата, поясок і, опустивши верхній



I типу

край рукавичок, розв'язують зав'язки рукавів, знімають халат, загортаючи зовнішню поверхню всередину; знімають косинку, збираючи всі її кінці в одну руку на потилиці; знімають рукавички (цілість їх перевіряють у дезінфекційному розчині, а не повітрям); знімають чоботи. Після зняття захисного костюма руки обробляють 70 % етиловим спиртом, ретельно миють туалетним милом, потім миються під душем.

Увесь захисний одяг знезаражується після одноразового використання замочуванням у дезінфекційному розчині, авто-клавуванням або кип'ятінням.

3. Визначення морфологічних і тинкторіальних властивостей збудників особливо небезпечних інфекцій у мікропрепаратах

Завдання 3. *Визначте морфологічні і тинкторіальні властивості збудників особливо небезпечних інфекцій у мікропрепаратах або на таблиці.*

Увага! Розгляньте під мікроскопом препарати, що містять збудника чуми, туляремії, холери, бруцельозу, сибірки, або таблиці. Зверніть увагу на форму бактеріальних клітин, їх відносний розмір (великі, дрібні, товсті, тонкі), наявність спори і капсули, взаємне розміщення клітин, забарвлення.

. 4. Ознайомлення з методами діагностики особливо небезпечних інфекцій

Завдання 4. *Ознайомтеся з методами діагностики особливо небезпечних інфекцій, (див. підручник, тема 11).*

Останнім часом для прискореної ідентифікації збудників інфекційних хвороб (у тому числі збудників холери) використовують системи індикаторні паперові (СПП).

Системи індикаторні паперові для ідентифікації вібріонів — це диски або паперові стрічки, просякнуті відповідними реактивами. Вони призначені для диференціації бактерій роду *Vibrio* від схожих з ними бактерій, а також для визначення ферментативних груп вібріонів за Хейбергом, у тому числі для експрес-діагностики холери. Їх випускають у вигляді набору, який дає змогу визначити 13 біохімічних ознак: ферментацію глюкози, лактози, сахарози, маннози, арабінози, маніту, інозиту, лізину, орнітину, аргініну, наявність ферментів оксидази, уреази і здатність утворювати індол.

Системи індикаторні паперові можна використовувати у комплексі з експрес-методами, коли досліджується 1 колонія або чиста культура. У пробірки з 1 % пептонною водою і протихолерною сироваткою додають культуру і опускають диски. Через 3—5 год інкубації за 37 °С одночасно враховують реакцію аглютинації та ферментативну активність.

В іншому випадку, під час постановки проби з холерними діагностичними фагами по колу цієї чашки на місця, вільні від фага, кладуть диски з вуглеводами. Результат враховують через 5 год інкубації.



5. Ознайомлення з препаратами для специфічної профілактики і лікування особливо небезпечних інфекцій

Завдання 5. *Ознайомтеся з препаратами для специфічної профілактики і лікування особливо небезпечних інфекцій, визначте принципи та придатність їх до використання.*

Контрольні запитання

1. Як забезпечується постійна готовність лікувальних закладів в умовах виникнення хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій?
2. Як відбирають матеріал у хворого або підозрілого на особливо небезпечну інфекцію? Як його оформляють і доставляють в лабораторію?
3. Які існують типи захисних протичумних костюмів? Яких правил слід дотримуватися під час надягання і знімання протичумного костюма?
4. Яка особливість морфологічних і тинкторіальних властивостей збудників особливо небезпечних інфекцій?
5. Які методи використовують для лабораторної діагностики холери, чуми, туляремії, бруцельозу, сибірки?
6. У чому перевага використання систем індикаторних паперових?
7. Які препарати використовують для профілактики і лікування хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій?

Тести

1. Середовищем накопичення для *V. cholerae* є:
 - а) 1 % пептонна вода;
 - б) МПБ;
 - в) МПА;
 - г) лужний агар.
2. Експрес-діагностику особливо небезпечних інфекцій проводять методом:
 - а) алергійним;
 - б) біологічним;
 - в) серологічним;
 - г) люмінесцентно-серологічним.
3. Реакцію Хеддльсона ставлять для діагностики:
 - а) чуми;
 - б) туляремії;
 - в) бруцельозу;
 - г) сибірки.
4. Для виявлення антигену збудника сибірки в старих шкурах використовують реакцію:
 - а) Райта;
 - б) Асколі;
 - в) Бюрне;
 - г) Хеддльсона.
5. Збудником чуми є:
 - а) *Y. enterocolitica*;
 - б) *Y. pestis*;
 - в) *Y. pseudotuberculosis*.
6. Основним фактором патогенності збудника сибірки є:
 - а) капсула;
 - б) фактор набряку;
 - в) фактор протективного антигену;
 - г) летальний фактор.
7. Синантропні гризуни можуть бути резервуаром і джерелом збудників:
 - а) *Y. enterocolitica*;
 - б) *Y. pseudotuberculosis*;
 - в) *F. tularensis*;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. Під час мікроскопії рідини зі струпа виявлено великі грампозитивні стрептобацили, оточені капсулою. До якого виду орієнтовно можна віднести ці мікроорганізми? Які дослідження слід провести для уточнення видової приналежності цієї культури?
2. Під час мікроскопії краплі випорожнень було виявлено тоненькі, ледь зігнуті грамнегативні палички. До якого роду орієнтовно можна віднести ці

мікроорганізми? Які дослідження слід провести для уточнення родової приналежності цієї культури?

3. У гуртожитку виявили хворого на холеру. Які препарати слід використати для проведення екстреної профілактики холери у контактних?

4. Із сироваткою крові хворого на туляремію поставили реакцію аглютинації з туляремійним діагностиком. Титр сироватки виявився 1:100. Чи можна на основі цих результатів підтвердити діагноз?

5. Для масового обстеження населення на бруцельоз використовують алергійний метод діагностики. Який препарат при цьому використовують? Як його вводять? Як враховують результат?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 11.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 11

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 278—303; практикум, с. 123—136).

Практичне заняття 11

^ ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ ЗБУДНИКАМИ ПОВІТРЯНО-КРАПЛИНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ

у Мета заняття:

- уміти проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження;
- уміти оформляти супровідну документацію;
- уміти проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища;
- знати препарати для специфічного лікування та профілактики.

Оснащення: тампони для зівя і носа на алюмінієвому дроті, шпатель для зівя, середовища виготовлені стерильні та з ростом відповідної культури: КА, кров'яно-телуриновий агар (КТА); казеїново-вугільний агар (КВА), середовище Борде—Жангу з додаванням антибіотиків, мікроскопи світловий і бінокулярний стереоскопічний, імерсійне масло, баночка для збирання мокротиння, спиртівка, сірники, маркер, пінцет, шпатель для посіву, мікропрепарати промислового виготовлення, препарати для специфічної профілактики (АКДП, БЦЖ), протидифтерійна сироватка і лікувальні препарати, календар профілактичних щеплень.

План

1. Взяття матеріалу у разі обстеження на дифтерію, заповнення направлення, підготовка до транспортування, проведення первинного посіву патологічного матеріалу.
2. Вивчення культуральних властивостей коринебактерій, визначення морфологічних і тинкторіальних властивостей коринебактерій у мікропрепаратах.
3. Взяття патологічного матеріалу для дослідження за підозри на коклюш, проведення первинного посіву на середовища КВА і Борде—Жангу.
4. Вивчення **культуральних**, морфологічних і тинкторіальних властивостей бордетел у мікропрепаратах.

5. Ознайомлення з методами відбору патологічного матеріалу для мікробіологічного дослідження за підозри на туберкульоз, умовами його транспортування.
6. Вивчення морфологічних і тинкторіальних властивостей мікобактерій туберкульозу у мікропрепаратах.
7. Ознайомлення з препаратами для профілактики і лікування повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій.

/

Хід заняття

1. Взяття матеріалу у разі обстеження на дифтерію, заповнення направлення, підготовка до транспортування, проведення первинного **посіву** патологічного матеріалу

Для взяття матеріалу використовують сухі і зволожені тампони. Зволожені тампони застосовують у разі транспортування матеріалу на великі відстані.

Оскільки при первинній дифтерії патологічний процес локалізується у ротоглотці і носі, то за будь-якої локалізації патологічного процесу обов'язково відбирають матеріал із ротоглотки і носа, а при дифтерії незвичайної локалізації (здебільшого вторинна дифтерія) відбирають додатково матеріал із місця ураження: ока, вуха, шкіри, піхви, рани.

Із ротоглотки матеріал беруть натще або не раніше ніж через 2 год після споживання їжі. Під час ларингоскопії матеріал забирають із гортані. У разі оперативного втручання відбирають плівки, а також слиз із інтубаційної трубки. У разі взяття матеріалу з ураженої ділянки шкіри її спочатку протирають "промокальними" рухами стерильною марлевою серветкою, змоченою стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду, потім обережно піднімають або відгортають край плівки і відбирають матеріал сухим тампоном на межі здорової й ураженої ділянок. В усіх випадках матеріал відбирають до початку антибіотикотерапії або не раніше ніж через 3 доби після відміни лікування, щоб уникнути бактеріостатичної дії антибактеріальних препаратів на збудника.

Після смерті хворого відбирають матеріал з мигдаликів, гортані і носа.

Завдання 1. **Візьміть патологічний матеріал у разі обстеження на дифтерію.**

Алгоритм **"Взяття патологічного матеріалу у разі обстеження на дифтерію"**:

- поставте у штатив 2 пробірки з сухими стерильними тампонами, на яких зазначена дата їх стерилізації;
- зазначте на пробірці одного тампона номер аналізу і літеру "З" (зів), на пробірці іншого тампона — номер аналізу і літеру "Н" (ніс);
- запропонуйте пацієнту сісти проти джерела світла і широко відкрити рот;
- притисніть шпательом корінь язика;
- огляньте уважно порожнину рота, зверніть увагу на наявність чи відсутність плівок, нальотів на мигдаликах, язичку, дужках піднебіння;
- візьміть тампоном із пробірки "З" матеріал **обертальними рухами (у разі відсутності ураження)** з мигдаликів, дужок піднебіння, язичка і задньої стінки глотки;
- візьміть тампоном із пробірки "Н" матеріал **(за наявності плівок, нальотів)** на межі ураженої і здорової тканини, злегка натискаючи тампоном на плівку чи наліт;

Увага! Не можна торкатися тампоном язика, слизової оболонки щік та зубів!

- опустіть тампон у пробірку "З";
- уведіть тампон із пробірки "Н" в один носовий хід до упору і зробіть напівобертальний рух тампоном, натискаючи на внутрішню поверхню крила носового ходу, потім уведіть цей самий тампон в інший носовий хід і проведіть взяття матеріалу таким самим способом;

Увага! Не можна торкатися тампоном до зовнішньої поверхні крил носа!

— опустіть тампон у пробірку "Н".

Завдання 2. Заповніть направлення, підготуйте матеріал до транспортування.

У направленні обов'язково зазначають дату і час відбору матеріалу, прізвище лікаря і номер телефону, за яким можна сповістити попередній результат дослідження; у пункті "на які інфекції провести дослідження" зазначають "на дифтерію" або на БЛ чи ВБ (бактерія Леффлера).

Пробірки від однієї особи скріплюють разом гумовим кільцем і складають у бікс, дно і стінки якого застелені бавовняною серветкою. Кінцями цієї серветки накривають пробірки, закривають бікс.

Направлення вміщують у поліетиленовий пакет або папку і доставляють окремо від пробірок з тампонами.

Не допускається поміщати направлення у бікс з патологічним матеріалом!

Тампони мають бути доставлені до лабораторії не пізніше 3 год після взяття матеріалу.

Якщо посів матеріалу проводять біля ліжка хворого, чашки Петрі з посівами доставляють до лабораторії негайно або ставлять у термостат за 37 °С і доставляють до лабораторії не пізніше ніж через 20—23 год. В осінньо-зимовий період на дно бікса або сумки, в яких транспортують чашки чи тампони, кладуть грілку з водою, нагрітою до 40 °С.

На чашках Петрі крім усіх необхідних позначень (назва середовища, номер аналізу, дата посіву, назва посіяного матеріалу) має бути зазначена дата виготовлення середовища.

Проведення первинного посіву патологічного матеріалу

Посів патологічного матеріалу із ротоглотки і носа від однієї особи роблять на одну чашку, засіваючи одним тампоном на половині середовища. За наявності патологічного матеріалу, взятого з місця іншої локалізації, роблять посів на додаткову чашку.

Не допускається посів патологічного матеріалу від декількох осіб на одну чашку!

Первинний посів роблять на зігрітій поживній середовища.

Завдання 3. Проведіть первинний посів патологічного матеріалу на поживні середовища КА і КТА.

Алгоритм "Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на поживні середовища КА і КТА":

- підпишіть чашки: на кришці чашки зазначте назву середовища і дату його виготовлення; дно чашки поділіть на дві рівні частини, зазначте номер аналізу, назву патологічного матеріалу, дату посіву, на одній половині чашки поставте літеру "З", на іншій — літеру "Н";
- зробіть втирання патологічного матеріалу тампоном "З", повертаючи його навколо своєї осі на окрему ділянку КА площею 2x1 см, потім аналогічно на КТА;
- зробіть цим самим тампоном посів штрихами на решту поверхні середовища, не доходячи до лінії поділу чашки;

Увага! Під час посіву не можна переходити лінію поділу чашки, щоб не змішувалися посіви з різних тампонів!

- зробіть аналогічно посів тампоном "Н" на другу половину середовища КА і КТА;
- поставте чашки з посівами у термостат.

2. Вивчення культуральних властивостей коринебактерій, визначення морфологічних і тинкторіальних властивостей коринебактерій у мікропрепаратах

Завдання 4. *Опишіть культуральні властивості коринебактерій на середовищі КТА, вивчіть морфологічні і тинк-торіальні властивості коринебактерій у препараті.*

Колонії, що виростили на чашках з середовищами КА і КТА, розглядають через 24 год після посіву матеріалу (якщо посів було проведено у другій половині дня, то і препарат розглядають у другій половині наступного дня) за допомогою стереоскопічного біокулярного мікроскопа. Через 24 год утворюються колонії дрібні, з рівним краєм, випуклі, сірого кольору, в'язкі; через 48 год — сірі або чорні з металевим блиском, рівними або ледь хвилястими краями, в'язкі чи крихкі.

