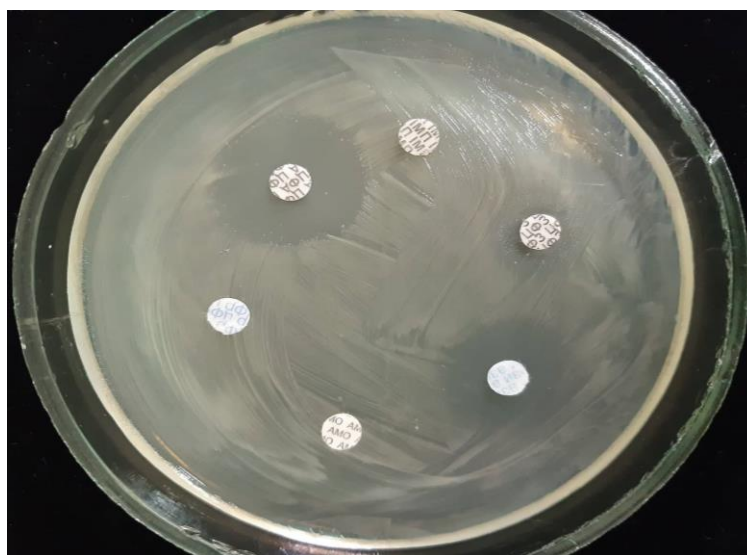


**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«Ужгородський національний університет»**

Кривцова М.В., Сікура А.О.

**Освітні та методичні аспекти
лабораторної діагностики біологічних систем**

Навчально-методичний посібник



Ужгород-2022

УДК 576.80.85(075.8)

Кривцова М.В., Сікура А.О. Освітні та методичні аспекти лабораторної діагностики біологічних систем. Навчально-методичний посібник. – Ужгород: пп Данило. 2022 – 54 с.

Навчально-методичний посібник містить сучасні та класичні методики лабораторної діагностики. Посібник висвітлює питання діагностики бактеріальних, вірусних та інвазійних захворювань та призначений для студентів біологічного та медичних факультетів III-IV рівнів акредитації, з предметів, що охоплюють методичні аспекти лабораторної діагностики.

Кривцова М.В. – доктор біологічних наук, професор кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології.

Сікура А.О. – старший викладач кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології.

Рецензенти:

д.мед.н. Мочалов Ю.О.

к.б.н., доц. Колесник А.В.

Рекомендовано до друку

Методичною комісією біологічного факультету

Протокол № 1 від 3 вересня 2022

Вченою радою біологічного факультету

Протокол № 1 від 6 вересня 2022

Підписано до друку 09.09.2022 р. Формат 60×90/16.
Папір друкарський. Друк різнографічний
Умовн. друк. арк.1,8
Наклад 100 прим.

Розтиражовано з готових оригінал-макетів
ПП Данило С.І.
м. Ужгород, пл. Ш.Петефі, 34/1
Тел.: 050 977 16 56

Діагностика бактеріальних захворювань

Лабораторна робота № 1

ТЕМА: ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ

Мета заняття: Ознайомити студентів з основними методами ідентифікації бактерій.

Завдання:

1. Ознайомити з основними принципами та підходами до ідентифікації бактерій.
2. Провести вивчення культуральних, тинкторіальних та біохімічних властивостей запропонованих видів бактерій.

Прилади та матеріали: Чашки Петрі з поживними середовищами: МПА, Сабуро, Ендо з ізольованими чистими культурами, лінійки, навчальні таблиці.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ідентифікація мікроорганізмів

Ідентифікація мікроорганізмів – це один із найважливіших етапів мікробіологічних досліджень, який включає вивчення сукупності багатьох ознак: морфології клітин, характеру росту на різних поживних середовищах, біохімічних властивостей та ін. з метою встановлення виду бактерій.

При ідентифікації бактерій беруть до уваги морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки бактерій, а у актиноміцетів зважають і на хімічний склад клітинної оболонки.

До морфологічних ознак належать: форма, розміри, взаємне розміщення клітин на площині, здатність до руху і характер розміщення джгутиків, здатність до утворення спор та розміщення їх у клітинах, наявність капсул і включень, фарбування за Грамом. В актиноміцетів до цих ознак відносять також утворення гіф, які галузяться.

Обов'язково використовують визначення токсикогенних властивостей збудників у біологічній пробі та реакції нейтралізації на лабораторних тваринах. У деяких випадках визначають антигенні властивості мікроорганізмів.

Ферментативні властивості

В життєдіяльності мікробів ферменти відіграють значну роль. Вони приймають участь у різних біохімічних реакціях, які покладені в основу живлення, дихання, розмноження. Ферменти поділяються на клітинні та позаклітинні в залежності від характеру зв'язку з цитоплазматичними структурами та від місця їх дії. Кожен вид мікробів продукує сталий для нього набір ферментів, одні з яких розкладають білки та вуглеводи, інші здійснюють окислення та відновлення різних субстратів. Стійкість ферментативних систем бактерій надає можливість використовувати біохімічні властивості бактерій разом з їх морфологічними, культуральними та іншими ознаками для визначення видів та типів бактерій.

Пігменти бактерій

Деякі види мікроорганізмів (бактерії, гриби) в процесі обміну речовин утворюють барвники – пігменти різних кольорів. Вони забарвлюються тільки при окисленні після проникнення в поживне середовище. Бактеріальні пігменти – червоний, жовтий та жовто-гарячий – відносять до групи ліпохромних сполук, які також містяться в квітках рослин, олії, жовтку яєць, кукурудзі. Цитохром – дихальний пігмент аеробних бактерій, який подібний до червоного пігменту еритроцитів у крові людини. По відношенню до розчинників розрізняють:

1) пігменти, розчинні у воді, які забарвлюють поживне середовище (наприклад, піоціанін, що продукує *Pseudomonas aeruginosa*);

2) пігменти, нерозчинні у воді та розчинні у спирті (наприклад, продигіозин – червоний пігмент *Serratia marcescens*);

3) пігменти, нерозчинні у воді та спирті. Зустрічаються дуже рідко.

4) пігменти утворюються тільки в присутності кисню та при певному складі поживних середовищ.

Пігменти бактерій належать до різних класів органічних сполук: каротиноїдів, піролів, азахінолів, феназинових барвників тощо. Наприклад, каротиноїди захищають клітину від видимого та ультрафіолетового світла. Порівняно з пігментованими непігментовані бактерії гинуть на світлі швидше. Пігменти бактерій є сполуками вторинного метаболізму, тобто вони не належать до речовин, які є у всіх організмів. Саме тому більшість пігментованих мікроорганізмів здатні продукувати антибіотичні сполуки. Деякі пігменти виявляють антибіотичні властивості, наприклад, продигіозин, піоціанін.

Протеолітичні властивості бактерій

Деякі мікроорганізми продукують протеолітичні ферменти – протеїнази, які каталізують розщеплення білків (рис. 1). Внаслідок розщеплення молекули білку утворюються пептони, альбумози, поліпептиди, амінокислоти. Для визначення протеолітичної активності мікроорганізмів культуру засівають на поживні середовища, до складу яких входить білок (желатина, сироватка коней, курячий білок, молоко, шматочки м'яса). Деякі види бактерій із значною протеолітичною активністю здатні розкладати білок та пептон до продуктів глибинного розпаду: індолу, сірководню, сечовини, аміаку. Вивчаються за допомогою індикаторних папірців, які поміщають під ватною пробкою пробірки із стовпчиком МПА.