Розгляньте під мікроскопом препарат, виготовлений із культури *S. сІргітЛіегіае*. Зверніть увагу на форму бактеріальних клітин, відносний їх розмір, взаємне розташування, колір (залежно від способу фарбування), наявність зернистості.

3. Взяття патологічного матеріалу для дослідження за підозри на коклюш, проведення первинного посіву на середовища КВЛ і Борде—Жангу

З діагностичною метою обстежують дітей за клінічними ознаками або тих, які кашляють протягом 5—7 днів, без ознак запалення у ротоглотці, незалежно від наявності контакту з хворим на коклюш; дорослих з підозрою на коклюш, які працюють у пологових будинках, дитячих лікарнях, дитячих садках і ін., а також дорослих, які працюють з дітьми і кашляють протягом 5—7 днів і більше.

За епідеміологічними показаннями обстежують осіб, які спілкувалися з хворими на коклюш.

Взяття матеріалу на бактеріологічне дослідження з діагностичною метою потрібно проводити у ранній термін захворювання 2—3-разово щодня або через день. Пізніше 3-го тижня захворювання можливість виділення збудника різко знижується.

Для дослідження забирають слиз із задньої стінки глотки. При цьому треба пам'ятати про те, що у верхніх відділах носоглотки знаходяться авірулентні штами, схильні до автолізу, а вірулентні колонізують нижній відділ верхніх дихальних шляхів. Відбір матеріалу можна здійснювати двома способами: задньоглотковим тампоном і методом "кашльових пластинок". Задньоглотковим тампоном матеріал беруть як з метою діагностики, так і за епідеміологічними показаннями, а також у будь-якому випадку у дітей грудного віку. Для цього використовують два тампони: сухий і зволожений. Сухим тампоном роблять посів (обов'язово), а зволожений відправляють до лабораторії. Метод "кашльових пластинок" використовують тільки з діагностичною метою за наявності кашлю.

Завдання 5. *Проведіть взяття патологічного матеріалу для дослідження за підозри на коклюш, заповніть направлення.*

Алгоритм "Взяття патологічного матеріалу задньоглотковим тампоном, заповнення направлення":

- візьміть у ліву руку стерильну пробірку з тампоном, позначте на ній номер аналізу;
- зігніть правою рукою тампон приблизно на відстані 2 см від кінця об'єкта пробірки під кутом 120° під час виведення тампона з пробірки, тампон тримайте у правій руці;
- візьміть у ліву руку шпатель для зів'я;
- запропонуйте пацієнту широко відкрити рот;
- притримуйте корінь язика шпателем, уведіть тампон зігнутих кінцем донизу у ротоглотку до "відчуття провалу";

Увага! Під час взяття матеріалу не можна торкатися тампоном до слизової оболонки щік, язика, мигдаликів, піднебіння!

- проведіть кінцем тампона і його випуклим боком, торкаючися задньої стінки глотки, справа наліво 2—3 рази;
- вийміть тампон із рота і, розгинаючи, опустіть його у пробірку;
- заповніть направлення.

Проведення первинного посіву на середовища КВА і Борде—Жангу

Посів матеріалу з діагностичною метою проводять паралельно на дві чашки, за епідеміологічними показаннями — на одну. Посів здійснюють на середовища, оброблені антибіотиками для пригнічення сторонньої мікрофлори. Під час взяття матеріалу методом "кашльових пластинок" застосовують середовища без антибіотика, тому що супутня мікрофлора в цьому разі буде незначною. Для посіву обов'язково використовують тепле поживне середовище. У разі взяття матеріалу сухим тампоном посів проводять негайно через низьку стійкість збудника.

Однією з основних умов посіву є отримання ізольованих колоній. Для цього використовують кілька методів посіву. В одному випадку ретельно втирають матеріал тампоном, повертаючи його навколо своєї осі, по периферії середовища у чашці Петрі на 4—5 бляшок, а потім, не торкаючися до них тампоном, роблять у центрі чашки штрих у вигляді літери **Ж**. Після підсихання цей штрих ретельно розтирають шпателем, не торкаючися бляшок.

Якщо посів проводять на місці взяття, то матеріал втирають тампоном на одній половині середовища, а потім у лабораторії проводять його розштрихування бактеріологічною петлею ще на 2 сектори.

№ 5 8-218

Засіяні чашки ставлять у термостат за температури 35—37 °С. Для зволоження повітря в термостат ставлять відкриту чашку Петрі з водою. У зв'язку з тим що останнім часом відмічається уповільнений ріст *B. pertussis*, чашки з посівом витримують у термостаті до 7 діб, але проглядають їх щодоби через можливий ріст *B. parapertussis* і *B. bronchiseptica*.

Завдання 6. *Проведіть первинний посів на середовища КВА і Борде—Жангу.*

Алгоритм "Проведення первинного посіву на середовища КВА і Борде—Жангу":

- візьміть із термостату чашки Петрі з підігрітими середовищами КВА і Борде—Жангу;
- підпишіть чашки;
- зробіть посів матеріалу першим способом, зазначеним вище;
- поставте чашки з посівами у термостат;
- налийте у пусту чашку Петрі дистильовану воду;
- поставте поряд із засіяними чашками відкриту чашку Петрі з дистильованою водою.

4. Вивчення культуральних, морфологічних і тинкторіальних властивостей бордетел у мікропрепаратах

Завдання 7. *Вивчіть культуральні властивості бордетел на середовищах КВА і Борде—Жангу, морфологічні і тинкторіальні властивості у препараті.*

Колонії бордетел на щільних поживних середовищах випуклі, вологі, гладенькі, блискучі, з рівним краєм, сірого кольору з блакитним, перлинним, металевим, а іноді жовтуватим, зеленкуватим або білуватим відтінком. Промінь світла, що падає збоку на колонії, відбивається її поверхнею, внаслідок чого утворюється світловий конус ("хвостик", "промінець"), що падає від центру колонії на поверхню поживного середовища. Це можна спостерігати в стереоскопічному мікроскопі, спрямовуючи світло від лампи на поверхню середовища з ростом культури бордетел. Колонії *B. bronchiseptica* можуть бути двох типів: схожі на колонії *B. pertussis* або білі, плоскі, з піднятим центром. *B. pertussis* і *B. bronchiseptica* не змінюють кольору середовищ, *B. parapertussis* спричинює побуріння середовища КВА і потемніння середовища Борде—Жангу внаслідок розщеплення

амінокислоти тирозину. Колонії усіх трьох видів борде-тел мають маслянисту консистенцію, легко знімаються петлею, на середовищі з кров'ю утворюють зони слабого гемолізу.

Розгляньте колонії бордетел на середовищах КВА і Борде— Жангу неозбраним оком і під стереоскопічним (біокулярним) мікроскопом зі штучним освітленням. Опишіть властивості підозрілих колоній.

Під час мікроскопії зверніть увагу на відносний розмір клітин (великі чи дрібні, однорідні чи поліморфні), їх форму, взаємне розміщення, забарвлення.

5. Ознайомлення з методами відбору патологічного матеріалу для мікробіологічного дослідження за підозри на туберкульоз, умовами його транспортування

Завдання 8. Ознайомтеся з методами відбору патологічного матеріалу для мікробіологічного дослідження за підозри на туберкульоз, з умовами його транспортування.

Для виявлення збудника туберкульозу відбирають патологічний матеріал: мокротиння, промивні води бронхів, шлунка, сечу, пунктати із закритих порожнин (спинномозкову рідину, ексудати і трансудати з плевральної і черевної порожнин), гній із нориць, виділення ран, менструальну кров, виділення з відкритих порожнин.

Патологічний матеріал слід відбирати до початку лікування або після дводенної перерви у вживанні антибактеріальних препаратів. При легеневої формі туберкульозу відбирають мокротиння.

Медичний працівник повинен детально пояснити хворому правила збирання мокротиння і видати йому стерильну скляну широкогорлу банку з кришкою (пловальницю). Взяття мокротиння треба проводити у присутності медичного працівника. Для запобігання зараженню туберкульозом медичний працівник повинен бути у шапочці, масці, клейончастому фартусі, гумових рукавичках і стояти за спиною пацієнта.

Збирання мокротиння проводиться у спеціально призначеному для цієї процедури приміщенні, яке обладнане вентиляційними установками і бактерицидними лампами.

I

Мокротиння збирають у ранкові години. Якщо його виділяється мало, збирають протягом доби і зберігають у холодильнику, не допускаючи замороження. Для посилення секреції бронхіального вмісту хворому дають відхаркувальні препарати або застосовують подразнювальну аерозольну інгаляцію. Перед збиранням мокротиння хворий повинен почистити зуби без пасти, прополоскати рот, сплюнути носоглотковий слиз і слину в дезінфекційний розчин. Відкашлювати мокротиння потрібно з глибоких нижніх дихальних шляхів. Для цього хворий повинен зробити декілька глибоких вдихів, потім похаркати у пловальницю і перевірити наявність у посуді мокротиння (не менше ніж 10 см³). Відбирають 3 проби мокротиння. Першу пробу мокротиння беруть у хворого в день звернення його за медичною допомогою в присутності медичного персоналу. Потім йому дають посуд для збирання ранкового мокротиння (хворий самостійно збирає другу пробу). Останню (третю) пробу збирають у присутності медпрацівника у день доставки другої проби.

Зібране мокротиння заливають консервантом у співвідношенні 1:1 і герметично закривають кришкою.

Як консервант використовують 10 % розчин натрію фосфату, 5—10 % розчин гліцерину, 10 % розчин натрію хлориду або 2—3 % розчин борної кислоти. Розчин борної кислоти використовують в умовах спекотного клімату.

За відсутності у хворого мокротиння відбирають промивні води бронхів (маніпуляцію виконує лікар-отоларинголог).

У дітей здебільшого відбирають промивні води шлунка (діти ковтають мокротиння). Для цього останнє споживання їжі хворим має бути не пізніше 12 год до взяття матеріалу. Хворому дають випити 200 см³ дистильованої води, потім вводять шлунковий зонд і збирають вміст шлунка у стерильну склянку.

Сечу збирають у стерильний флакон. Після ретельного туалету зовнішніх статевих органів відбирають середню порцію ранкової сечі. З ниркових мисок сечу забирають катетером з кожної нирки окремо.

Спинномозкову рідину відбирають за підозри на менінгоен-цефаліт так само, як при менінгококовій інфекції.

Екsudати, трансудати з плевральної і черевної порожнин беруть стерильним шприцом у стерильний посуд.

Кров відбирають капілярну або венозну за загальноприйнятими методиками. Менструальну кров відбирають методом відсмоктування за допомогою ковпачка Кафка.

Гній із нориць, виділення ран, виділення з відкритих порожнин беруть стерильним шприцом або стерильним ватним тампоном у стерильний посуд.

На посуд із зібраним для аналізу матеріалом наклеюють етикетку, в якій зазначають прізвище хворого і адресу. Крім того, заповнюють направлення.

Посуд встановлюють у дерев'яний ящик із гніздами, спеціальний контейнер або металевий бікс і негайно доставляють до лабораторії. Направлення доставляють у поліетиленовому пакеті або папці.

6. Вивчення морфологічних і тинкторіальних властивостей мікобактерій туберкульозу у мікропрепаратах

Завдання 9. Розгляньте під мікроскопом препарати, виготовлені з микротинія і пофарбовані за Цілем—Нільсеном.

Зверніть увагу на форму клітин, їх відносний розмір, взаємне розміщення, а також на інші елементи, що виявляються у полі зору (лейкоцити, еластичні волокна, клітини миготливого епітелію, інші бактерії).

7. Ознайомлення з препаратами для профілактики і лікування повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій

Завдання 10. Ознайомтеся з препаратами для профілактики і лікування дифтерії, коклюшу і туберкульозу.

Уважно прочитайте інструкції до вакцин АКДП, БЦЖ, АДП, АД, продивіться ампули з вакцинами, прочитайте, що зазначено на етикетці, зверніть увагу на цілість ампул, фізичні властивості препарату (колір, агрегатний стан). Визначте, чи придатний препарат для використання. Визначте за календарем профілактичних щеплень терміни вакцинації і ревакцинації вакцинами АКДП, БЦЖ.

Ознайомтеся з інструкцією до протидифтерійної сироватки, принципом її використання.

Прочитайте інструкції до лікарських препаратів, зверніть увагу на їх форму випуску. Визначте придатність їх до використання.

Контрольні запитання

1. Які середовища використовують для первинного посіву матеріалу, що містить коринібактерії?
2. Який матеріал беруть на дослідження при дифтерії різної локалізації? Які тампони використовують для взяття матеріалу?
3. Як проводять взяття матеріалу з ротоглотки у разі відсутності видимих уражень і за наявності плівок і нальотів?
4. Як проводять взяття матеріалу з носа?
5. Яких правил дотримуються під час взяття матеріалу на дослідження при дифтерії незвичайних локалізацій?
6. Яких правил дотримуються під час транспортування матеріалу і направлень до лабораторії?
7. Яких правил дотримуються під час проведення первинного посіву матеріалу?

8. За якими ознаками відбирають колонії коринебактерій із середовищ первинного посіву?
9. За якими ознаками визначають коринебактерії у мікро-препараті?
10. Який матеріал і якими методами відбирають для дослідження за підозри на коклюш? За яких умов його транспортують?
11. Які середовища використовують для первинного посіву? Яким вимогам вони повинні відповідати?
12. Який матеріал відбирають на дослідження при туберкульозі?
13. Як проводять взяття мокротиння для лабораторного дослідження? Як транспортують матеріал до лабораторії?
14. Якими методами виявляють мікобактерії у патологічному матеріалі?
15. Які вакцини і в який термін використовують для проведення вакцинації та ревакцинації проти дифтерії, коклюшу, туберкульозу?
16. За яким принципом використовують протидифтерійну сироватку? За яким методом її вводять в організм?

Тести

1. Під час профілактичного обстеження на дифтерію матеріал відбирають із:
 - а) задньої стінки глотки;
 - б) носоглотки та носа;
 - в) ротоглотки та носа;
 - г) методом "кашльових пластинок".
2. Середовище для первинного посіву на дифтерію:
 - а) КТА;
 - б) КВА;
 - в) сироватковий агар;
 - г) середовище Левенштейна—Інсена.
3. Матеріал, що містить *B. pertussis*, транспортують за температури:
 - а) 4-37 °С;
 - б) 37—40 °С;
 - в) 2—25 °С;
 - г) 25—40 °С.
4. Середовище для первинного посіву на коклюш:
 - а) КТА;
 - б) КВА;
 - в) сироватковий агар;
 - г) середовище Левенштейна—Інсена.
5. Ріст колоній *B. pertussis* з'являється через:
 - а) Ідобу;
 - б) 1—2 доби;
 - в) 3-7 діб;
 - г) 3—6 міс.
6. Для профілактики туберкульозу використовують препарат:
 - а) АҚДП;
 - б) туберкулін;
 - в) БЦЖ;
 - г) ЖБВ.

Ситуаційні задачі

1. Особа була проімунізована проти дифтерії згідно з календарем щеплень за віком. Чи підлягає вона позаплановій ревакцинації в разі виникнення спалаху інфекції?
2. Під час серологічного дослідження сироватки крові дітей 1—2 років життя, хворих на коклюш, реакції часто бувають негативними. Чим пояснити такий результат?
3. Під час постановки реакції Манту діаметр папули у дитини виявився 5 мм. Під час повторної постановки цієї реакції через рік діаметр папули виявився

8 мм. Який висновок слід зробити щодо інфікованості організму збудником туберкульозу? Чи можна дитині проводити ревакцинацію проти туберкульозу?

4. У корів, хворих на туберкульоз, мікобактерії туберкульозу виділяються з молоком. Чи можна таке молоко споживати після кип'ятіння протягом 1 хв?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 12.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 12

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.

2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 304—325; практикум, с. 137—145).

Практичне заняття 12

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ ОБЛІГАТНИМИ АНАЕРОБАМИ

Мета заняття:

- уміти проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження;
- уміти оформляти супровідну документацію;
- уміти проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища;
- знати препарати для специфічної профілактики та лікування хвороб, спричинених облигатними анаеробами.

Оснащення: анаеростат, ексікатор, культура анаеробів у напіврідкому середовищі у трубках Віньяля—Вейона, на середовищах МПА, КА у чашках Петрі, на середовищах Вільсона—Блера і Кітта—Тароцці, мікропрепарати промислового виробництва, мікроскопи, імерсійне масло, препарати для специфічної профілактики і лікування.

План

1. Ознайомлення з правилами взяття матеріалу для дослідження з метою виявлення анаеробів. Оформлення супровідної документації.
2. Ознайомлення з методами культивування анаеробів.
3. Визначення клостридій і бактероїдів у мікропрепаратах.
4. Вивчення імунологічних препаратів, які використовують для профілактики і лікування захворювань, спричинених анаеробами.

Хід заняття

1. Ознайомлення з правилами взяття матеріалу для дослідження з метою виявлення анаеробів. Оформлення супровідної документації

Завдання 1. Ознайомтеся з правилами взяття матеріалу для дослідження з метою виявлення анаеробів. Оформіть супровідну документацію.

■ Мікробіологічні дослідження при всіх захворюваннях, спричинених клостридіями і бактероїдами, проводять у двох напрямках: виділення із патологічного матеріалу збудника і виявлення у патологічному матеріалі токсину. Для виявлення збудника патологічний матеріал висівають на поживні середовища, виділяють чисту культуру й ідентифікують її. Наявність токсину в патологічному матеріалі виявляють у біопробі, тип токсину визначають у реакції нейтралізації на білих мишах.

При ранових анаеробних інфекціях досліджують такий матеріал: кірочки, виділення з рани або тканина рубця, тканини, що були видалені під час хірургічного оброблення рани, сторонні тіла (кулі, колючки, обривки одягу тощо), кров хворого. У жінок, хворих на правець унаслідок пологів або абортів, на аналіз відбирають виділення з матки, у новонароджених — виділення з пупка. Грунт досліджують з метою визначення його забрудненості анаеробами та їх токсинами.

Матеріал із рани відбирають до початку оброблення її антисептиками й антибіотиками. Виділення з рани і рідину з набряку відбирають стерильним ватним тампоном або стерильною піпеткою.

Шматочки тканин беруть за можливості з глибоких ділянок рани, карманів, роздавлених тканин. Одночасно з різних ділянок рани роблять мазки, які відправляють до лабораторії разом із відібраним матеріалом.

Кров відбирають із вени стерильним шприцом у стерильну пробірку до введення антитоксичної сироватки з метою виявлення в ній токсину (слід враховувати, що токсин у крові хворого на правець виявляється тільки в продромальний період; в інкубаційний період та період розпаду інфекції токсин у крові не виявляється).

Основними правилами під час взяття і транспортування патологічного матеріалу є обережність відібраного зразка від контакту з атмосферним повітрям. Тому матеріал краще відбирати і транспортувати у шприцах, мазки — у спеціальних контейнерах. Після взяття матеріалу заповнюють направлення. Матеріал транспортують в анаеробних умовах.

2. Ознайомлення з методами культивування анаеробів

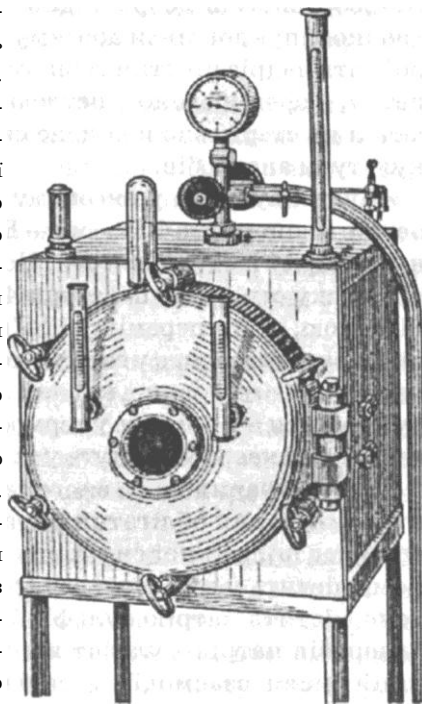
Завдання 2. Вивчіть методи культивування облигатних анаеробів.

Особливість облигатних анаеробів полягає в тому, що вони можуть існувати і розмножуватися за умов майже повної відсутності кисню (хоча серед них також є мікроорганізми, що більше і менше чутливі до кисню). Для їх культивування потрібно створити умови, за яких молекулярний кисень видаляється з поживного середовища і навколишнього простору, де перебуває культура облигатних анаеробів.

Залежно від способу видалення кисню розрізняють такі методи їх культивування: фізичні, хімічний і біологічний.

Фізичні методи ґрунтуються на механічному видаленні або запобіганні проникненню кисню в поживне середовище або в навколишній простір.

Вирощування в анаеростаті. Анаеростати бувають стаціонарні і портативні. Анаеростат — це товстостінний металевий апарат прямокутної або циліндричної форми з дверцятами або кришкою, які герметично закриваються (мал. 8). Атмосферний тиск у робочій камері апарату вимірюється вакуумметром, шкала якого розрахована від "0" (що означає нормальний атмосферний тиск — 1 атм) до (що означає повний вакуум). Видалення повітря проводять через кран, який потім щільно закривають. Посуд з посівом (частіше чашки Петрі) вміщують у робочу камеру апарата, апарат щільно закривають, повітря з камери видаляють за допомогою



Мал. 8. Анаеростат

вакуум-насоса. Культивують мікроорганізми у вакуумі або в атмосфері газу, що не

містить кисню. В останньому випадку у робочу камеру анаеростата подають азот, суміш азоту і вуглекислого газу, водень, пропан з бутаном. Стаціонарний анаеростат підключають до електромережі, а портативний ставлять у термостат. Анаероби ростуть повільно, тому анаеростат відкривають через 4—5 діб.

Метод Віньяля—Вейона. У пробірку з розплавленим і охолодженим до 43—45 °С напіврідким агаром піпеткою вносять досліджуваний матеріал і добре перемішують. Потім агаром з посівом заповнюють стерильну пастерівську піпетку, яка з одного кінця щільно закрита ватною пробкою. Піпетку заповнюють до кінця, не допускаючи попадання повітря. Нижній кінець піпетки запаюють у полум'ї спиртівки. Засіяні піпетки вміщують у велику пробірку, на дні якої накладена вата, або загортають у щільний папір і поміщають у термостат. Колонії мікроорганізмів добре видно через скло. Вони мають вигляд двояковипуклої лінзи або жмутика вати. Після культивування роблять надріз піпетки терпугом поряд з колонією, ламають піпетку, зафламованою петлею відбирають колонію і пересівають її на стерильне поживне середовище для виділення чистої культури анаеробів.

Культивування у високому стовпчику агару. Щільне середовище (наприклад, Вільсона—Блера) наливають у велику хімічну пробірку на 2/3 її висоти. Перед посівом його розплавляють і охолоджують до температури 43—45 °С. Швидко роблять посів піпеткою, добре перемішують (прокручують пробірку між долонями рук) і ставлять у банку з холодною водою, щоб не відбулося насичення середовища киснем з повітря. Після ущільнення агару пробірки поміщають у термостат для культивування мікроорганізмів. Анаероби ростуть у нижній частині середовища.

Застосування поживного середовища Вільсона—Блера для культивування облигатних анаеробів ґрунтується на тому, що воно має щільну консистенцію, наливається високим стовпчиком, містить у собі глюкозу (редуюча речовина). Крім того, воно містить натрію сульфат і заліза хлорид(II). Під впливом анаеробів натрію сульфат відновлюється до натрію сульфід, який після взаємодії із заліза хлоридом(II) утворює заліза сульфід — речовину чорного кольору. Тому анаероби у середовищі Вільсона—Блера утворюють колонії чорного кольору.

Метод Перетца. Посівний матеріал наносять бактеріологічною петлею чи пастерівською піпеткою на середовище МПА в чашку Петрі, рівномірно розсівають шпателем. На поверхню посіву кладуть зафламоване стерильне предметне скло так, щоб під склом не залишилося кульок повітря. Чашки Петрі ставлять у термостат донизу дном. Анаероби виростають під склом, поряд зі склом ростуть аероби. Враховують ті колонії, які ростуть під склом на відстані, не ближчій ніж 0,5 см від краю скла.

Під час культивування облигатних анаеробів у рідких поживних середовищах спочатку проводять їх регенерацію (кип'ятять середовища на водяній бані 20—30 хв для видалення повітря). Потім середовище різко охолоджують і роблять посів (регенеровані середовища мають бути використані протягом 20—30 хв, в іншому разі їх повторно регенерують). Після посіву середовище заливають стерильним вазеліновим маслом шаром 1—1,5 см. До таких поживних середовищ належить середовище Кітта—Тароцці. На ньому анаероби утворюють дифузний ріст, унаслідок чого воно мутніє.

Хімічний метод ґрунтується на видаленні кисню хімічними речовинами. Для поглинання кисню з навколишнього простору використовують метод Арістовського. На дно ексикатора поміщають хімічні речовини, які легко поглинають кисень із повітря (натрію гідросульфід або багатоатомний фенол — пірга-лол). У розширену частину ексикатора поміщають чашки Петрі з посівами і щільно закривають кришкою. Ексикатор ставлять в термостат.

Для поглинання кисню з поживного середовища до нього додають редукційні речовини: глюкозу, тіогліколеву кислоту, аскорбінову кислоту, натрію гідрокарбонат, натрію гідросульфід, натрію формиат тощо, а також шматочки варених паренхіматозних органів тварин (печінки, серця), для адсорбції кисню використовують кульки вати, пемзу.

Біологічний метод ґрунтується на культивуванні анаеробів і аеробів в одному середовищі. До нього належить метод Форт-нера. Поживне середовище МПА з кров'ю (агар Цейсслера) наливають у чашку Петрі. Зафламованим скальпелем вирізають по діаметру чашки вузьку смужку агару (завширшки 1—

1,5 см) і видаляють її з чашки. На одну половину середовища засівають аероби (кишкову паличку), на інші — досліджуваний матеріал. Чашку закривають і заклеюють клейкою стрічкою, лейкопластирем або пластиліном. Чашки поміщають у термостат догори дном. Аероби ростуть швидко і поглинають кисень, створюючи умови для росту анаеробів. На кров'яному агарі визначають гемолітичні властивості анаеробів.

Усі ці дослідження проводять у спеціалізованих анаеробних лабораторіях.

3. Визначення клостридій і бактеріодів у мікропрепаратах

Завдання 3. Розгляньте під мікроскопом мікропрепарати, виготовлені з культури клостридій і бактеріодів.

Зверніть увагу на відносний розмір бактерій, їх взаємне розміщення, наявність спор, її розташування в клітині, форму бактеріальної клітини із спорою (діаметр спори більший за діаметр бактеріальної клітини чи ні), наявність капсули, колір бактеріальних клітин (залежно від методу фарбування).

4. Вивчення імунологічних препаратів, які використовують для профілактики і лікування захворювань, спричинених анаеробами

Завдання 4. Вивчіть імунологічні препарати, які використовують для профілактики і лікування захворювань, спричинених анаеробами.

Розгляньте препарати: вакцини АКДП, АДП, протиправцевий, протигангренозний і протиботулінічний анатоксини, протиправцеву, протиботулінічну, протигангренозну сироватки, прочитайте інструкції, визначте придатність препаратів до використання, зверніть увагу, з якою метою використовують ці препарати.

Контрольні запитання

1. За якими напрямками проводять дослідження при анаеробних інфекціях?
2. Які особливості відбору патологічного матеріалу для виявлення анаеробів?
3. Які є способи створення анаеробних умов для культивування бактерій?
4. Які поживні середовища використовують для культивування анаеробів?
5. Яких правил слід дотримуватися під час посіву матеріалу, що містить анаеробні бактерії?
6. Який вигляд мають клостридії під мікроскопом?
7. Який матеріал відбирають і якими методами досліджують за підозри на правець?
8. Який матеріал відбирають і якими методами досліджують за підозри на ботулізм?
9. Який матеріал відбирають і якими методами досліджують за підозри на газову гангрену?
10. За якими ознаками ідентифікують культуру клостридій?
11. Який метод використовують для виявлення і визначення типу токсину?

Тести

1. Причиною нервово-м'язової патології при правці є:
 - а) руйнування нейронів;
 - б) руйнування м'язових клітин;
 - в) блокування передачі нервового імпульсу.
2. Спорогенні палички, у яких діаметр спори більший за діаметр палички:
 - а) клостридії;
 - б) бацили;
 - в) бактеріодиди;
 - г) фузобактерії.