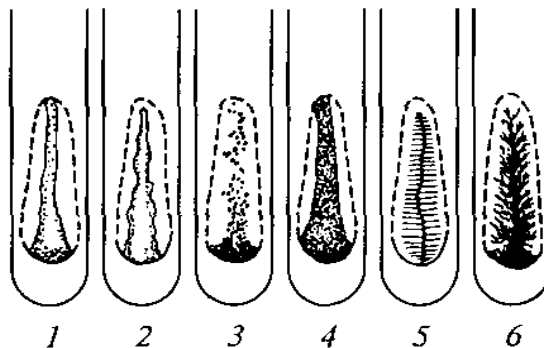


Рис. 1 Ріст бактерій у пробірках з желатиною:

1 – суцільний з рівним краєм; 2 – суцільний з хвилястим краєм; 3 – чоткоподібний; 4 – дифузний; 5 – пірчастий; 6 – ризоїдний

Цукролітичні ферменти бактерій

Здатність розкладати вуглеводи та багатоатомні спирти, які об'єднані до групи цукрів, притаманні багатьом патогенним бактеріям. Під дією цих ферментів цукри розкладаються на альдегіди та кислоти, які, в свою чергу, розкладаються до CO_2 та H_2O .

Для визначення цукролітичних ферментів культуру бактерій засівають в поживні середовища Гісса, які називають також строкатим рядом. Малий строкатий ряд Гісса представляє собою рідкі, напіврідкі або щільні поживні середовища, які містять 1%-ий цукор (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маніт), та індикатор, який змінює своє забарвлення в результаті розщеплення цукрів. Назва “строкатий” пов'язана з тим, що під дією ферментів одні вуглеводи залишаються незмінними і, таким чином, колір середовища не змінюється, в той час як інші цукри розкладаються з утворенням кислих

продуктів, які і викликають зміну забарвлення поживного середовища. В пробірці з рідкими цукрами вкладають так звані поплавки (невеликі трубочки з запаєним кінцем), які заповнюються газами при розкладі цукрів.

За здатністю зброджувати лактозу культури бактерій можна поділити на лактозопозитивні та лактозонегативні. Так, на середовищі Ендо лактозопозитивні штами мають малинове забарвлення, а лактозонегативні – слабо рожеве. На середовищі Левіна лактозопозитивні штами мають чорно-фіолетове, а лактозонегативні – рожеве забарвлення.

Гемолітичні властивості

Це здатність певних культур бактерій викликати гемоліз – розщеплення еритроцитів (рис. 2). Вивчають гемолітичні властивості на кров'яному агарі. Розрізняють α - та β -гемоліз. α -гемоліз виявляється як зеленуватий віночок навколо колонії (часткове руйнування еритроцитів); β -гемоліз – прозорий віночок (повне руйнування еритроцитів).



*Рис.2 Гемоліз навколо колоній *Streptococcus pyogenes* на кров'яному агарі*

Ліполітичні властивості

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

Редукуючі властивості

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

За останні роки в практиці мікробіологічних лабораторій почали використовувати спеціальні комерційні тест-системи для визначення різноманітних властивостей бактерій, виготовлені на основі різноманітних диференційно-діагностичних середовищ (рис. 3). В одному варіанті виконання вони вносяться в спеціальні полістиролові або інші планшети та висушуються для видалення води. До них належать системи «Roche», «API-20» для ідентифікації стафілококів, ентеробактерій, коринебактерій, анаеробних мікробів, «Enterotest», російська система ПБД (пластина біохімічна диференційна) для ідентифікації ентеробактерій. Інші варіанти подібних тест-систем передбачають адсорбцію диференціюючих субстратів на паперових або полімерних носіях. Серед них розповсюджені системи Auxtab, Minitex, Morlok, Micro-ID. Вони зручні для користування, надійні, дозволяють визначити 12-20 і більше різноманітних ознак, вимагають невеликих об'ємів посівного матеріалу, тому економлять лабораторний посуд, піпетки. Комп'ютерна обробка одержаних результатів дає змогу швидко визначити й оцінити вид невідомого мікроорганізму.

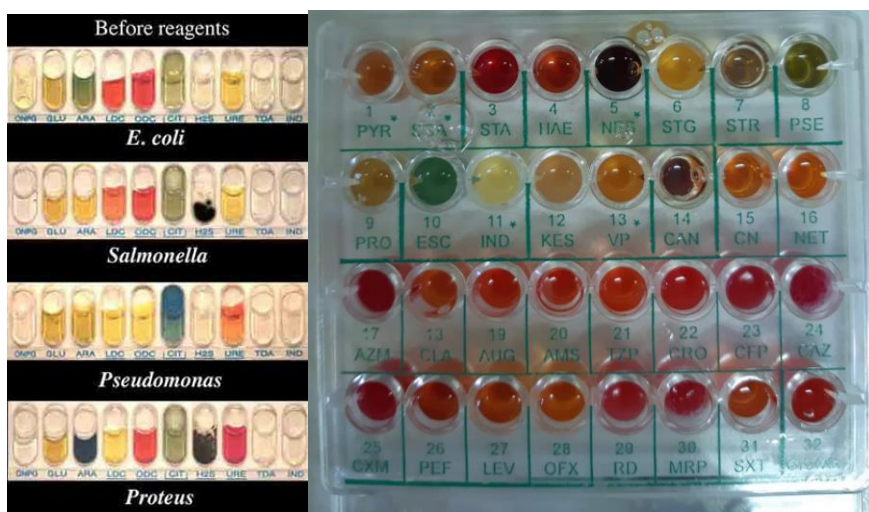


Рис. 3 Вивчення біохімічних властивостей бактерій за допомогою тест-систем

Токсини мікроорганізмів

Певні види патогенних мікроорганізмів здатні утворювати особливі отруйні речовини, які отримали назву токсини. Значення токсинів в інфекційному процесі особливо велике, так як при зараженні токсигенними мікробами клінічна картина хвороби визначається реакцією – відповідь макроорганізму на дію екзотоксину. Токсини, що продукуються мікробами в оточуюче середовище, називаються екзотоксинами або справжніми токсинами. Під час знаходження збудника в осередку проникнення екзотоксин розповсюджується по організму (наприклад, токсин дифтерії, скарлатини, тощо). При посіві токсигенних бактерій у рідкі поживні середовища екзотоксин здатний накопичуватися в середовищі.

Іноді токсини зв'язані з протоплазмою бактеріальної клітини, тоді вони звільняються тільки при руйнуванні клітинної структури бактерій. Такі токсини отримали назву ендотоксинів. Ендотоксини отримують шляхом руйнування клітини під впливом хімічних або фізичних факторів, внаслідок чого відбувається звільнення ендотоксинів з протоплазми.

Ступінь отруйності токсинів визначають мінімальною летальною дозою D_{1m} (*Dosis letalis minima*), яка здатна вбити піддослідну тварину. Вивчення дії токсину та його специфічність проводять в лабораторії - досліди *in vitro* (в пробірках) та *in vivo* (на тваринах).

Антигенні властивості бактерій у серологічній ідентифікації

Кожний мікроорганізм має у своєму складі різні антигенні субстанції. Зокрема, представники родини ентеробактерій (ешерихії, сальмонели, шигели) містять оболонковий O-антиген, джугутиковий H-антиген і капсульний K-антиген. Вони неоднорідні за своїм хімічним складом, тому існують у багатьох варіантах. Їх можна визначити за допомогою специфічних аглютинуючих сироваток. Таке визначення бактерій називається серологічною ідентифікацією. Найчастіше використовується орієнтовна реакція аглютинації на склі. З цією метою на предметне скельце наносять різні діагностичні сироватки, а потім у кожен краплю вносять стерильною петлею невелику кількість чистої культури. За декілька хвилин спостерігають за реакцією аглютинації. Утворення аглютинату (пластівців) свідчить про гомологічність антигенів збудника до антитіл діагностичної сироватки, що дозволяє визначити вид інфекційного агента.

Молекулярно-генетичні методи виявлення та ідентифікації мікроорганізмів

1. Реакція гібридизації ДНК і РНК (реакція генних зондів). Будь-яку ділянку нуклеїнової кислоти можна визначити за допомогою комплементарної копії ДНК чи РНК, міченої ферментом або радіоактивною міткою (ДНК- і РНК-зонди). За їх допомогою проводять ідентифікацію ДНК або РНК збудників бактеріальних і вірусних інфекцій у клінічному матеріалі. Реакція молекулярної гібридизації є дуже чутливою і високоспецифічною. Вона дає змогу виявити ДНК або РНК в дуже малих кількостях.