3. Зараження тварин екстрактом з уражених тканин — це:
 - а) біопроба;
 - б) реакція нейтралізації.
4. Перший симптом правця у немовляти:
 - а) неспроможність ссати;
 - б) судоми м'язів тулуба;
 - в) судоми м'язів тулуба;
 - г) всі відповіді правильні.
5. Зараження дорослих ботулізмом відбувається під час споживання продуктів, у яких містяться:
 - а) спори збудника ботулізму;
 - б) екзотоксин збудника ботулізму.
6. Анаеробні мікроорганізми, що спричинюють харчові токсикоінфекції:
 - а) *B. fragilis*;
 - б) *C. tetani*;
 - в) *C. difficile*;
 - г) *C. perfringens*.
7. Зараження тварин екстрактом з ураженої тканини, змішаним із відповідною сироваткою:
 - а) біопроба;
 - б) реакція нейтралізації.
8. Правець виникає у разі проникнення збудника в організм:
 - а) ентерально;
 - б) інтраназально;
 - в) парентерально.
9. Вісім сероваріантів збудника ботулізму продукують:
 - а) один тип екзотоксину;
 - б) вісім типів екзотоксину.

Ситуаційні задачі

1. Під час мікроскопії мазка з мигдаликів на ангіну виявлені грамнегативні спірально звивисті мікроорганізми і грамнегативні диплобактерії із загостреними кінцями. До яких родів орієнтовно можна віднести ці мікроорганізми?

2. Для виявлення екзотоксину в крові хворого провели реакцію нейтралізації на білих мишах. Для цього до сироватки крові хворого додали суміш антиботулінічних сироваток і ввели тваринам. Після проведення досліду всі тварини загинули. Який висновок слід зробити з цього досліду?

3. Для профілактики правця проводять планову активну імунізацію населення. Який нормативний документ регламентує її проведення? Які препарати для цього використовують?

4. Правець, ботулізм — це інфекції, при яких розвивається токсинемія. Яке лікування слід проводити при цих інфекціях: серотерапію чи антибіотикотерапію? Чи серотерапію разом із антибіотикотерапією? Чому?

5. Патологічний матеріал, в якому виявлено збудника правця, простерилізували в автоклаві при 2 атм протягом 2 год. Чи достатньо цих умов для знезараження спор?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 13.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 13

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 326—341; практикум, с. 146—156).

Практичне заняття 13

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ ПАТОГЕННИМИ СПІРОХЕТАМИ

Мета заняття:

- знати особливості взяття патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування до бактеріологічної лабораторії;
- уміти відбирати патологічний матеріал для дослідження;
- уміти оформляти супровідну документацію;
- знати методи мікробіологічної діагностики хвороб, спричинених патогенними спірохетами;
- знати препарати для специфічного лікування та профілактики хвороб, спричинених патогенними спірохетами.

Оснащення: мазки-препарати (за можливості), таблиці, фотознімки клінічних проявів хвороби; мікроскоп, імерсійне масло, кардіоліпіновий антиген, препарати для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними спірохетами.

План

1. Вивчення морфологічних і тинкторіальних властивостей трепонем, борелій, лептоспір.
2. Ознайомлення з особливостями взяття патологічного матеріалу; вивчення методів мікробіологічної діагностики сифілісу; ознайомлення з методикою проведення реакції Вассермана.
3. Ознайомлення з методами мікробіологічної діагностики бореліозів.
4. Вивчення методів мікробіологічної діагностики лептоспірозу.
5. Вивчення препаратів, які використовують для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними спірохетами.

Хід заняття

1. Вивчення морфологічних і тинкторіальних властивостей трепонем, борелій, лептоспір

Завдання 1. *Вивчіть морфологічні і тинкторіальні властивості трепонем, борелій та лептоспір.*

Вивчаючи морфологію спірохет у препараті чи за таблицями, зверніть увагу на спільні риси в будові їх клітин, що дало змогу виділити ці мікроорганізми в самостійний порядок Єрі-госіаєіаєз, а також на відмінності, за якими можна відрізнити між собою трепонеми, борелії та лептоспіри.

2. Ознайомлення з особливостями взяття патологічного матеріалу; вивчення методів мікробіологічної діагностики сифілісу; ознайомлення з методикою проведення реакції Вассермана

Завдання 2. *Ознайомтеся з методикою взяття патологічного матеріалу; вивчіть методи мікробіологічної діагностики сифілісу; ознайомтеся з методикою проведення реакції Вассермана.*

Дослідження проводять до початку лікування. Відбір матеріалу проводять на тонке предметне скло (завтовшки не більше 1,2 мм). На скло наносять 1 краплю ізотонічного розчину натрію хлориду (роблять 2—3 препарати). Відбір матеріалу проводять в асептичних умовах із дотриманням техніки безпеки. Сифілітичні ураження (розеола, ерозії, виразка, папули) очищують тампоном, змоченим ізотонічним розчином натрію хлориду, потім протирають сухим тампоном. Платиною бактеріологічною петлею подразнюють досліджуване вогнище до появи тканинної рідини.

Мікроскопічний метод. Рідину відбирають бактеріологічною петлею і вносять у краплю ізотонічного розчину на предметному склі, накривають покривним склом, яке щільно притискають до предметного. Так отримують препарат "роздавлена крапля". Мікроскопію проводять негайно у темному полі (не можна затримуватися, оскільки підсихання препарату може призвести до втрати збудником сифілісу характерної рухливості).

Бліда трепонема в темному полі зору має вигляд тендітної сріблястої з рівномірними завитками спіралі з характерними видами рухливості (згинальний, поступальний, обертальний, хвилеподібний, судомний), що відрізняє її від сапрофітних трепонем (*T. dentinum*, *T. buccalis*, *T. perfringens*). За зовнішнім виглядом і типом рухливості роблять висновок про виявлення блідої трепонеми.

Серологічний метод. Для діагностики сифілісу використовують РІТ, МРП (мікрореакцію преципітації), ІФА, РЗК, РІФ.

РІТ ґрунтується на феномені втрати рухливості блідими трепонемами за наявності сироватки крові хворого і комплементу в анаеробних умовах. Для постановки РІТ використовують трепонеми, вирощені в яєчках кроликів. Кров хворого беруть натще із ліктьової вени, відділяють сироватку й інактивують її (прогрівають за 56 °С протягом 30 хв, при цьому руйнується комплемент, а імуноглобулінова фракція крові, тобто антитіла, стабілізується). Перед проведенням серологічного дослідження вживання лікарських препаратів відмінюють за 3—4 тиж.

У пробірку вносять 1,7 см³ зависі тканинних трепонем, додавають 0,2 см³ сироватки крові, що досліджується, і 0,1 см³ свіжого комплементу (сироватки крові морської свинки). Паралельно ставлять контрольні реакції. Під мікроскопом у препаратах "роздавлена крапля" враховують кількість рухливих трепонем у краплі з контрольної пробірки та краплі з дослідної пробірки.

Результати реакції вважають позитивним, якщо відсоток іммобілізації перевищує 50.

МРП з кардіоліпіновим антигеном використовують для профілактичного масового обстеження на сифіліс і для діагностики. Використовують два варіанти мікрореакції: якісний і кількісний.

Якісний варіант частіше застосовують під час профілактичного обстеження.

Для отримання плазми у пацієнта беруть кров із пальця капіляром апарата Панченкова, змоченим 5 % розчином натрію цитрату (для запобігання згортанню крові), і вносять її у пробірку Вассермана, в якій міститься декілька крапель розчину натрію цитрату. Кров відстоюють або центрифугують для отримання плазми. Паралельно ставлять реакції з плазмою і сироваткою крові хворого. Для отримання сироватки кров беруть із вени, отримують сироватку та інактивують її. Паралельно ставлять контрольну реакцію з позитивною сироваткою.

Мікрореакцію ставлять у лунках полістиролової планшети. У лунки вносять по 3 краплі плазми або сироватки крові, що досліджується, додають по 1 краплі емульсії кардіоліпіно-вого антигену і струшують протягом 5 хв. Потім до кожної лунки додають по 3 краплі ізотонічного розчину натрію хлориду, змішують інгредієнти погойдуванням пластин і залишають за кімнатної температури на 5 хв (оптимальною є температура 23—28 °С). Результати враховують після появи пластівців у контрольній позитивній сироватці крові, але не пізніше ніж через 7—10 хв після змішування всіх інгредієнтів. У лунках з плазмою і сироваткою крові осідають різні за розміром пластівці. Появу великих пластівців розцінюють як позитивний результат (++++, +++), середньої величини і дрібних — як слабопозитивний (++, +).

Кількісний варіант мікрореакції дає змогу, не подовжуючи часу (15—30 хв), об'єктивніше оцінити стан пацієнтів (визначити кількість антитіл) і використати його як критерій оцінки в динаміці лікування хворих на сифіліс. Для цього сироватку або плазму крові пацієнта розводять у співвідношеннях від 1:2 до 1:64. Врахування результатів проводять за тим самим принципом. Титром сироватки або плазми вважається розведення, в якому результат має оцінку "++".

РЗК (реакція Вассермана, РВ, або РЛУ). У пацієнта з підозрою на сифіліс РВ ставлять паралельно з мікрореакцією преципітації. Для постановки реакції використовують такі інгредієнти: сироватку крові хворого, антиген трепонемний, ультразвуковий, антиген кардіоліпіновий, ізотонічний розчин натрію хлориду,

комплемент, гемолітична система (суміш гемолітичної сироватки й еритроцитів барана).

Взяття крові проводять натще або не раніше ніж через 6 год після споживання їжі. Не можна брати кров у хворих з підвищеною температурою тіла, після недавно перенесеної інфекційної хвороби, у жінок — під час менструації, у вагітних — в останні 10 днів, у породіль — у перші 10 днів після пологів, у немовлят — у перші 10 днів життя, у разі вживання спиртних напоїв — раніше ніж через 24 год.

/ Кров відбирають з ліктьової вени у кількості 8—10 см³ у суху стерильну пробірку, у немовлят кров відбирають із п'ятки. До лабораторії вона має бути доставлена не пізніше ніж через 24 год за умови зберігання її у холодильнику за 4 °С. Відстояну сироватку переносять в іншу стерильну пробірку й інактивують. Інактивовані сироватки можуть зберігатися у морозильній камері холодильника протягом 5—6 дб, активні сироватки — 30 дб (повторне розморожування і заморожування не допускається).

РВ ставлять з двома антигенами: ультраозвученим трепонемним і кардіоліпіновим.

Завдання 3. Ознайомтеся з методикою проведення реакції Вассермана.

Методика проведення реакції Вассермана:

- у штатив ставлять 3 пробірки Вассермана;
- маркують пробірки: на першій зазначають номер аналізу і цифру 1, на другій — 2, на третій — 3 (контроль);
- в усі пробірки вносять по 0,25 см³ досліджуваної сироватки;
- у першу пробірку додають 0,25 см³ антигену трепонемно-го, у другу — 0,25 см³ антигену кардіоліпінового, у третю — 0,25 см³ ізотонічного розчину натрію хлориду;
- пробірки струшують, витримують їх 10 хв за кімнатної температури;
- в усі пробірки додають по 0,25 см³ комплементу;
- пробірки струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 45—60 хв;
- в усі пробірки додають по 0,5 см³ гемолітичної системи;
- пробірки струшують, ставлять їх у термостат на 45—60 хв за 37 °С (до настання гемолізу у контрольній пробірці).

Облік результатів реакції: еритроцити осіли на дно, рідина безбарвна або злегка рожева — реакція позитивна; осад незначний або осаду немає, рідина інтенсивно забарвлена — реакція негативна.

3. Ознайомлення з методами мікробіологічної діагностики бореліозів

Завдання 4. Ознайомтеся з методами мікробіологічної діагностики поворотного тифу.

Для діагностики поворотного тифу найбільш доступними методами є мікроскопічний і біологічний.

Мікроскопічний метод. Мікроскопії підлягають кров хворого, гемолімфа ектопаразитів (вошей, кліщів), секційний матеріал. Кров у хворого відбирають на початку періоду підвищення температури тіла і виготовляють декілька препаратів: мазок, товсту краплю і висячу краплю. Товсту краплю не фіксують. На висушену на повітрі товсту краплю наносять 0,5 см³ розведеного барвника Гімзи (1 крапля барвника + 1 крапля дистильованої води). Через декілька хвилин настає гемоліз під дією дистильованої води, цю порцію барвника змивають і наносять нову. Фарбування проводять 20—30 хв. Барвник зливають і дуже обережно (крапля не фіксована!) промивають водою. Під час мікроскопії виявляють лейкоцити і борелії, які мають синьо-фіолетовий колір, містять 4—12 нерівномірних завитків.

Для диференціальної діагностики епідемічного й ендемічного поворотного тифу кров для мікроскопії беруть у період ремісії. При ендемічному поворотному тифі в період ремісії виявляється помірна або слабка спірохетемія, при епідемічному — в період ремісії спірохети не виявляються.

Біологічний метод також використовують для диференціації епідемічного й ендемічного поворотного тифу. Після зараження морських свинок, білих мишей патологічним матеріалом, що містить збудників ендемічного поворотного тифу,

інфекція розвивається через 5—6 діб, збудник легко виявляється в крові і мазках-відбитках заражених тварин.

У разі зараження тварин патологічним матеріалом, що містить збудника епідемічного поворотного тифу, інфекція не розвивається, оскільки тварини нечутливі до борелій Обермейєра.

4. Вивчення методів мікробіологічної діагностики лептоспірозу

Завдання 5. *Вивчіть методи мікробіологічної діагностики лептоспірозу.*

Для діагностики лептоспірозу використовують мікроскопічний, культуральний (бактеріологічний), біологічний та серологічний методи. Дослідження проводять у лабораторії особливо небезпечних інфекцій або у бактеріологічних лабораторіях, що мають дозвіл на право роботи з патогенними мікроорганізмами III—IV груп небезпечності.

Мікроскопічні, культуральні та біологічні дослідження проводять паралельно. Метою дослідження є виявлення лептоспир і проведення диференціації патогенного виду *L. interrogans* від сапрофітного — *L. biflexa*. Крім цього, визначають сероваріанти патогенних лептоспир.

Мікроскопічний метод. Для мікроскопії використовують кров від початку і до 5-ї доби захворювання, сечу — з 10-ї до 40-ї доби, спинномозкову рідину досліджують у разі появи менінгеальних симптомів з 10-ї до 16-ї доби хвороби, із секційного матеріалу відбирають тканинну рідину з уражених органів (печінки, нирок) піпеткою з глибини 2—5 мм.

Виявити лептоспир у крові важко, тому із однієї проби крові готують 10—15 препаратів. Оскільки лептоспир дуже погано сприймають барвники, бактеріоскопічне дослідження проводять з живими збудниками в темному полі зору у препараті "роздавлена крапля".