Методика реакції генних зондів зводиться до того, що виділені з патологічного матеріалу ДНК або РНК збудників денатурують і наносять на спеціальні мембрани з нітроцелюлози. Після цього вносять ДНК- або РНК-зонди, витримують певний час, роблять багаторазову промивку, щоб видалити реагенти, що не прореагували. У випадку, коли зонд мічений ферментом (наприклад, пероксидазою), то до такого зонда додають субстрат (наприклад, ортофенілдіамін). Ферментація субстрату призводить до зміни кольору, який можна спостерігати неозброєним оком.

2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – один із найновіших методів виявлення та ідентифікації бактерій і вірусів у досліджуваному матеріалі. Принцип реакції базується на багаточисельному копіюванні (селективній ампліфікації) досліджуваної ДНК ферментом ДНК-полімеразою. Утворення копії ДНК ідентифікують за допомогою методу електрофорезу.

Реакцію проводять у три етапи. На першому етапі при температурі 95°C проходить денатурація двониткової молекули ДНК, її розплетення і розходження ниток.

На другому етапі (ренатурація) відбувається гібридизація праймерів, тобто утворення дволанцюгових комплексів праймерів-матриці, які необхідні для ініціації синтезу ДНК. Температура суміші при цьому знижується до 55°C.

На етапі синтезу (75°C) проходить подовження комплементарних ниток ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Проводять 15-35 циклів синтезу. Багаторазове повторення призводить до збагачення ДНК у досліджуваному матеріалі.

Метод ПЛР дуже чутливий. Доцільно використовувати ПЛР у тих випадках, коли бактерії чи віруси мають високу мінливість і знаходяться у досліджуваному матеріалі в малій кількості. Тривалість дослідження становить 2-3 години. Особливо доцільно використовувати цей метод при визначенні та ідентифікації збудників туберкульозу, сифілісу, гонореї, мікоплазми, вірусів СНІДу, герпесу, гепатитів, рота- та ентеровірусів.

Після встановлення морфологічних, культуральних і фізіологічних ознак, переходять до визначення виду бактерій. Визначення виду проводиться за визначником Н. А. Красильникова або Берджі.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1. Провести вивчення морфологічних, культуральних та біохімічних властивостей бактерій (*S. aureus*, *E. coli*).

Завдання 2. Визначити цукролітичні властивості культури *S. aureus* за допомогою строкатого ряду Гісса.

Пробірки з набором цукрів ставлять в штатив, культуру засівають петлею в невеликій кількості та інкубують в термостаті 18-24 години. Якщо бактерії ферментують вуглеводи, спостерігають появу червоного забарвлення середовища, яке свідчить про зміну рН у кислоту сторону (утворення кислоти). Літерою “К” позначають зміну кольору поживного середовища, розкладання цукрів з утворенням кислоти та газу позначають двома літерами – “КГ”.

Завдання 3. Провести визначення індолу.

Визначення індолу по Морелю

Індол утворюється при розкладі триптофану. Для виявлення індолоутворення пробірки з м'ясо-пептонним бульйоном засівають культурою мікроорганізмів і за допомогою корка закріплюють індикаторний папірець, один кінець якого знаходиться в середині пробірки. Посіви інкубують 18-24 години в термостаті, утворення індолу супроводжується забарвленням зануреного краю папірця в рожевий колір. Індикаторний папірець готують шляхом просочування фільтрувального паперу розчином щавлевої кислоти.

Визначення індолу методом Ерліха

Цей метод є досить чутливий. Згідно із загальноприйнятим методом пробкою пробірки притискають папірець, просякнутий спеціальним індикатором (спиртовий розчин парадиметиламідобензалальдегіду). При наявності індолу колір його змінюється на бузково-рожевий або малиновий. В іншому варіанті визначення індолу до 48-годинної бульйонної культури бактерій додають 1-2 мл сірчаного ефіру, а потім – реактив Ерліха. У нижній частині шару ефіру за 1-2 хв з'являється яскраве малинове кільце.

Завдання 4. Провести визначення сірководню.

Сірководень є кінцевим продуктом розкладу амінокислот: цистина, цистеїна, метіоніна, які містять сірку. Пробірки з МПБ засівають культурою, вносять промочену оцтовокислим свинцем смужку індикаторного паперу.

В позитивних випадках індикатор забарвлюється в чорно-бурий колір внаслідок перетворення оцтовокислого свинцю в сірчаноокислий. Визначення сірководню та індолу проводять одночасно (в одній і тій самій пробірці).

Завдання 5. Провести визначення гемолітичної активності бактерій.

В якості демонстрації гемолітичних властивостей бактерій використовують поживне середовище, яке містить 5,0% крові (кров'яний агар). На поверхню середовища за допомогою бактеріальної петлі методом штриха сіють гемолітичні стрептококи. Дія гемотоксину визначається зоною гемолізу – просвітління на матовому червоному фоні (еритроцити під дією токсину руйнуються) навколо колоній гемолітичних бактерій. За кольором гемолізу (безбарвний, зеленкуватий) можна визначити тип гемолізинів (α , β , γ , тощо).

Завдання 6. Ознайомитись з пігментами бактерій (демонстрація).

Для демонстрації використовують культури бактерій і мікроскопічних грибів, здатних до пігментоутворення, а саме:

- *Serratia marcescens* – червоний пігмент;
- *Pseudomonas aeruginosa* – зелений пігмент;
- *Sarcina flava* – жовтий;
- *Staphylococcus aureus* – золотистий;
- *Staphylococcus album* – білий;
- *Aspergillus niger* – чорний;
- *Saccharomyces cerevisiae* – рожевий.

Завдання 7. Визначити протеолітичну активність мікробів на желатині.

Для визначення протеолітичних властивостей бактерій виконують посів уколом в стовпчик з желатиною (рис. 4). Спосіб розкладання желатини як і характер росту на рідкому середовищі є видовою ознакою бактерій. Так, холерний вібріон розщеплює желатину в формі цвяха, стафілокок – у вигляді панчохи, синьогнійна паличка –

пошарово тощо. Виконані посіви уколом в стовпчик з желатиною досліджуваних бактеріальних культур слід залишити на декілька діб при кімнатній температурі. Облік посівів виконати на наступному занятті.

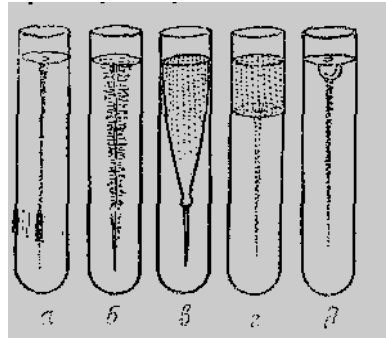


Рис. 4 Культура бактерій уколом в желатину:
a – Streptococcus pyogenes, б – Bacillus anthracis, в – Staphylococcus aureus, г – Proteus vulgaris, д – Vibrio cholerae.

Завдання 8. Вивчення амілолітичної активності бактерій.

Здатність бактерій виділяти фермент амілазу, що ферментує крохмаль, визначається шляхом посіву бактерій в чашки Петрі на звичайний м'ясо-пептонний агар, змішаний перед охолодженням у чашках із стерильним крохмальним клейстером. Можна використати крохмально-аміачне середовище. Стерильне, охоложене до 50°C крохмально-аміачне середовище розлити в чашки Петрі. Поділити їх на сектори і пронумерувати. Після застигання агару культури *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Sarcina flava* посіяти у відповідний сектор чашки радіальними штрихами. Чашки інкубувати в термостаті при температурі 30°C. Через 4-7 діб перевірити, чи здатні досліджувані культури мікроорганізмів розщеплювати крохмаль. Для цього поверхню агару заливають розчином Люголя. Культури бактерій, що утворюють амілазу, ферментують крохмаль до мальтози, тому у разі повного розщеплення крохмалю до глюкози, навколо зон росту агар не забарвлюється (не синіє). Якщо крохмаль розщеплений до декстринів, то навколо зон росту мікроорганізмів агар забарвлюється в червоний колір. Посиніння агару (реакція крохмалю з йодом) свідчить про відсутність діастазу (амілолітичної активності) у бактерій.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Що таке ідентифікація бактерій?
2. Які ознаки беруть до уваги при ідентифікації бактерій?
3. Які етапи ідентифікації Ви знаєте?
4. Наведіть приклади біохімічних ознак бактерій.
5. Які молекулярно-генетичні методи ідентифікації бактерій використовують у практиці.
6. Які правила ідентифікації за визначником Берджі?
7. Які ферменти приймають участь у біохімічних процесах, що відбуваються в бактеріальних клітинах?
8. Методи визначення цукролітичних ферментів. Наведіть приклади.
9. Які поживні середовища використовують з метою визначення рівня ферментативної активності бактерій?
10. Які цукри складають "строкатий ряд Гісса"?
11. Чому поживні середовища Гісса отримали назву "строкатий ряд"?
12. Як позначають кінцеві продукти розщеплення цукрів?

13. Методи визначення протеолітичних ферментів бактерій. Наведіть приклади протеолітичних ферментів.
14. До яких сполук розкладають бактерії білки та пептони за допомогою протеолітичних ферментів?
15. Охарактеризуйте метод визначення індолу по Морелю.
16. Яким методом визначають наявність сірководню в продуктах розкладу білку?
17. Дайте характеристику пігментів бактерій. Наведіть приклади.
18. Що означає вираз “продукти вторинного метаболізму”?
19. Які бактерії утворюють червоний пігмент? Які жовтий, зелений, золотистий?
20. Які токсичні субстанції продукують патогенні бактерії?
21. Які токсини відносять до групи екзотоксинів?
22. Які токсини відносять до групи ендотоксинів?
23. Охарактеризуйте метод визначення гемолітичної активності бактерій?
24. Як визначають токсичну дію в досліджах *in vitro* та *in vivo*?
25. Які пігменти бактерій виявляють антибіотичні властивості?
26. Які сполуки метаболітичної активності бактерій відносять до анатоксинів? Наведіть приклади.

Лабораторна робота № 2

ТЕМА: ВИВЧЕННЯ СХЕМИ ЛАБОРАТОРНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЇ СТАФІЛОКОКА

Мета заняття: Ознайомити студентів із схемою лабораторного дослідження з метою виявлення й ідентифікації стафілокока

Завдання:

1. Вивчити схему взяття патологічного матеріалу для дослідження та проведення первинного посіву матеріалу на поживні середовища
2. Вивчити схему виділення та ідентифікації стафілококів.

Прилади та матеріали: поживні середовища (ЖСА, КА, СА, цукровий бульйон — у пробірках і флаконі), тампони для зівя, шпатель для зівя, бікс, серветка з адсорбтивного матеріалу, шпатель для посіву, спиртівка, сірники, маркер, штативи, ріст культури стафілокока на КА і ЖСА, плазмі, середовищі з манітом, пластинчастому середовищі

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вперше стафілококи були виділені з гною хворого з абсцесом кінцівки у 1880 р шотландський хірург О.Огстон. Саме О.Огстон вперше їх описав і назвав «стафілококи» (від грецького *staphyle* – грона, *kokkos* - ягода) (рис.1). У 1884 році ці бактерії детально описав О.Розенбах. Таксономічне положення стафілококів за показником Берджі 2004 р є таким: *Domain – Bacteria, Phylum – Firmicutes, Class – Bacilli, Order – Bacillales, Family – Staphylococcaceae, Genus – Staphylococcus*.

До роду *Staphylococcus* на сьогодні відносять 49 видів і 27 підвидів мікроорганізмів. Приблизно 14 видів стафілококів виявлено на шкірі та слизових людини та теплокровних тварин. Так *S. aureus* колонізує слизову носоглотки, *S. capitis* виділяють з сальних залоз, *S. hominis* та *S. haemolyticus* виявляють у 7 ділянках розташування потових залоз, *S. saprophyticus* часто виділяють з сечостатевої системи, *S. epidermidis* є колонізатором шкіри та слизових. Стафілококи є представниками нормофлори людини. Стафілококи відносять до умовно-патогенних мікроорганізмів. Ці бактерії мають

великий набір факторів патогенності і, отже, за умов зниження загально-біологічної резистентності макроорганізму чи за умов попадання у стерильні тканини, можуть викликати розвиток патологічних процесів. Інфекційні процеси, індуковані умовнопатогенними мікроорганізмами, в тому числі і стафілококами, називають опортуністичними. Запальні процеси, які опосередковані стафілококами, супроводжуються утворення гною, тому ці бактерії ще відносять до гноєтворних піогенних коків (до цієї категорії також відносять стрептококи, гонококи, менінгококи). Серед усіх видів стафілококів саме *S. aureus* характеризується найбільш вираженим патогенним потенціалом. Тому ідентифікація цього мікроорганізму та визначення його патогенного потенціалу є однією з важливих задач лабораторної діагностики. За рахунок експресії певних молекул адгезії (MSCRAMM) *S. aureus* колонізує слизову верхніх дихальних шляхів. За даними різних джерел від 20% до 80% людей є носіями даного мікроорганізму. Стафілококи не мають вираженої тканинної чи органної тропності і тому можуть індукувати запальні процеси шкіри, підшкірної клітковини, слизових (фурункули, карбункули, абсцеси, дерматити, кон'юнктивіти), кісткової тканини (остеомієліти), внутрішніх органів (пневмонії, апендицити, холецистити, менінгіти), запалення очеревини, а також сепсис. Матеріалом для дослідження при лабораторній діагностиці стафілококової інфекції є кров, гній, виділення слизових, промивні води шлунку, сеча, фекалії, продукти харчування. З метою отримання чистої культури стафілококу досліджуваній матеріал висівають на відповідне елективне поживне середовище. Вивчення виділеної монокультури має на меті, перш за все, встановлення видової належності стафілококів з наступним визначенням їх факторів патогенності.

Стафілококи є представниками нормофлори шкіри і слизових людини і теплокровних тварин. Ці бактерії відносять до категорії умовно-патогенних мікроорганізмів, оскільки за певних умов стафілококи можуть індукувати розвиток певних патологічних станів людини. Стафілококи не мають вираженої органної тропності і тому вони можуть викликати гнійні ураження будь-яких органів і тканин. Подібні патологічні стани людини також можуть індукувати і багато інших умовно-патогенних представників нормобіоти. Тому при розвитку таких патологій постає питання власне ідентифікації збудника, визначення його патогенного потенціалу та чутливості до антибіотикотерапії.

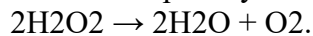
Отже, основною метою даного методичного керівництва є представити поетапну схему дослідження клінічного матеріалу з метою біохімічної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus* з наступною характеристикою факторів патогенності та антибіотикочутливості виділених бактерій.

Алгоритм представленого дослідження полягає в тому, що на першому етапі відбувається посів біологічного матеріалу на елективні для бактерій роду *Staphylococcus* поживні середовища з подальшим виділенням чистої культури мікроорганізмів. Після отримання чистої культури мікроорганізмів проводять бактеріоскопічне дослідження мікроорганізмів, зафарбованих за Грамом. Далі здійснюють посіви чистої культури на диференційно-діагностичні середовища з метою біохімічної ідентифікації бактерій до виду. Особлива увага приділяється тим реакціям, які в біохімічному відношенні дозволяють віддиференціювати стафілококів від тих близькородинних видів мікроорганізмів, представників нормофлори, з якими стафілококи можна легко переплутати, наприклад, бактерій родів *Micrococcus* та *Streptococcus*. На сучасному етапі розвитку науки та лабораторної діагностики експресію ферментів в мікроорганізмах часто визначають на генетичному рівні, методом полімеразної ланцюгової реакції. Проте, посів культури на диференційно-діагностичні поживні середовища дозволяє оцінити безпосередню активність ферментів бактерій. На останньому етапі дослідження проводять визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів виділених штамів.