Бактеріологічний метод. Кров, сечу, спинномозкову рідину засівають у пробірки з поживним середовищем. Інкубацію проводять за 28 °С. Лептоспир не змінюють вигляд поживного середовища (середовище залишається прозорим). Ріст лептоспир виявляють під час мікроскопії препаратів "роздавлена крапля". Посіви контролюють протягом 3 міс, ріст — кожні 5—6 діб.

Ідентифікацію виділених лептоспир проводять у РА з типовими сироватками.

Біологічний метод. Зараження хом'ячків або морських свинок проводять внутрішньоочеревинно. За тваринами спостерігають протягом 15 діб, кожного дня їм вимірюють температуру тіла і зважують. У разі позитивного результату на 4—6-у добу маса тіла тварин знижується, починається слюзотеча, підвищується температура тіла до 39—40 °С. Тварини гинуть на 9—10-й день при явищах загальної жовтяниці. Під час розтину загиблих тварин виявляють геморагії (крововиливи) в органах і тканинах.

Проводять мікроскопічне і бактеріологічне дослідження кіркового шару нирок, а також серологічне дослідження крові. Виділення лептоспир із крові й органів, захворювання тварин або виявлення специфічних антитіл свідчить про наявність збудника у досліджуваному матеріалі.

Серологічний метод використовують з 5—7-ої доби хвороби. Максимальний титр антитіл виявляють на 14—20-у добу. Для серологічної діагностики найбільш широко застосовують реакцію мікроаглютинації (РМА). Залежно від імунного статусу антитіла зберігаються у сироватці крові перехворілих від декількох місяців до 10 років і більше. РМА ставлять у розведенні сироватки від 1:10 до 1:1600 і вище. Як антиген використовують 4—10-добову культуру лептоспир. Результати враховують через 1 год. У разі позитивної специфічної реакції спостерігають аглютинацію і лізи спірохет.

Перспективним і високочутливим методом для виявлення антитіл є ІФА.

Для виявлення лептоспир у доквіллі проводять дослідження матеріалу з відловлених гризунів і води відкритих водойм. У відловлених гризунів досліджують кров, сечу і кірковий шар нирок мікроскопічним, бактеріологічним та біологічним методами.

Для дослідження води використовують **біологічний метод**. Для цього досліджувану воду внутрішньоочеревинно вводять двом золотистим хом'ячкам (10,0 і 1,0 см³) або у досліджуваній воді, підігрійтій до 30 °С, морську свинку

купають протягом 2 год. При цьому у морської свинки вибрівають і скарифікують ділянку шкіри. За наявності лептоспір у воді вони легко проникають через травмовану шкіру і спричинюють захворювання тварини через 5—11 діб після зараження. Нагляд за тваринами проводять протягом 1—2 міс. У разі підвищення температури тіла у тварин беруть кров із серця і висівають на поживні середовища. Після загибелі тварин роблять посіви крові, печінки, кіркового шару нирок на поживні середовища і визначають наявність антитіл у сироватці крові. Виявлення лептоспір із органів заражених тварин і протилептоспірозних антитіл у сироватці їх крові свідчить про наявність лептоспір у воді, яка досліджувалась.

5. Вивчення препаратів, які використовують для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених спірохетами.

Завдання 6. *Вивчіть препарати, які використовують для специфічної профілактики і лікування хвороб, спричинених патогенними спірохетами.*

Контрольні запитання

1. Як за морфологічними і тинкторіальними ознаками можна відрізнити трепонеми, борелії та лептоспіри?
2. Як відбирають патологічний матеріал для мікроскопічного дослідження при сифілісі?
3. За якими ознаками під час мікроскопії відрізняють *T. pallidum* від сапрофітних трепонем?
4. Які серологічні реакції використовують для діагностики сифілісу?
5. Як ставлять реакцію іммобілізації трепонем?
6. З якою метою проводять МРП?
7. Яких умов слід дотримуватися під час взяття крові на РЗК?
8. Як підготувати сироватку крові для дослідження в РЗК?
9. Які антигени використовують у РЗК?
10. Які методи використовують для діагностики поворотного тифу?
11. Які дослідження проводять з метою диференціації епідемічного й ендемічного поворотного тифу?
12. Які методи використовують для діагностики лептоспірозу та для виявлення лептоспір у доквіллі?
13. При яких спірохетозах використовують імунологічні препарати для профілактики і лікування?

Тести

1. Для виявлення спірохет у патологічному матеріалі препарати найчастіше фарбують за:
 - а) Грамом;
 - б) Цілем—Нільсеном;
 - в) Буррі—Гінсом;
 - г) Романовським—Гімзою.
2. Під час масового обстеження населення на сифіліс використовують серологічну реакцію:
 - а) зв'язування комплементу (Вассермана);
 - б) МРП;
 - в) іммобілізації трепонем;
 - г) імунофлуоресценції.
3. Збудником ендемічного поворотного тифу є:
 - а) *B. duttoni*;
 - б) *B. recurrentis*;
 - в) *B. burgdorferi*.
4. Переносником епідемічного поворотного тифу є:
 - а) воші;

- б) кліщі;
 - в) комарі;
 - г) блохи.
5. Воші передають борелії поворотного тифу під час:
- а) укусу;
 - б) втирання гемолімфи після роздавлювання;
 - в) втирання випорожнень.
6. Збудником епідемічного поворотного тифу є:
- а) *B. duttoni*;
 - б) *B. recurrentis*;
 - в) *B. burgdorferi*;
 - г) *B. caucasicus*.
7. Для виявлення лептоспир у воді відкритих водойм використовують метод:
- а) бактеріологічний;
 - б) біологічний;
 - в) серологічний;
 - г) мікроскопічний.

Ситуаційні задачі

1. Для постановки МРП для діагностики сифілісу як антиген використовують ліпідний екстракт серця великої рогатої худоби (кардіоліпіновий антиген). На чому ґрунтується ця реакція?

2. Під час реакції Вассермана в усіх пробірках (дослідних і контрольних) відбувся гемоліз. Як оцінити результати такої реакції?

3. Під час мікроскопії препарату, виготовленого з осаду сечі і пофарбованого за Романовським—Гімзою, виявлено спірально-звивисті мікроорганізми, що нагадують туго скручений канат і мають С- і в- подібну форму, блідо-рожевого кольору. Який діагноз орієнтовно можна поставити на основі мікроскопії сечі?

4. Реакція Вассермана із сироваткою крові хворого з підозрою на сифіліс виявила такий результат: у контрольних пробірках — гемоліз, у дослідних — еритроцити випали в осад, а рідина залишилася безбарвною. Чи підтвердився діагноз серологічно?

5. При довготривалому донорстві, під час менструації, до і після пологів, у новонароджених, в осіб, що вживали алкоголь за 24—72 год до взяття крові на аналіз, у хворих на деякі інфекційні хвороби можлива хибнопозитивна реакція Вассермана. Які дослідження слід провести, щоб відрізнити справжню позитивну реакцію від хибнопозитивної?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 14.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 14

- 1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
- 2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 341— 358; практикум, с. 157—163).

Практичне заняття 14

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ РИКЕТСІЯМИ, ХЛАМІДІЯМИ, МІКОПЛАЗМАМИ

Мета заняття:

- знати особливості взяття патологічного матеріалу на дослідження та його транспортування до бактеріологічної лабораторії, оформлення супровідної документації;
- знати методи мікробіологічної діагностики. Оснащення: таблиці, заздалегідь поставлена РАР.

План

1. Вивчення методів мікробіологічної діагностики висипного тифу.
2. Ознайомлення з методикою проведення РАР для діагностики висипного тифу.
3. Вивчення методів мікробіологічної діагностики хламіді-озів.
4. Вивчення методів мікробіологічної діагностики міко-плазмозів.

Хід заняття

1. Вивчення методів мікробіологічної діагностики висипного тифу

Завдання 1. Вивчіть методи мікробіологічної діагностики епідемічного висипного тифу.

Діагностику епідемічного висипного тифу і хвороби Брилля проводять з урахуванням комплексу клініко-епідеміологічних даних, результатів серологічного дослідження крові хворого з антигеном рикетсій Провачека, а також даних анамнезу про перенесення в минулому епідемічного висипного тифу.

У діагностиці епідемічного висипного тифу та хвороби Брилля вирішальними є серологічні дослідження. Антитіла накопичуються наприкінці 1-го — на початку 2-го тижня захворювання. Основними серологічними реакціями є: реакція аглютинації рикетсій — РАР, РЗК, РИГА, реакція непрямой імуофлюоресценції — РНІФ.

У РАР. Антитіла до рикетсій Провачека виявляють з 5—7-го дня хвороби. З 2-го тижня їх виявляють у всіх хворих у високих титрах (1:160 — 1:640). У період реконвалесценції титр аглютинуючих антитіл зменшується. Анамнестична реакція аглютинації через 1 рік і більше зберігається у низьких титрах (1:10 — 1:20). Діагностичним титром РАР при одноразовій постановці вважають 1:40 у разі використання антигену з рикетсій, накопичуваних за методом Вейгля (у кишках вошей), та 1:160 — у разі використання антигену із рикетсій, накопичуваних у курячих ембріонах.

РЗК — суворо специфічна і високочутлива. Антитіла визначаються з 5—7-ї доби у 48 % хворих, на 2-му тижні — у 96 %, а на 3-му тижні — у 100 %. РЗК зберігається позитивною протягом багатьох років, навіть десятиліть після перенесеної інфекції. Реакцію використовують для ретроспективних досліджень під час пошуків джерел інфекції, а також для виявлення імунологічної структури населення відносно висипного тифу. У разі виявлення активної форми інфекції діагностичний титр РЗК становить 1:160, у разі ретроспективної діагностики — 1:10.

РИГА, на відміну від РЗК, позитивна тільки протягом активної фази висипнотифозної інфекції і в найближчі строки реконвалесценції (до 6 міс).

За допомогою РИГА визначають свіжі або порівняно недавні форми захворювання. Реакція вважається специфічною у розведенні 1:100, надійний діагностичний титр становить 1:1000. У хворих на висипний тиф гемаглютиніни визначаються переважно у високих титрах — 1:1000 — 1:25 000 і вище.

РНІФ — високочутлива і високоспецифічна. На 5—7-у добу хвороби антитіла визначаються у високих титрах: 1:320 — 1:1230, на 10—15-у добу титр антитіл збільшується до 1:2560 — 1:10 240. РНІФ у низьких титрах зберігається багато років і навіть десятиліть, тому її застосовують для визначення гострої форми інфекції, ретроспективної діагностики і виявлення імунологічної структури населення, а також для визначення класів імуноглобулінів під час проведення диференціальної діагностики епідемічної форми хвороби і хвороби Брилля. Для хвороби Брилля як рецидивної форми хвороби характерно накопичення IgG із

самого початку хвороби. Для епідемічної форми хвороби характерно, що спочатку накопичуються IgM. Але ці дослідження характерні тільки до 19-го дня хвороби, тому що у більш пізні строки IgG накопичуються як при хворобі Брилла, так і при епідемічній формі хвороби.

Ці серологічні реакції бувають позитивними і при атипових формах висипного тифу, коли клінічно діагностувати висипний тиф неможливо. У динаміці титри антитіл підвищуються до максимуму наприкінці 2-го тижня (14—15 днів), тому дослідження сироватки крові проводять на 6—7-у добу хвороби і повторно через 3—5 днів. У деяких хворих спостерігається "випадання" окремих серологічних реакцій, тому дослідження слід проводити паралельно в двох серологічних реакціях одночасно: РАР і РЗК або РАР і РИГА.

У разі застосування антибіотиків широкого спектра дії (тетрацикліну, рифампіцину) в ранні строки хвороби може спостерігатися зниження титрів антитіл або запізнення їх появи.

Завдання 2. *Ознайомтеся з методами мікробіологічної діагностики ендемічного висипного тифу.*

Для діагностики ендемічного висипного тифу використовують серологічний і біологічний методи. Для серологічної діагностики використовують РАР і РЗК. Їх ставлять так само, як і відповідні реакції при епідемічному висипному тифі, але використовують діагностикум, виготовлений із *R. typhi*. Ці реакції дають змогу діагностувати ендемічний висипний тиф і провести диференціацію ендемічного й епідемічного висипного тифу.

Біологічний метод здебільшого використовують для диференціації епідемічного й ендемічного висипного тифу. Кров'ю хворого заражають самців морської свинки внутрішньооче-ревинно. Рикетсії Провачека спричинюють у них гарячку, а *R. typhi* — скротальний феномен (рикетсійний періорхіт).

2. Ознайомлення з методикою проведення РАР для діагностики висипного тифу

Завдання 3. *Ознайомтеся з методикою проведення РАР для діагностики висипного тифу.*

Реакція аглютинації з рикетсійним антигеном ставиться аналогічно до інших розгорнутих реакцій аглютинації.

Облік результату реакції проводять без збовтування пробірок за системою чотирьох плюсів (від ++++ до -).

3. Вивчення методів мікробіологічної діагностики хламідіозів

Завдання 4. *Ознайомтеся з методами мікробіологічної діагностики хламідіозів.*

Оптимальними ділянками для розмноження хламідій є циліндричний епітелій сечостатевого органу: у чоловіків — передній відділ сечівника на глибині 2,5—4 см, у жінок — сечівник і слизова оболонка каналу шийки матки на глибині 1,5 см. Зскрібки зі слизових оболонок сечостатевого каналу у чоловіків відбирають одноразовим зондом (щіточкою, ложечкою Фолькмана або жолобуватим зондом) обертальним рухом на відстані 2—4 см у ділянці човноподібної ямки. Напередодні допускається провокація (гостра їжа, алкоголь), за 4—5 год до взяття матеріалу пацієнту слід утримуватись від випускання сечі. У жінок матеріал відбирають перед або не раніше ніж через 14 днів після менструації. Зскрібки беруть після вилучення слизової пробки із піхвової частини шийки матки, а також із сечостатевого каналу на глибині 0,5—1,5 см. Інструменти для взяття проб обережно вводять у цервікальний канал, не торкаючись стінки піхви, і легким рухом (не до крові!) відбирають матеріал. Зскрібок із кон'юнктиви (верхньої і нижньої повік) беруть затупленим очним скальпелем після анестезії 0,5 % розчином дикаїну. Зскрібки з носових ходів відбирають зондами або ватним тампоном. Досліджують також матеріали, отримані під час діагностичних пункцій, біопсій, хірургічним шляхом, а також секретів статевих залоз, кров, синовіальну рідину суглобів, змиви з бронхів. Для діагностики використовують

мікроскопічний, бактеріологічний, серологічний, алергійний і молекулярно-генетичний методи.

Мікроскопічний метод. Одразу після взяття матеріал обертальними рухами наносять на поверхню ямки чистого знежиреного предметного скла так, щоб усі боки тампона торкалися поверхні скла. Мазок висушують на повітрі протягом 20—30 хв і фіксують холодним (4 °С) абсолютним хімічно чистим ацетоном упродовж 5—10 хв. Мазок фарбують за Романовським—Гімзою. В уражених клітинах виявляють цитоплазматичні вклучення, що утворюються хламідіями. Це зернисті структури, що містять збудника на різних етапах його розмноження. Вклучення, що містять ретикулярні тільця, забарвлюються в синьо-фіолетовий колір, елементарні тільця (зрілі) — в рожево-червоний.

Одним із найбільш доказових, але і трудомістких є **культу-ральний метод** (бактеріологічний). Його проводять тільки в спеціалізованих лабораторіях. Для виділення хламідій використовують культуру клітин HeBa-229, ВНК-21 у вигляді моно-шару на покритому склі. Інкують матеріал за 37 °С протягом 48—72 год. Збудника виявляють під мікроскопом у разі фарбування препарату за Романовським—Гімзою.

Серологічний метод використовують для виявлення антитіл у РНІФ, ІФА, РЗК, РИГА.

Для проведення **молекулярно-генетичного** дослідження використовують ДНК-зондову гібридизацію та ЛПР.

Розроблені і застосовуються імунохроматографічні **експрес-методи**. Тривалість аналізу становить 10—30 хв, але чутливість і специфічність експрес-аналізів набагато нижча від традиційних.

4. Вивчення методів мікробіологічної діагностики мікоплазмозів

Завдання 5. Вивчіть методи мікробіологічної діагностики мікоплазмозів.

Для дослідження відбирають мокротиння, змиви з бронхів, кров, спинномозкову рідину, а також матеріал із сечостатевої системи. Використовують бактеріологічний і серологічний методи діагностики. Під час **бактеріологічного методу** посіви виконують у рідке і на щільне спеціальні для мікоплазм поживні середовища. Посіви інкують за температури 36,5—37 °С протягом 24—48 год. Результат вважають позитивним, якщо після закінчення терміну інкубації колір середовища змінюється від жовтого до рожевого за відсутності каламуті. На щільному поживному середовищі (це саме рідке середовище + агар) посіви інкують 5 дб в умовах підвищеного вмісту CO₂. Колонії розглядають під мікроскопом (об'єктив x40).

Виділену культуру ідентифікують за культуральними, морфологічними та біохімічними властивостями. Для їх типування використовують реакції пригнічення росту або метаболізму специфічними імунними сироватками.

Для виявлення мікоплазм у спермі використовують реакцію імунофлюоресценції.

Для **серологічного методу** діагностики використовують ІФА, реакцію агрегації (РАГА), РІГА.

Контрольні запитання

1. Які методи мікробіологічного дослідження найбільш достовірні для підтвердження діагнозу "висипний тиф"?
2. Яке значення має використання різних серологічних реакцій для діагностики висипного тифу?
3. Які серологічні реакції можна використати для ретроспективної діагностики і для виявлення імунологічної структури населення відносно висипного тифу?
4. Яку серологічну реакцію можна використати для визначення класів імуноглобулінів?
5. З якою метою визначають окремо ІСМ і ІS0?

6. Чому для діагностики висипного тифу слід проводити паралельно щонайменше дві серологічні реакції, а не обмежуватися однією?
7. Які методи використовують для диференціальної діагностики епідемічного й ендемічного висипного тифу?
8. Який матеріал і як відбирають на дослідження при хла-мідіозах?
 9. Які методи використовують для діагностики хламідіозів?
 10. Який матеріал відбирають і якими методами його досліджують при мікоплазмозах?

Тести

1. Рикетсії зазвичай не розмножуються:
 - а) у курячому ембріоні;
 - б) на поживних середовищах;
 - в) у культурі клітин;
 - г) в організмі тварин.
2. Епідемічний висипний тиф передається шляхом:
 - а) трансмісивним;
 - б) повітряно-краплинним;
 - в) аліментарним;
 - г) водним.
3. Запалення легень можуть спричинити:
 - а) *M. pneumoniae*;
 - б) *U. urealyticum*;
 - в) *M. hominis*.
4. Інфекційна форма хламідій:
 - а) елементарні тільця;
 - б) ініціальні тільця;
 - в) проміжні тільця.
5. Хвороба Бриля—Цинссера розвивається після:
 - а) вторинного зараження до одужання;
 - б) вторинного зараження після одужання;
 - в) після одужання без додаткового зараження;
 - г) у період реконвалесценції.

Ситуаційні задачі

1. Після зараження самця морської свинки кров'ю хворого з підозрою на висипний тиф у тварини розвинувся періорхіт. Який висновок слід зробити і які дослідження провести для уточнення діагнозу?
2. Для діагностики висипного тифу використовують РАР. Під час постановки реакції на 6-й день після захворювання титр сироватки становив 1:80, через 10 діб — 1:640. У скільки разів збільшився титр сироватки? Чи підтвердився діагноз?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 15.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 15

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Вивчіть теоретичний матеріал (див. підручник, с. 359—407; практикум, с. 164—178).

Практичне заняття 15 ЛАБОРАТОРНА

ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Мета заняття:

- знати методи культивування вірусів;
-) — знати особливості взяття патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування до вірусологічної лабораторії;
- уміти відбирати патологічний матеріал для дослідження;
- уміти оформляти супровідну документацію;
- знати препарати для специфічного лікування та профілактики вірусних інфекцій.

Оснащення: таблиці, відеофільм (по можливості), екскурсія до вірусологічної лабораторії (по можливості), розчин Хенк-са, розлитий у пробірки по 0,5 см³, стерильні сухі тампони для носа і зіва, стерильні шпатель для зіва, клейка стрічка, бланки направлень, пастикові пакети різного розміру, враховуючи розмір пробірок, вата, термоізолюючий контейнер, пакет для направлень, препарати для специфічної профілактики і лікування вірусних інфекцій.

План

1. Ознайомлення з методами культивування вірусів, їх індикації та ідентифікації.
2. Ознайомлення з методами взяття матеріалу при вірусних інфекціях, упаковкою та умовами його транспортування до лабораторії.
3. Відбір вірусомісного матеріалу при ГРВІ, підготовка його до транспортування.
4. Вивчення препаратів для специфічної профілактики і лікування вірусних інфекцій.

Хід заняття

1. Ознайомлення з методами культивування вірусів,

їх індикації та ідентифікації Завдання 1. Ознайомтеся з

методами культивування вірусів, їх індикації та ідентифікації.

Культивування вірусів у вірусологічних лабораторіях проводять з метою виділення їх з клінічного матеріалу і подальшої ідентифікації, а також для культивування лабораторних штамів збудника, приготування діагностичних препаратів та отримання вакцин.

Виділення вірусів потребує багато часу (2—4 тиж) і значних матеріальних витрат.

Для культивування вірусів у сучасних вірусологічних лабораторіях використовують культури клітин і курячі ембріони.

Виділення вірусів на культурах клітин. Культури клітин бувають первинно-трипсинізовані (первинні), перещеплювані та диплоїдні.

✓ *Первинні культури клітин* отримують із тканин людини чи тварини. Для цього шматочки тканин або цілі органи вміщують у 0,25 % розчин трипсину за температури 37 °С і перемішують на магнітній мішалці. Трипсин розщеплює міжклітинну тканину, внаслідок чого тканина або орган розпадається на окремі клітини, тому їх ще називають первинно-трипсинізованими. Через кожні 20—30 хв завис клітин відділяють у центрифужні пробірки. Після центрифугування трипсин зливають, а до клітин додають поживне середовище, в якому клітини зберігають свою життєздатність. Ці культури клітин можуть розмножуватися *in vitro*, зазнають близько 10 поділів, а потім гинуть. Для отримання первинних клітин найчастіше використовують нирки ембріона людини (клітини називають НЕЛ), нирки макаки-резус, африканської зеленої мавпи, ембріона свині, фібробласти курячих ембріонів.

0 *Перещеплювані культури клітин* — це клітини одного типу, що набули здатності до необмеженого росту. їх отримують із пухлин або з нормальних тканин людей чи тварин, що мають змінений каріотип. Практичні лабораторії отримують перещеплювані клітинні лінії від центральних банків клітинних культур науково-дослідних інститутів. Із перещеплюваних клітинних культур найчастіше використовують такі: HeLa (клітини, отримані з тканин карциноми шийки матки), Нер-2 (із карциноми гортані), KB (із карциноми ротової порожнини), RH (з нирок ембріона людини), Vero (з нирок зеленої мавпи), MDCK (з нирок собаки), SIRC (клітини рогики кролика).

Диплоїдні клітини — це клітини одного типу, які здатні витримувати *in vitro* близько 100 поділів, зберігаючи при цьому вихідний диплоїдний набір хромосом.

За визначенням Міжнародного комітету з культур клітин, штамом диплоїдних клітин називається морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована в процесі культивування *in vitro*, яка має обмежений термін життя і характеризується трьома фазами (фаза стабілізації, активного росту і старіння), зберігає у процесі пасивування каріотип, властивий вихідній тканині, вільна від контамінантів (забруднення будь-якими мікроорганізмами) і не має онкогенної активності. Їх отримують із ембріона людини. Ці культури надзвичайно вибагливі до умов культивування, тому їх рідко застосовують у практиці вірусологічних лабораторій. Їх використовують здебільшого у виробництві вакцин.

Для отримання культур клітин застосовують поживні середовища. Вони бувають ростові та підтримувальні.

Ростові середовища сприяють розмноженню клітин, їх швидкому росту і утворенню добре сформованих моношарів. Для їх виготовлення використовують стандартні середовища Ігла, Ігла МЕМ, подвійне середовище 199 та ін. Ці середовища містять оптимальний набір амінокислот, солей, вітамінів, необхідних для підтримання життєдіяльності клітин. До них додають 10 % інактивованої стерильної сироватки крові великої рогатої худоби чи ембріональної телячої сироватки.

Підтримувальні середовища використовують для підтримання життєдіяльності клітин в уже сформованому моношарі з метою забезпечення умов для репродукції вірусів. Для цього використовують ті самі стандартні середовища, але без сироватки, або додають її не більше ніж 2 % . Для пригнічення росту бактерій і цвільових грибів у середовища безпосередньо перед їх використанням додають антибіотики: пеніцилін, стрептоміцин (по 100 мкг/см³).

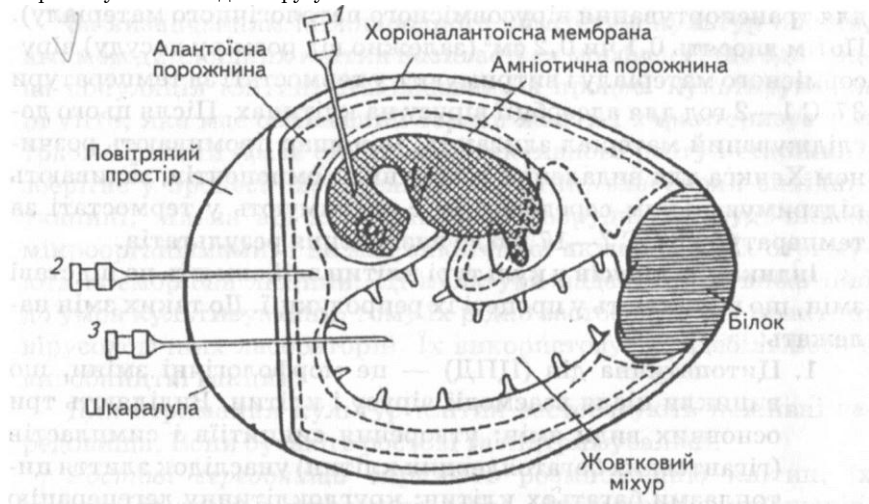
Клітинні культури використовують у вигляді суспензії або моношару на поверхні скла у флаконах, матрацах, пробірках. Для отримання моношару у стерильний посуд вносять певний об'єм (залежно від розміру посуду) суспензії клітин, додають середовище росту і ставлять у термостат за температури 37 °С. Формування моношару відбувається протягом 48 год. Потім середовище росту видаляють, моношар промивають розчином Хенкса (це збалансований сольовий розчин, який використовують для виготовлення поживних середовищ росту і підтримувальних середовищ, а також для промивання клітин, тканин і для транспортування вірусомісного патологічного **матеріалу**). Потім вносять 0,1 чи 0,2 см³ (залежно від розміру посуду) ніру сумісного матеріалу і витримують у термостаті за температури 37 °С 1—2 год для адсорбції вірусу на клітинах. Після цього досліджуваний матеріал зливають, моношар промивають розчином Хенкса для видалення токсичних компонентів, заливають підтримувальним середовищем і витримують у термостаті за температури 37 °С 7—17 діб до визначення результатів.

Індикацію вірусів у культурі клітин здійснюють на підставі змін, що виникають у процесі їх репродукції. До таких змін належать:

1. Цитопатична дія (ЦПД) — це морфологічні зміни, що виникли після взаємодії вірусу і клітин. Виділяють три основних види змін: утворення синцитіїв і симпластів (гігантських багатоядерних клітин) унаслідок злиття цитоплазми багатьох клітин; круглоклітинну дегенерацію (ущільнення, зморщування, деструкція клітин), що виникає внаслідок втрати міжклітинних зв'язків; розвиток вогнищ клітинної проліферації, які складаються з декількох шарів клітин.
2. Утворення внутрішньоядерних (віруси герпесу, аденовіруси) або цитоплазматичних (віруси сказу, грипу, віспи) включень.
3. Бляшкоутворення — здатність вірусів локально розмножуватися у клітинній культурі, руйнувати сусідні клітини і формувати у моношарі дефекти — вірусні бляшки. Кожна бляшка — це результат розмноження одного ві-ріону, за кількістю бляшок можна визначити інфекційну активність **вірусу**.
4. Реакція гемадсорбції — це здатність інфікованих вірусом клітин адсорбувати на своїй поверхні еритроцити (пара-міксовіруси).