Стафілококи представляють собою клітини сферичної форми діаметром 0,5- 1,5 мкм. Оскільки поділ клітин відбувається у трьох взаємно перпендикулярних площинах, взаємне розташування клітин у мазках нагадує грона винограду. У зразках клінічного матеріалу стафілококи можуть розташовуватись у вигляді окремих клітин, парами клітин або коротенькими ланцюжками. Стафілококи нерухливі і не утворюють спор. Клітинна стінка багатьох стафілококів вкрита полісахаридною капсулою. У *S.aureus* навіть ідентифіковані різні серотипи антигенів капсули. Так, мікроорганізми серотипів 1 і 2 мають товстий капсулярний шар і утворюють слизисті колонії. Мікроорганізми, що відносяться до цих серотипів зрідка викликають захворювання у людей. Проте, мікроорганізми-носії серотипів 5 та 8 мають високий патогенний потенціал і часто індукують розвиток патологічних станів людини. Капсула, як відомо, захищає бактерій від фагоцитозу клітинами природної ланки імунітету. Крім того, більшість стафілококів продукують речовину слизистого шару (slime layer or biofilm), що містить моносахариди, білки, невеликі пептиди. Ця речовина може бути утворена в різних кількостях за потребою. Речовина слизистого шару дозволяє адгезувати бактеріям до клітин тканин хазяїна або до інертних речовин клапанів, катетерів, шунтів. Крім того, ця речовина є особливо важливою для виживання авірулентних коагулазо-негативних стафілококів. Стафілококи мають клітинну стінку з багатошаровим вмістом пептидоглікану товщиною 70-80 нм., тому за Грамом ці бактерії фарбуються позитивно. Пептидоглікан представляє собою полімер глікану, додатково «зшитий» олігопептидами. Гліканова частина полімеру побудована з залишків N- 12 ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти, які чергуються. Олігопептидні субодиниці з одного боку приєднані до залишків N-ацетилмурамової кислоти. З іншого боку у *S. aureus* ці залишки взаємодіють через так званий пентагліциновий місток (gly5), який дещо подовжує цей зв'язок. Важливим компонентом клітинних стінок грам-позитивних бактерій є тейхоєві кислоти (ТК). Тейхоєві кислоти є видоспецифічними фосфатовмісними полімерами, що можуть бути ковалентно зв'язані з залишками N-ацетилмурамової кислоти шару пептидоглікану або з ліпідами цитоплазматичної мембрани (в останньому випадку їх називають ліпотейхоєвими кислотами (ЛТК)). У *S. aureus* полімери ТК містять рибітфосфат і тому є рибіттейхоєвими кислотами. У *S. epidermidis* ТК містять гліцеролфосфати і є гліцеролтейхоєвими кислотами. У *S. saprophyticus* виділяють обидва типи ТК. Стафілококи – факультативні анаероби, краще ростуть в присутності кисню, проте легко витримують і його відсутність. Ці мікроорганізми активно ростуть на середовищах загального призначення. На щільних поживних середовищах вони утворюють округлі, дрібні, непрозорі, гладенькі колонії з рівними краями діаметром 1-4 мм вже через 24 години культивування. При культивуванні в аеробних умовах на щільних поживних середовищах з вмістом крові, молока, картоплі чи вуглеводів стафілококи утворюють каротиноїдні пігменти. Колір пігментів може бути різний від кремового до жовтого. Як правило, виражений «золотистий» колір спостерігають у колоній *S. aureus*, звідки і походить назва цього виду стафілококів. У різних штамів одного і того ж виду стафілококів колір пігменту може дещо відрізнятись. Тому пігментоутворення не є диференційною (видовою) ознакою. У анаеробних умовах чи при рості у рідкому поживному середовищі стафілококи не утворюють пігмент. У м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) стафілококи ростуть з рівномірним помутнінням середовища з наступним випадінням незначного осаду. Через 2-3 добу росту на поверхні рідкого поживного середовища утворюється плівка і пристінкове кільце. Стафілококи можуть рости при температурі від +180С до +400С, проте температурним оптимумом росту є діапазон температур - 25-35°С. Стафілококи добре витримують підвищений осмотичний тиск, тому селективним поживним середовищем для них можуть бути 13 такі, що мають збільшений вміст NaCl (до 15%). Таку високу концентрацію солі інші представники

мікрофлори не витримують, внаслідок чого сольові середовища (МСА, ЖСА) є елективними для стафілококів. Вивчення виділеної чистої культури має на меті, перш за все, диференціювання виду стафілокока з високим патогенним потенціалом (як правило, це *S. aureus*) від сапрофітних видів, які внаслідок їх великої поширеності можуть також бути присутні у досліджуваному матеріалі.

Ідентифікація стафілококів за біохімічними ознаками полягає у дослідженні активності певних ферментів, що дозволяє впевнитись у належності мікроорганізмів до роду *Staphylococcus* та далі ідентифікувати стафілококи до виду. Виявлення каталазної активності дозволяє диференціювати стафілококи від стрептококів та ентерококів. Стафілококи є каталаза-позитивними, а от стрептококи та ентерококи є каталаза-негативними, (проте, треба пам'ятати, що мікрококи є також каталаза-позитивними (табл.1)). (Каталаза (від грецьк. *katalysis* – руйнування) – фермент, що сприяє розщепленню перекису водню на воду та молекулярний кисень.



Сутність тесту полягає у тому, що з перших секунд контакту перекису водню з каталазою мікроорганізмів починається його розщеплення, яке супроводжується вивільненням пухирців кисню.

Стафілококи (так само і стрептококи) є оксидазонегативними, проте мікрококи є оксидазопозитивними. Саме тест на активність оксидази дозволяє віддиференціювати стафілококи від мікрококів.

Таблиця

Біохімічні тести належності мікроорганізмів до певних родів

Ферментативні властивості	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Ріст в анаеробних умовах	+	-	+
Утилізація вуглеводів	ферментація	окиснення	ферментація
Каталазна активність	+	+	-
Оксидазна активність	-	+	-

Стафілококи є хемоорганотрофами з окислювальним та бродильним типами метаболізму. Вони утилізують вуглеводи в аеробних та анаеробних умовах. Диференційно-діагностичне значення має тест на здатність стафілококів розщеплювати глюкозу і маніт у анаеробних умовах. Стафілококи, на відміну від мікрококів, мають властивість розщеплювати глюкозу в анаеробних умовах. Здатністю до розщеплення маніту в анаеробних умовах серед різних видів стафілококів більше характеризується *S. aureus*.

Внутрішньородова ідентифікація стафілококів має на меті визначити вид стафілококів та їх патогенний потенціал з метою грамотного підбору стратегії лікування та прогнозу захворювання.

Надзвичайно потужними факторами патогенності стафілококів є їх ферменти і токсини. Серед ферментів найбільш вивченими є: плазмокоагулаза, фібринолізин, лецитиназа, гіалуронідаза, желатиназа, протеази, ліпази, ендонуклеази, естерази, фосфатаза, лізоцим.

Наявність коагулази, активність якої призводить до згортання плазми крові, є важливою ознакою *S. aureus*. Проте, показано, що такі види стафілококів як *S. intermedius* та *S. hyicus* також здатні до утворення цього ферменту. Стафілококи здатні до продукції двох типів коагулази: вільної і зв'язаної з поверхнею клітини (clumping factor, фактор згортання). Існують різні методи визначення активності різних типів коагулази.

Фермент коагулаза сприяє перетворенню розчинного білка плазми крові фібриногену у нерозчинний фібрин і є надзвичайно важливим фактором патогенності, оскільки забезпечує захист мікроорганізму від імунної системи. Стафілококи, що мають цей фермент, вкриваються фібриновим «чохлом», який захищає мікроорганізми від розпізнавання і фагоцитозу. Цей фермент має важливе діагностичне значення (рис 4). За наявністю цього фактору стафілококи поділяють на коагулазопозитивні (*S. aureus*) та коагулазонегативні (інші види) (CoNS – coagulase-negative staphylococci). На основі розбіжностей за антигенним складом виділяють 10 сероваріантів коагулазопозитивних стафілококів.