5. Кольорова проба — це зміна кольору індикатора середовища під час розмноження культури клітин і збереження його кольору у разі загибелі культури клітин при репродукції в них вірусу.
6. Інтерференція — пригнічення цитопатичної дії одного вірусу під впливом іншого.

Причиною інтерференції є неспроможність вірусу проникати у клітину, заражену іншим видом вірусу.



Мал. 9. Способи зараження курячого ембріона:

1 — в амніотичну порожнину, 2 — в алантоїсну порожнину, 3 — у жовтковий міхур

Виділення вірусів на курячих ембріонах (мал. 9). Перевагою курячих ембріонів є їх доступність для будь-якої вірусологічної лабораторії, порівняна дешевизна і простота в роботі.

Використовують курячі ембріони (КЕ) віком від 5 до 12—14 днів. Вік ембріонів, спосіб їх зараження та термін отримання максимальної кількості вірусів залежать від біологічних властивостей вірусів і їх тропізму. Перед зараженням курячі яйця витримують у термостаті за температури 37 °C і 60—70 % відносної вологості (у термостат ставлять лотки з водою). Щоб ембріональні оболонки не злипалися, яйця в термостаті повертають кілька разів на добу. Через деякий час, коли розів'ються ембріони, яйця овоскопують для визначення життєздатності ембріонів. Показником їх життєздатності є наявність самостійних рухів, добре виражений судинний малюнок, пульсація судин. Під час овоскопії на шкаралупі роблять позначки (межу повітряного мішка, місце розміщення ембріона — "темне око" ембріона тощо). Існує декілька способів зараження курячого ембріона: у амніотичну й алантоїсну порожнини, у жовтковий міхур, на хоріоналантаїсну оболонку.

Перед зараженням шкаралупу яйця протирають запаленим спиртовим тампоном і 2 % спиртовим розчином йоду. Стерильною голкою для внутрішньом'язових ін'єкцій у шкаралупі роблять прокол і вводять у ембріон 0,1—0,2 см³ досліджуваного матеріалу. Для дослідження одного виду матеріалу зарають не менше ніж 4 курячих ембріони. Отвір від голки закривають парафіном або лейкопластиром. Після зараження ембріони інкубують у термостаті, розміщуючи їх тупим кінцем догори. Температура і тривалість інкубації залежить від біологічних властивостей вірусу. Після закінчення інкубації ембріони охолоджують для максимального звуження кровоносних судин: за температури -10...-18 °C протягом 1—2 год або при 4 °C протягом 16—18 год.

Розтин курячого ембріона проводять у стерильних умовах. Охолоджені яйця вміщують на підставку тупим кінцем догори, дезінфікують шкаралупу спиртом і розчином йоду, потім вирізають у ній отвір над повітряним простором вище за позначену його межу. Ідентифікацію вірусу проводять лише за допомогою серологічних реакцій. Для цього використовують реакцію ІФА, РІА, РГГА, РН, РЗК та ін.

2. Ознайомлення з методами взяття матеріалу при вірусних інфекціях, |упаковкою та умовами його транспортування до лабораторії

Завдання 2. *Ознайомтеся з методами взяття матеріалу при вірусних інфекціях.*

Важливою умовою успішного виділення вірусу є правильний відбір патологічного матеріалу і транспортування його до лабораторії. Відбирати матеріал слід у найбільш ранні строки після початку захворювання (при грипі — у перші 2 доби; в осіб, які контактували з хворим, — до появи у них симптомів інфекції; секційний матеріал — відразу після констатування факту смерті хворого). Під час відбору проб слід дотримуватися правил асептики та техніки безпеки.

Під час проведення маніпуляцій, які супроводжуються порушенням цілості шкіри та слизових оболонок, лабораторних досліджень, оброблення інструментарію і білизни, прибирання, розтину трупів тощо медичні працівники і технічний персонал користуються засобами індивідуального захисту (хірургічними халатами, гумовими рукавичками, масками, а в разі потреби — захисним екраном, непромокальними фартухами, наруківниками, окулярами). Ці дії дають змогу уникнути контакту шкіри та слизових оболонок працівника з кров'ю, тканинами, біологічними рідинами пацієнта.

Матеріал відбирають у стерильний посуд. Для цього використовують пробірки з кришками, що загвинчуються. Для запобігання забрудненню матеріалу бактеріальною мікрофлорою його відбирають в умовах, що максимально наближені до стерильних. Щоб запобігти підсиханню матеріалу й інактивації збудника, проби рекомендують вміщувати у транспортувальне середовище для вірусів (ВТС). До складу ВТС входять: розчин Хенкса (рН 7,4), захисний стабілізуючий агент — сироватковий альбумін великої рогатої худоби, пеніцилін, стрептоміцин і індикатор — феноловий червоний. Тип проби визначається характером захворювання, тропністю збудника до певних органів і систем та періодом перебігу інфекційного процесу. При ГРВІ відбирають назофарингеальні зразки, що містять циліндричні епітеліальні клітини носа і ротоглотки. Назофарингеальні зразки можна взяти одним із трьох способів: полосканням, аспірацією або за допомогою тампона. Під час *полоскання* хворому рекомендують старанно прополоскати горло 15—20 см³ розчину Хенкса або середовища 199, Ігла протягом 1 хв і зібрати змив у стерильний флакон. Для полоскання можна використати стерильний забуферений ізотонічний розчин натрію хлориду, а потім внести його у ВТС.

Під час *аспірації* шприцом через надітий на нього тонкий гумовий зонд у ніс вводять декілька сантиметрів кубічних стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, потім цю рідину відсмоктують, вміщують у центрифужну пробірку з ВТС і загвинчують кришку пробірки.

Найчастіше матеріал відбирають за допомогою *тампона*. Для цього треба мати для одного хворого 2 стерильних сухих ватних (або марлевих) тампони окремо для носа та для ротоглотки. Перед взяттям матеріалу проводять маркування пробірок з транспортувальним середовищем для вірусів. Спочатку ніс звільняють від слизу. Потім сухий стерильний тампон вводять у порожнину носа хворого по зовнішній стінці, злегка опускають донизу, вводять у нижній носовий хід на глибину 2—3 см, натискають тампоном на зовнішню стінку носа і обертовим рухом знімають десквамований епітелій (епітелій, що злушчується з поверхні тканини). Потім тампон опускають у пробірку з 2 см³ середовища ВТС або фосфатного буферного розчину. Другим стерильним тампоном протирають слизову оболонку задньої стінки глотки (докладаючи зусиль, щоб зняти частину епітеліальних клітин). Тампон вміщують у ту саму пробірку з ВТС, закривають пробкою і маркують. Пробірку з матеріалом охолоджують у холодильнику до 4 °С і доставляють до лабораторії в термосі з льодом, не допускаючи заморожування (при грипі — не пізніше 4 год). У лабораторії ВТС центрифугують 20 хв при 2—3 тис. об/хв і за температури 4 °С. Надосадову рідину використовують для зараження курячих ембріонів і культур клітин, а осад — для проведення імунофлюоресцентної мікроскопії.

Інший патологічний матеріал відбирають переважно за загальноприйнятими методиками, але є деякі особливості.

Спинномозкову рідину відбирають у кількості 1—2 см³, домішки еритроцитів і інших клітинних елементів видаляють центрифугуванням, віруси виділяють з надосадової рідини.

Проби калу відбирають у стерильні флакони з-під пеніциліну, масою 8—10 г (розміром з кісточку сливи). Флакони щільно закривають гумовими пробками. Отримані фекалії розводять розчином Хенкса у співвідношенні 1:10. Для отримання рівномірної суспензії флакон загортають у серветку, яка змочена 70 % розчином етилового спирту, струшують протягом 3—5 хв і центрифугують. Для виділення вірусу відбирають надосадову рідину. Якщо матеріал відбирають ректальним тампоном, його попередньо змочують у ВТС, вводять у пряму кишку обертальним рухом. Після взяття матеріалу тампон вміщують у пробірку з ВТС, відминають, віджимають і занурюють у дезінфекційний розчин. Отриману завесь у пробірці обробляють так само, як суспензію калу.

Кров на вірусологічне дослідження беруть із вени в об'ємі 5—10 см³, краще під час гарячки. Для запобігання згортанню кров дефібринують (струшують зі скляними паличками або додають 1 МО гепарину на 1 см³ крові). Нерозведену кров не замо-роясують і антибіотики не додають.

Кров на серологічне дослідження беруть у об'ємі 3—5 см³. Для отримання парних сироваток кров беруть з інтервалом 12—14 діб: першу пробу на початку захворювання, другу — через 2 тиж. Для отримання сироватки кров поміщають у термостат за 37 °С, утворений згусток відділяють від стінок пробірки скляною паличкою або пастерівською піпеткою. Для збільшення виходу сироватки пробірки із кров'ю, що згорнулася, ставлять у холодильник за температури 4 °С на 18—24 год. Для видалення решти домішок кров центрифугують, потім сироватку переносять у стерильну пробірку і зберігають у замороженому стані до отримання другої проби. Дві проби сироватки досліджують одночасно.

Сеча. Збирають середню порцію сечі в об'ємі 10 см³, охолоджують до 4 °С, центрифугують, надосадову рідину виливають у дезінфекційний розчин, а осад вміщують в 1 см³ ВТС. Осад у ВТС зберігають за 4 °С протягом не більше ніж 48 год перед доставкою до лабораторії. В іншому випадку його заморожують у ВТС за —70 °С і відправляють у пакетах із сухим льодом.

Рідину із серозних оболонки беруть в об'ємі 2 см³. Для виділення вірусів її використовують відразу (додаткового оброблення не потребує) або зберігають замороженою.

Мазок із кон'юнктиви беруть сухим стерильним тампоном і вміщують у ВТС. Після центрифугування використовують відразу або зберігають замороженим.

Вміст везикул. Поверхню шкіри обробляють ефіром або ацетоном. Вміст везикул відсмоктують шприцом із тонкою голкою і переносять у ВТС. Іноді везикули розтинають і вміст відбирають стерильним ватним тампоном, який вміщують у ВТС.

Секційний матеріал відбирають у найбільш ранній термін після смерті хворого. Щоб уникнути контамінації матеріалу бактеріальною мікрофлорою, матеріал відбирають у певній послідовності. Спочатку беруть проби позাপорожнинних тканин (лімфатичні вузли, мозок), потім тканини грудної порожнини (до початку розтину черевної порожнини) і в останню чергу — з черевної порожнини. Шматочки тканин масою 1—3 г поміщають у окремі стерильні флакони. Отримані шматочки тканин розтирають у стерильній ступці з додаванням стерильного піску, додають розчин Хенкса у співвідношенні 1:10, центрифугують. До освітленої рідини додають антибіотики і використовують для виділення вірусів негайно або зберігають за температури 20 °С.

На санітарно-вірусологічне дослідження відбирають матеріал з довілля: ґрунт, воду, молоко і молочні продукти, овочі, фрукти, а також тварин, в організмі яких можуть перебувати віруси (кліщі, молюски, риба тощо). Здійснення вірусологічного нагляду за об'єктами навколишнього середовища потрібне для визначення інтенсивності циркуляції вірусів на певній території, їх типового складу, оцінки ефективності роботи щодо оздоровлення навколишнього середовища.

Завдання 3. *Ознайомтеся з упаковкою та умовами транспортування вірусовмісного матеріалу до лабораторії.*

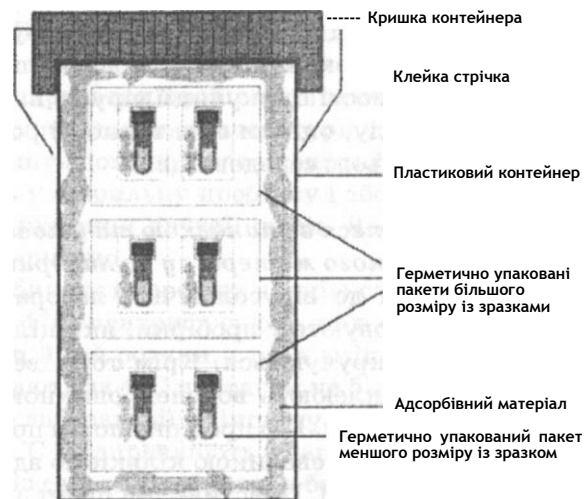
Для транспортування до вірусологічної лабораторії вірусовмісний матеріал упаковують у пробірки, які щільно закривають кришками, що закручуються. Крім того, верх пробірки разом із кришкою заклеюють водонепроникною клейкою стрічкою або лейкопластиром. Цю пробірку потім поміщають у пластиковий пакет разом із невеликою кількістю адсорбтивного матеріалу (наприклад, ватю). Пластиковий пакет закривають на "замок" або заклеюють чи запаюють.

Всі матеріали мають бути двічі упаковані, тому підготовлені пакети поміщають у пластикові пакети більшого розміру. Якщо від одного пацієнта відбирають декілька зразків, їх пакують окремо у пакети меншого розміру, а потім всі зразки можна помістити в пакет більшого розміру. Зразки, отримані від різних пацієнтів, пакують окремо в різні пакети більшого розміру. Зразки, що упаковані у 2 пластикових пакети, поміщають у пластиковий транспортний контейнер і закривають кришкою, що закручується. Верхню частину контейнера і кришку заклеюють лейкопластиром. Двічі упаковані зразки від одного чи різних пацієнтів транспортують в одному пластиковому контейнері. У цей контейнер також поміщають адсорбтивний матеріал. Направлення приклеюють до зовнішньої стінки контейнера (мал. 10).

Щільно закриті, із заклесними кришками контейнери поміщають у термоізолюючий контейнер, який пристосований для транспортування біологічних матеріалів (мал. 11).

Упаковка зразків має повністю відповідати спеціальній інструкції міжнародного агентства IATA № 650 з упаковки і транспортування небезпечних вантажів.

У термоізолюючому контейнері мають знаходитися заморожені холодильні елементи або інші пластикові пакети з льодом



Мал. 10. Пластиковий контейнер для транспортування матеріалу, що містить віруси

(але не з сухим льодом!). Його також заклеюють широкою клейкою стрічкою. На термоізолюючому контейнері вказують ім'я та адресу відправника, ім'я та адресу отримувача, а також інші необхідні та застерігальні надписи.

3. Проведення взяття вірусовмісного матеріалу при ГРВІ, підготовка його до транспортування

Завдання 4. Проведіть взяття вірусовмісного матеріалу при ГРВІ, підготуйте його до транспортування.