Великі концентрації секретованої коагулази у сироватці крові призводять до зниження рівня згортання плазми крові, порушення гемодинаміки, кисневого голодування тканин, що прогресує.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1. Проведіть взяття слизу із зів'язки 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 зів'язки (інколи роблять змиви з рук або відбирають кал).

Взяття матеріалу з носа і зів'язки 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'язка".

Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на ЖСА, К А і цукровий бульйон:

- поділіть маркером дно чашки із середовищами ЖСА і КА на 2 частини по діаметру;
- підпишіть чашки для посіву, 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
- 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 2. Вивчіть схему виділення й ідентифікації стафілококів.

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

II 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.

III 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.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Які види стафілококів ви знаєте?
2. Чому стафілококи відносять до умовно-патогенних мікроорганізмів?
3. Яке середовище є елективним для виділення стафілококів і чому?
4. Як виглядає прояв лецитиназної активності стафілококів на ЖСА?
5. З яких екологічних ніш частіше виділяють *S. aureus*?

Лабораторна робота №3

ТЕМА: ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХВОРОБ, СПРИЧИНЕНИХ КИШКОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Мета заняття: навчитися проводити взяття патологічного матеріалу для дослідження та проводити первинний посів матеріалу на поживні середовища; знати препарати для специфічного лікування та профілактики хвороб, спричинених кишковими бактеріями.

Завдання:

1. Ознайомитися з методами взяття фекалій на бактеріологічне дослідження.
2. Провести посів фекалій на середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар.
3. Описати культуральні властивості ентеро-бактерій на різних середовищах.

Прилади та матеріали: поживні середовища виготовлені та з ростом культури ешерихій і сальмонел, поживні середовища Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар, Ресселя, Гісса, МПБ з індикаторними папірцями, ізотонічний розчин натрію хлориду у флаконі, стерильна баночка з дерев'яною паличкою (для демонстрації), стерильні баночки з розведеними фекаліями у відношенні 1:10, бактеріологічні петлі, шпателі для посіву, пінцети, маркер, сірники, спиртівки

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Enterobacteriaceae (іноді перекладається як Ентеробактерії) — велика родина бактерій, що включає відомі патогени як-от *Salmonella*, *Escherichia coli* (кишечна паличка), *Yersinia pestis* (чумна паличка) тощо.

Класифікація та номенклатура ентеробактерій згідно “Визначника бактерій Бергі” родина *Enterobacteriaceae* належить до Групи 5 - факультативно-анаеробних грамнегативних паличок. Вона представлена великою групою грамнегативних паличок розмірами 0,3-6,0 мкм, рухомих перитрихів або нерухомих, які утворюють або не утворюють капсули. Ендоспори не утворюють, кислотонестійкі. Аероби або факультативні анаероби. Ростуть на звичайних пептонних та м'ясних поживних середовищах; механізм метаболізму - дихальний та ферментативний. Утворюють кислоту при ферментації глюкози, ферментують інші вуглеводи і спирти з утворенням газу або без газоутворення. Каталазопозитивні за винятком одного серовару шигел (*S. dysenteriae* I); оксидазопозитивні. Відновлюють нітрити в нітрати, за винятком деяких штамів *Erwinia* і *Yersinia*. Родина *Enterobacteriaceae* поділяється на групи, роди, види. Роди об'єднані в групи на підставі гомології ДНК. До групи I (*Escherichiae*) віднесено роди *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*; до групи II (*Klebsiellae*) - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*; до групи III (*Proteeae*) - *Proteus*, *Providencia* і *Morganella*; до групи IV (*Yersinieae*) - *Yersinia*; до групи V (*Erwinieae*) - *Erwinia*. Виділяють додаткові роди, які поки що не знайшли свого чіткого місця в таксономічній схемі: *Obesumbacterium*, *Xenorhabdus*, *Kluuyvera*, *Rahnella*, *Cedecae*, *Tatumella*.

За формою представники родини — паличкоподібні, довжиною 1—5 мікрон. Як і інші протеобактерії (*Proteobacteria*), вони грам-негативні.

Представники родини — факультативні анаероби, здатні зброджувати глюкозу з утворенням молочної кислоти та інших кінцевих продуктів. Більшість має джгутики, що використовуються для пересування. Не утворюють спор.

Безліч представників родини є частиною нормальної мікрофлори кишечника і можуть бути знайдені в кишечниках людей та багатьох інших тварин, тоді як інші мешкають в

грунті, воді або паразитують на різних рослинах і тваринах. Більшість симбіотичних зокрема паразитичних видів родини використовують численні ворсинки I типу для адгезії до клітин хазяїна.

Найкраще досліджена бактерія *Escherichia coli* (кишкова паличка) — найважливіший модельний організм не тільки цієї родини, але й всього домену бактерій, їх генетики, біохімії і клітинної біології.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

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 посів фекалій на середовища Ендо, Плоскирєва, 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. Ентеробактерії 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. Чашки з посівами ставлять у термостат за температури 37 °С.

Завдання 3. Опишіть культуральні властивості ентеро-бактерій на середовищах Ендо, Плоскирєва, вісмут-сульфіт агарі, Ресселя, Гісса,

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 культурі 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 цукролітичні 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.

Завдання 4. 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* (О- і Н-) і *S. paratyphi* А і В (ОН-). Збудником хвороби вважають той мікроорганізм, діагностикум з якого дає позитивну реакцію аглютинації з сироваткою крові хворого. Збудники черевного тифу і паратифів А і В мають спільні групові антигени, тому їх діагностикумами 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

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 діагностикумом негативна;
- 2) позитивна РА — реакція з діагностикумом 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 бактеріоносійства зростає титр IgG.

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? Як проводять первинний посів відібраного матеріалу?
4. За якими ознаками проводять первинну ідентифікацію ентеробактерій?
5. Які середовища використовують для вивчення ферментативної активності ентеробактерій?
6. Які визначення слід провести для остаточної ідентифікації культури?
7. Які серологічні реакції використовують для діагностики сальмонельозу? Як відрізнити реакцію аглютинації у хворого від щеплювальної або анамнестичної?
8. Яку серологічну реакцію використовують для виявлення хронічних носіїв інфекції?

Діагностика вірусних захворювань

Лабораторна робота № 4

ТЕМА: МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ: МІКРОСКОПІЧНІ ТА СЕРОЛОГІЧНІ

Мета заняття: ознайомитись із мікроскопічним та серологічними методами досліджень.

Завдання:

1. Ознайомитись із мікроскопічними методами діагностики вірусних захворювань.
2. Ознайомитись із серологічними методами діагностики вірусних захворювань.
3. Ознайомитись із методами імуноферментного аналізу.
4. Навчитись проводити постановку реакції гемаглютинації.

Прилади та матеріали: матеріал, який містить вірус, еритроцити, ізотонічний розчин хлориду натрію, піпетки, пробірки.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікроскопічні методи діагностики вірусних захворювань

За допомогою світлового мікроскопа можуть бути виявлені лише віруси, розміри яких перевищують 150 нм. Найкращим методом є сріблення по Морозову, який заснований на осадженні частинок срібла, що призводить до збільшення розміру вірусу.

Надійним методом дослідження морфології вірусів, їх структури і локалізації є просвічуюча електронна мікроскопія. Препарат готують із суспензії інфекційного матеріалу. Зразки зрізів клітин ссавців, рослин, мікроорганізмів наносять на плівку-підкладку з сіткою, а потім напиллюють на вакуумних установках металами.

Серологічні методи діагностики вірусних захворювань

Важливим етапом лабораторної діагностики будь-якої вірусної інфекції є виявлення та типування вірусів у досліджуваному матеріалі, яке передбачає використання специфічних противірусних сироваток. В основі серологічних методів лежить реакція взаємодії антигену і антитіла.