Алгоритм "Взяття назофарингеальних зразків при гострій респіраторній вірусній інфекції":

- поставте у штатив 1 пробірку з розчином Хенкса і 2 пробірки із сухими стерильними тампонами;
- підпишіть на пробірках (з розчином Хенкса) номер аналізу, на тампонах — номер аналізу та місце взяття матеріалу: "Н" (ніс) чи "З" (зів);
- запропонуйте хворому звільнити ніс від слизу;

<-----В*-----> ч \
Ім'я та адреса відправника

Ім'я та адреса отримувача

\
Зразки для діагностики

Упаковано у відповідності
з інструкцією IATA № 650

Мал. 11. Зовнішній термоізолюючий контейнер

- уведіть тампон у порожнину носа хворого на глибину 2—3 см і, натискаючи із зусиллям на зовнішню стінку носа, обертовим рухом зніміть десквамований епітелій;
- уведіть цей тампон в інший носовий хід і візьміть матеріал таким самим способом;

- опустіть тампон у розчин Хенкса, ретельно його відмийте і відіжміть об стінки пробірки; закрийте її пробкою;
- тампон помістіть у пробірку, на якій зазначено "Н";
- запропонуйте хворому широко відкрити рота;
- натисніть стерильним шпателем на корінь язика;
- візьміть другим тампоном матеріал із задньої стінки глотки;
- опустіть тампон у ту саму пробірку з розчином Хенкса, відмийте його і відіжміть об стінки цієї пробірки; тампон опустіть у пробірку, на якій зазначено "З"; закрийте її пробкою;
- заклейте пробку і верхню частину пробірки із середовищем Хенкса клейкою стрічкою;
- заповніть направлення.

Алгоритм *"Підготовка матеріалу для транспортування до лабораторії"*:

- помістіть пробірку разом із шматочком вати у пластиковий пакет меншого розміру;
- помістіть зразок від одного обстежуваного у пластиковий пакет більшого розміру;
- помістіть пакети у термоізолюючий контейнер, обкладіть їх ватою;
- закрийте щільно контейнер, заклейте кришку і верхню частину контейнера клейкою стрічкою;
- покладіть направлення в окремий пластиковий пакет, прикріпіть його до контейнера.

4. Вивчення препаратів для специфічної профілактики і лікування вірусних інфекцій

Завдання 5. *Вивчіть препарати, які використовують для специфічної профілактики і лікування вірусних інфекцій.*

Розгляньте препарати, визначте принципи використання, а також їх придатність до використання.

Контрольні запитання

1. З якою метою проводять культивування вірусів?
2. Які методи культивування вірусів використовують у сучасних вірусологічних лабораторіях?
3. Що таке первинні (або первинно-трипсинізовані) культури клітин? Як їх отримують?
4. Що таке перещеплювані культури клітин? З чого їх отримують?
5. Що таке диплоїдні клітини? У якому разі їх використовують?
6. Які середовища використовують для вирощування культур клітин і підтримання їх життєдіяльності?
7. Як проводять зараження культури клітин вірусами? За якими ознаками проводять індикацію й ідентифікацію вірусів у культурі клітин?
8. Як проводять виділення вірусів на курячих ембріонах?
9. Яких правил слід дотримуватися під час відбору проб на вірусологічне дослідження?
10. Який патологічний матеріал відбирають для мікробіологічного дослідження при вірусних інфекціях?
11. Якими методами відбирають назофарингеальні зразки?
12. Яке середовище використовують для транспортування вірусовмісного матеріалу?
13. Яким вимогам має відповідати упаковка вірусовмісного матеріалу?
14. У яких умовах транспортують і зберігають вірусовмісний матеріал?
15. Які препарати використовують для специфічної профілактики і лікування вірусних інфекцій?

1. Метод парних сироваток — це:
 - а) повторне дослідження сироватки крові хворого, відібраної з інтервалом 1—2 тиж;
 - б) одночасне дослідження сироватки крові хворого, відібраної з інтервалом 1—2 тиж;
2. Інтерференція вірусів — це:
 - а) здатність різних вірусів одночасно проникати в еукаріотну клітину;
 - б) здатність вірусу, що проник у клітину, надавати їй резистентності до проникнення інших вірусів;
 - в) здатність вірусу, що проник у клітину, полегшувати проникнення інших вірусів у цю клітину.
3. Культури клітин, що використовують для репродукції вакцинних штамів вірусів:
 - а) первинно-трипсинізовані;
 - б) перещеплювані;
 - в) диплоїдні.
4. Визначення виду і типу вірусу проводять за:
 - а) цитопатичною дією;
 - б) кольоровою пробою;
 - в) РГА-
 - г) реакцією нейтралізації.
5. Визначення наявності вірусу в патологічному матеріалі проводять за:
 - а) цитопатичною дією;
 - б) реакцією ІФА;
 - в) РГГА;
 - г) РН.
6. Середовище Ігла використовують для:
 - а) культивування вірусів;
 - б) культивування культури клітин.
7. Розчин Хенкса використовують для:
 - а) культивування вірусів;
 - б) культивування культури клітин;
 - в) транспортування вірусомісного матеріалу.
8. Для транспортування вірусомісного матеріалу використовують:
 - а) ВТС;
 - б) розчин Хенкса;
 - в) середовище Ігла;
 - г) всі відповіді правильні.

Ситуаційні задачі

1. Змивом із носоглотки хворого, якому було поставлено діагноз ГРВІ, заразили моношар первинно-трипсинізованих клітин нирок ембріона людини. Через 5 днів інкубації було виявлено цитопатичний ефект. Як визначити родину вірусу?

2. Під час профілактичного обстеження на ВІЛ-інфекцію сироватки крові в реакції ІФА виявився позитивний результат. Чи достатньо цього обстеження для остаточного встановлення діагнозу?

3. При вірусних інфекціях у клітинах людей поряд з ядром клітини (тільца Бабеша—Негрі при сказі) або в ядрі клітини (тільца Коудрі при герпесі) виявляються включення. Що вони собою являють? Як їх виявляють? Де враховують?

Домашнє завдання

Підготуйтеся до практичного заняття 16.

Рекомендації щодо самопідготовки до практичного заняття 16

1. Ознайомтеся з темою і метою практичного заняття, запишіть у щоденнику тему і план заняття.
2. Підготуйтеся до модульного контролю з розділу "Спеціальна мікробіологія" (див. підручник, с. 190—435; практикум, с. 93—180).

Практичне заняття 16

МОДУЛЬНИЙ КОНТРОЛЬ З РОЗДІЛУ "СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ"

Мета заняття:

- знати морфологічні і біологічні властивості збудників інфекційних хвороб;
- розуміти патогенетичні закономірності інфекційного процесу;
- знати особливості взяття патологічного матеріалу для дослідження та його транспортування до лабораторії;
- знати методи мікробіологічної діагностики інфекційних хвороб;
- уміти проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження, оформляти супровідну документацію;
- знати препарати для специфічної профілактики і лікування інфекційних хвороб.

Рекомендації щодо проведення модульного контролю

Модульний контроль проводять як семінар-практикум за схемою:

- 1) комп'ютерне тестування;
- 2) виконання практичних навичок;
- 3) розв'язування ситуаційних задач.

Орієнтовний перелік практичних навичок

1. Провести забір матеріалу для дослідження на стафілокок, менінгококову інфекцію, при кишкових хворобах, коклюші, дифтерії, ГРВІ, заповнити направлення, підготувати до транспортування.
2. Провести первинний посів патологічного матеріалу у разі обстеження на стафілокок, менінгококову інфекцію, при кишкових хворобах, коклюші, дифтерії, створити умови для культивування.
3. Підготувати хворого та пояснити йому, яких правил слід дотримуватися під час відбору мокротиння при підозрі на туберкульоз.
4. Визначити морфологічні і тинкторіальні властивості збудника під мікроскопом.
5. Дати характеристику препарату (вакцини, анатоксину, сироватки, імуноглобуліну), визначити принципи та придатність його до використання.

Зразки тестів і ситуаційних задач подані до кожної теми.

ВІДПОВІДІ НА ТЕСТИ І СИТУАЦІЙНІ ЗАДАЧІ

Модуль I: Загальна мікробіологія

Тема. Організація й обладнання бактеріологічної лабораторії.

Тести: 1 — б, 2 — г, 3 — а, 4 — б, 5 — б, 6 — б.

Ситуаційні задачі: 1. Використати імерсійний об'єктив 90. 2. Стафілококи. 3. За таких умов спори не гинуть. 4. За температури 37—40 °С.

Тема. Прості та складні методи фарбування препаратів.

Тести: 1 — а, 2 — в, 3 — в, 4 — в, 5 — а, 6 — в, 7 — г.

Ситуаційні задачі: 1. За Грамом. 2. Стрептокок грампозитивний і бактерії грамнегативні. 3. За Буррі—Гіпсом. 4. Наявність волотинових зерен. 5. Б-форма, червоний через відсутність пептидоглікану. 6. Стафілококи, бактерії, кислотостійкі палички. 7. Синього кольору, через відсутність клітинної стінки і втрату стійкості до кислоти.

Тема. Поживні середовища. Техніка посіву на поживні середовища.

Тести: 1 — б, 2 — б, 3 — в, 4 — г, 5 — б, 6 — а.

Ситуаційні задачі: 1. Культура мікроорганізмів виділяє протеолітичні ферменти і петонізує білок молока. 2. Культура мікроорганізмів виділяє сахаролітичні ферменти, які розщеплюють лактозу молока до кислоти і газу. За наявності кислоти білок зсідается, а газ виштовхує пробку. 3. Культура мікроорганізмів спричинює альфа-гемоліз, гемоглобін перетворюється на метгемоглобін. 4. Культура нерухлива (росте вздовж уколу), не розщеплює лактозу (колір середовища не змінився). 5. Паличка синьозеленого гною, але можуть поряд з нею можуть перебувати інші мікроорганізми.

Тема. Дезінфекція. Стерилізація. Тести: 1 — г,

2 — а, 3 — а, 4 — г, 5 — б.

Ситуаційні задачі: 1. Не можна стерилізувати таким методом рідини, гумові рукавички, вату. 2. Збудник сибірки утворює спору, за таких умов спори не гинуть. 3. Не можна, збудник туберкульозу за таких умов не гине. 4. Не можна, кип'ятіння є неповною стерилізацією.

Тема. Серологічний метод дослідження. Тести: 1 —

в, 2 — а, 3 — б, 4 — в, 5 — г.

Ситуаційні задачі: 1. а) реакція позитивна; б) реакція негативна; в) реакцію не враховують. 2. Особа хвора на черевний тиф. 3. Особа в даний період часу не хворіє на черевний тиф, низький титр антитіл може свідчити про те, що особа перехворіла або була щеплена. 4. 1:200.

Тема. Вакцини. Сироватки. Методи алергодіагностики. Тести: 1 — а, 2 —

г, 3 — в, 4 — в, 5 — а.

Ситуаційні задачі: 1. Відповідь знайти в інструкції до вакцини. 2. Ні. 3. Ні. 4. Знищити. 5. Протигрипозний імуноглобулін, який містить антитіла і швидко формує пасивний імунітет.

Модуль II: Спеціальна мікробіологія

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, викликаних патогенними роками.

Тести: 1 — г, 2 — б, 3 — а, 4 — г, 5 — в, 6 — а, 7 — а.

Ситуаційні задачі: 1. Негативну — через 1 добу, позитивну — через 4 доби. 2. Виділити культуру і визначити її фаговарі-ант. 3. Зволожений тампон, за температури 37—40 °С. 4. Для пригнічення сторонньої мікрофлори.

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених кишковими бактеріями.

Тести: 1 — б, 2 — б, 3 — а, 4 — г, 5 — а, 6 — б, 7 — в, 8 — б, 9 — а.

Ситуаційні задачі: 1. Безбарвні. 2. Достатньо. 3. Шигели, бактеріологічним методом. 4. Період реконвалесценції. 5. Період розпалу. 6. Бактеріоносійство.

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Тести: 1 — а, 2 — г, 3 — в, 4 — б, 5 — б, 6 — а, 7 — г.

Ситуаційні задачі: 1. Збудник сибірки, виділити чисту культуру і визначити біологічні властивості. 2. Вібріони, виділити чисту культуру і визначити антигенну структуру. 3. Еритроміцин, доксициклін, ципрофлоксацин та ін. 4. Ні, повторити реакцію з метою виявлення наростання титру антитіл. 5. Внутрішньошкірно бруцелін, за розміром діаметру інфільтрату.

Тема. Лабораторна діагностика і повітряно-краплинних інфекцій.

Тести: 1 — в, 2 — а, 3 — а, 4 — б, 5 — в, 6 — в.

Ситуаційні задачі: 1. Так. 2. Слабкою імунною відповіддю. 3. За наявності віражу туберкульозної проби ревакцинацію не проводять; дитину слід обстежити іншими методами. 4. Не можна, під час пастеризації збудник туберкульозу не гине.

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених облигатними анаеробами.

Тести: 1 — в, 2 — а, 3 — а, 4 — а, 5 — б, 6 — г, 7 — б, 8 — в, 9 — б.

Ситуаційні задачі: 1. Спірохети і фузобактерії. 2. В крові хворого неботулінічний екзотоксин. 3. Календар профілактичних щеплень, АКДП, АДП, правцевий анатоксин. 4. Серотерапію і антибіотикотерапію. 5. Достатньо.

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними спірохетами.

Тести: 1 — г, 2 — б, 3 — а, 4 — а, 5 — б, 6 — б, 7 — б.

Ситуаційні задачі: 1. Наявності перехресно реагуючих антигенів у блідої трепонеми і ліпідів серця великої рогатої худоби. 2. Реакція негативна. 3. Лептоспіроз. 4. Так. 5. Дослідити сироватку хворого у РІТ, РІФ, реакції ІФА.

Тема. Лабораторна діагностика хвороб, спричинених рикетсіями, хламідіями та мікоплазмами. Тести: 1 — б, 2 — а, 3 — а, 4 — а, 5 — в.

Ситуаційні задачі: 1. Ендемічний висипний тиф, використати серологічний метод дослідження. 2. У 8 раз, так.

Тема. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій.

Тести: 1 — б, 2 — б, 3 — в, 4 — г, 5 — а, 6 — б, 7 — в, 8 — г.

Ситуаційні задачі: 1. Провести реакцію нейтралізації специфічною сироваткою. 2. Ні, треба провести другий етап дослідження. 3. Скупчення дефектних вірусів, виявляють під час світлової мікроскопії, враховують під час діагностики.