А) Виявлення антитіл у сироватці крові хворого. В цьому випадку невідомими є антитіла у сироватці хворого. Тому таке дослідження вимагає постановки реакції з вже відомим антигеном (вірусом).

Позитивний результат свідчить про наявність в крові специфічних антитіл. В ряді випадків позитивна серологічна реакція є єдиним доказом взаємодії організму з збудником відповідного захворювання.

Б) Визначення родової, видової належності вірусу. В цьому випадку невідомим є антиген. Таке дослідження вимагає постановки реакції з відомими імунними сироватками, які отримують шляхом тривалої імунізації тварин. Останнє розведення сироватки, при якому реєструється чіткий позитивний результат взаємодії антитіла з антигеном (аглютинація) називається титром сироватки. Сироватка специфічна в межах роду, виду.

Для серологічного дослідження кров відбирають натще. Кров у кількості 5-6 мл поміщають на 0,5-1 год. у термостат при 37°C. Кров'яний згусток, що утворився, відділяють скляною паличкою після чого залишають сироватку у прохолодному місці на

18-20 годин. Сироватку зливають у пробірку за допомогою піпетки або через край. Із сироватки роблять двократні серійні розведення (1:10, 1:20, 1:40, 1:80).

Реакція гемаглютинації

В основі реакції гемаглютинації лежить здатність еритроцитів склеюватись при адсорбції на їх рецепторах вірусних частинок. Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків, які дістали назву гемаглютининів з поверхневими білками еритроцитів (глікопротеїнами). В результаті такої адсорбції еритроцити склеюються один з одним, що призводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи лунки планшету тонкою плівкою у вигляді перевернутої парасольки (повна аглютинація). Якщо реакція не відбулась, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом. Наприклад, до вірусу грипу найбільш чутливі еритроцити курей, людини (І групи), морських свинок; до вірусів енцефаліту – еритроцити гусей, тощо. Таку видову приналежність еритроцитів часто використовують для індикації вірусів. Інтенсивність аглютинації залежить від виду вірусу, температури. Взаємозв'язок між вірусом і еритроцитом є зворотнім і може наступити фаза елюції (звільнення) вірусу за допомогою ферменту нейрамінідази, яка дисоціює (руйнує) утворені зв'язки.

Перед постановкою реакції досліджуваний матеріал звільняють від більших частинок центрифугуванням при 2000 об/хв. протягом 10 хв.

Розрізняють методи гемаглютинації: крапельний на склі (орієнтовний і застосовується для індикації вірусів, які володіють гемаглютинуючою активністю) та розгорнутий в ряді пробірок (для титрування цих вірусів).

Для постановки орієнтовної реакції на чисте знежирене скло наносять краплю 5% суспензії еритроцитів, які чутливі до даного вірусу, і краплю досліджуваного матеріалу, після цього змішують їх пастерівською піпеткою. При позитивному результаті через 1-2 хвилини спостерігають появу аглютинації еритроцитів.

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)

Реакція базується на здатності блокувати гемаглютинуючі властивості вірусів за допомогою специфічних антитіл (Ig). У результаті цього спостерігається затримка аглютинації еритроцитів.

Компонентами реакції є невідомі антигени (вірусмісткий матеріал), специфічні імунні противірусні (або проти окремих вірусних антигенів) сироватки, еритроцити. Для розведення компонентів реакції використовують забуферений фізіологічний розчин (рН 7,2-7,4). Еритроцити отримують із крові птахів (кури, гуси), ссавців (гвінейські свинки), людини (0 група). Їх тричі промивають у стерильному фізіологічному розчині та зберігають у вигляді 0,5-1,0 % суспензії. З метою їх стабілізації еритроцити попередньо обробляють формаліном або глутаровим чи акриловим альдегідом. Реакцію ставлять у пробірках або спеціальних полістиролових планшетах з луночками. У досліді використовують робочу дозу антигену, яка дорівнює від 4 до 8 ГАО (ГАО – гемаглютинуюча одиниця - максимальне розведення антигену, яке повністю аглютинуює стандартну суспензію еритроцитів).

Для постановки реакції з метою визначення невідомого вірусу або його антигенів у буферному розчині (0,2 мл) роблять двократні розведення імунної сироватки (вихідне розведення 1:10), а потім додають невідомий антиген в об'ємі 0,2 мл (4-8 ГАО). Систему інкубують залежно від властивостей вірусу при температурі 4°C, 18°C, 37°C 1-18 год. Потім до комплексу додають подвійний об'єм зависі еритроцитів. Пробірки або пластини інкубують протягом 1-3 год. при тій самій температурі до повного осідання еритроцитів і оцінюють результати. Реакцію вважають позитивною при відсутності аглютинації еритроцитів. Відсутність вільного вірусу у суміші вірус+сироватка оцінюється як ознака

взаємодії антигену з антитілом. Титром антитіл вважають те найбільше розведення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації. РГГА широко використовують для ідентифікації вірусів грипу, паротиту, енцефалітів та ін.

РГГА дозволяє диференціювати антитіла за класами, зокрема виявляти Ig M та Ig G. З цією метою сироватку крові хворого розділяють на дві порції, одну з них обробляють хімічним реагентом, який вибірково руйнує Ig M, або адсорбує Ig G.

У реакціях імунодифузії використовують принцип дифундування антигенів і антитіл назустріч один одному в напіврідкому середовищі, наприклад, агаровому гелі. У зоні оптимальних співвідношень антигенів та антитіл утворюються лінії преципітації. Реакцію ставлять, як правило, на стерильному склі, яке покривають 1 % агарозою. Після застигання агарози в ній роблять лунки. У центральну лунку вносять специфічну противірусну сироватку, а лунки навколо заповнюють матеріалом, який містить віруси. Систему інкубують у вологій камері протягом 24-48 год. Поява нижніх ліній преципітації свідчить про наявність вірусного антигена.

Метод імуноферментного аналізу

В імуноферментних методах антиген взаємодіє з антитілом, при цьому один із реагентів зв'язаний з ферментом. Для виявлення цієї ензимної мітки необхідний відповідний субстрат (хромоген), який реагує в місці з'єднання антигена і антитіла з кон'югованим ферментом, змінюючи забарвлення реагуючої суміші. Для такої мітки широко використовують фермент пероксидазу хрому, яка залежно від субстрату дає різнокольорові продукти реакції. Врахування результатів з допомогою приладів – абсорбціометрів, які дозволяють вимірювати оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках імунологічного планшета.

Імуноферментні методи широко використовують у лабораторній практиці, особливо при імуногістологічних дослідженнях, виявленні антитіл, імунних комплексів, тощо.

Розрізняють прямі та непрямі імуноферментні методи.

Прямий метод. На першому етапі антиген реагує із антитілом, міченим пероксидазою, потім до утвореного комплексу додають відповідний субстрат. Якщо антиген відповідає антитілу, в реагуючій системі виникає певне забарвлення.

Непрямий метод. Спочатку антиген реагує з неміченими антитілами, утворюючи комплекс антиген-антитіло. Після промивання у систему вносять протиглобулінові антитіла, мічені пероксидазою, які зв'язуються з першим комплексом. Після наступного промивання вносять субстрат, який розкладаючись адсорбованим ферментом, зумовлює появу відповідного забарвлення.

Твердофазні імуноферментні методи.

В якості твердої фази (носія) використовуються лунки полістіролових планшет, фільтрувальний папір або нітроцелюлозу, на яких адсорбовано антиген або антитіло (рис. 5). До антигена, який зафіксований на твердій фазі, додають досліджувану сироватку, а після інкубації і промивання вносять антитіла проти гамаглобулінів людини, мічені ензимом. Після наступної інкубації і промивання додають субстрат для використаного ензиму, який реагує з ним. Спостерігається кольорова реакція, після затримки якої облік проводять візуально або спектрометрично.

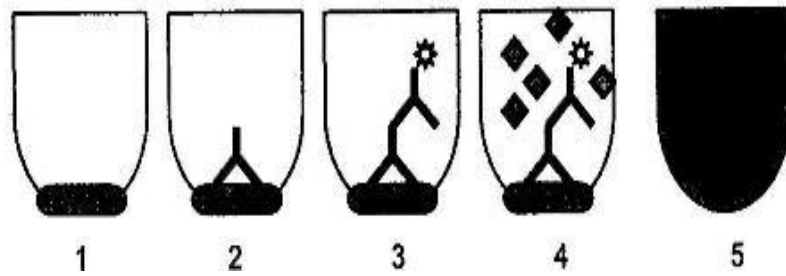


Рис. 5. Схема імуноферментного методу:

1-тверда фаза з фіксованим антигеном; 2-немічене антитіло, зв'язане з антигеном; 3-антиглобулін, кон'югований з ферментом, зв'язаний з комплексом антиген-антитіло; 4-внесення субстрату, який розкладається ферментом; 5-зміна забарвлення в лунці свідчить про присутність ферменту, а значить, відповідно антитіла.

Реакція імунофлуоресценції (РІФ)

Чутливість імунологічних реакцій значно зростає завдяки використанню мічених реагентів, наприклад, антитіл кон'югованих флуорохромом. При зв'язуванні таких імуноглобулінів з антигеном в люмінесцентному мікроскопі спостерігається світіння об'єктів (бактерій, вірусів, клітин), покритих міченими антитілами. За допомогою РІФ можна визначати також антитіла в сироватці хворого, на поверхні клітин і тканин. У цьому випадку використовують мічені флуоресцеїном сироватки проти глобулінів людини (антиглобулінові), якими обробляють комплекс антиген-антитіло. Внаслідок цього він під дією ультрафіолетових променів починає світитись зеленим світлом. У першому випадку йде мова про прямий, у другому – непрямий імунофлуоресцентний метод.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1. Провести виявлення гемаглютинуючих вірусів у досліджуваному матеріалі за допомогою реакції гемаглютинації. Результати реакції записати у таблицю.

Постановка реакції гемаглютинації

1. Готують в ряді пробірок двократно зростаючі серійні розведення досліджуваного матеріалу на ізотонічному розчині хлориду натрію в об'ємі 1 мл (метод серійних розведень). Для цього у кожен пробірку розливають по 0,5 мл фізіологічного розчину. В першу пробірку додають 0,5 мл досліджуваного матеріалу (отримали розведення 1:2), переносять з неї 0,5 мл до другої, з неї стільки ж до наступної і т.д. З останньої 0,5 мл відбирають у дезінфікуючий розчин.

2. У всі пробірки вносять по 0,5 мл суспензії еритроцитів. Для контролю на спонтанну аглютинацію додають 0,5 мл суспензії еритроцитів у пробірку з 0,5 мл ізотонічного розчину, який не містить вірусу.

3. Пробірки струшують і залишають при 37°C, 22°C або 4°C в залежності від досліджуваного вірусу.

4. Результати реакції враховують після повного осідання еритроцитів в контролі, приблизно через півгодини. Реакцію оцінюють за характером осаду еритроцитів. У позитивних випадках ступінь аглютинації еритроцитів відмічають плюсами:

++++ реакція має вигляд тонкої плівки із еритроцитів, що склеїлись, яка покриває дно пробірки – “парасоля”;

+++ реакція з просвітленнями у плівці;

++ наявність плівки з краями у вигляді мережива, так звані фестончасті краї;

+ осад у вигляді пластівців еритроцитів.

- осад еритроцитів, який не відрізняється від контролю, з різко окресленими краями.

5. За титр приймають граничне розведення досліджуваного матеріалу, який викликає аглютинацію еритроцитів на ++. Це розведення приймають як таке, що містить гемаглютинуючу одиницю вірусу (1 АО).

Таблиця

Схема титрування вірусу грипу за допомогою РГА

Компоненти, мл	Досліджувані пробірки							(контроль на спонтанну гемаглютинацію)
	1	2	3	4	5	6	7	
Ізотонічний розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вірусмісткий матеріал	0,5	→	→	→	→	→	↓	-
Розведення	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	-
1 % завесь еритроцитів курки	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Інкубація при температурі 18-20 °С протягом 30 хв.								
Результат								

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Назвіть мікроскопічні методи діагностики вірусних захворювань.
2. Яка реакція лежить в основі серологічних методів діагностики вірусних захворювань?
3. Опишіть механізм реакції гемаглютинації.
4. На чому базується реакція гальмування гемаглютинації?
5. Опишіть реакції імунодифузії.
6. Назвіть методи імуноферментного аналізу.
7. Опишіть реакцію імунофлуорисценції.
8. Назвіть відмінності між антигеном і антитілом.
9. Які основні компоненти при постановці серологічних реакцій?
10. Поясніть основний принцип, на якому ґрунтується визначення антитіл.
11. Яке значення спонтанна аглютинація має у процесах ідентифікації вірусів?
12. Поясніть механізм спонтанної гемаглютинації.

Діагностика чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів

Лабораторна робота № 5

ТЕМА: АНТИБІОТИКИ. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

Мета заняття: Ознайомити студентів з методами дослідження антибіотикочутливості бактерій.

Завдання:

1. Дослідити чутливість бактерій до антибіотиків диско-дифузійним методом.
2. Дослідити чутливість бактерій до антибіотиків методом серійних розведень та визначити мінімальну пригнічуючу концентрацію антибіотика стосовно досліджуваної бактеріальної культури.

Прилади та матеріали: спиртівка, чашки Петрі з поживним середовищем АГВ, стерильні ватні тампони, диски з антибіотиками, 10 пробірок з 2 мл стерильного МПБ, антибіотик відомої концентрації, суспензія бактеріальної культури.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Антибіотики – це речовини мікробного, рослинного або тваринного походження, їх напівсинтетичні та синтетичні аналоги і похідні, що вибірково пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів, вірусів, найпростіших, грибів, а також затримують ріст пухлин. Термін «антибіотики» у науку введений З.А. Ваксманом у 1942 р. Антибіотичні речовини утворюються мікроорганізмами: актиноміцетами, пліснявими грибами, бактеріями, а також рослинами та тваринами. Вони можуть виділятися у навколишнє середовище або концентруватися у клітинах і вивільнятися при їх руйнуванні. Деякі антибіотики (хлорамфенікол) отримують хімічним шляхом.

Антибіотики є продуктом вторинного метаболізму мікроорганізмів, їм притаманна висока біологічна активність. Антибіотики спричиняють біологічний ефект у дуже малих кількостях (наприклад, пеніцилін викликає виразну бактерицидну дію на бактерії у концентрації 0,000001 г/мл). Для антибіотичних речовин характерною рисою є специфічність, т.б. вибіркова дія на певні організми. Так, бензилпеніцилін затримує ріст грампозитивних бактерій (стафілококів, стрептококів) і практично не впливає на грамнегативні мікроби, гриби.

Антибіотики мають відповідати наступним вимогам:

- 1) у дуже низьких концентраціях (10-50 мкг/мл) володіти цидною (викликати загибель мікроба) або статичною (затримувати ріст мікроба) дією;
- 2) бути нешкідливими і не знижувати свою активність в організмі;
- 3) пригнічувати ріст мікробів, не порушуючи фізіологічного стану організму.

Біологічну активність антибіотиків оцінюють в умовних одиницях, які містяться в 1 мл розчину (ОД/мл) або в 1 мг препарату (ОД/мг).

Оцінка чутливості мікробів до антибіотиків та вивчення їх фармакокінетики в організмі хворого є основними лабораторними показниками, які при їх співставленні дозволяють прогнозувати ефективність антибактеріальної терапії. Крім того, результати визначення антибіотикочутливості використовують як маркер, що дозволяє виявляти та

контролювати зміни антибіотикограми збудників у динаміці; використовувати детермінанти резистентності, які найчастіше зустрічаються, або їх сполучення як додаткові маркери при діагностиці внутрішньо лікарняних інфекцій; для виявлення джерел інфікування та шляхів розповсюдження полірезистентних штамів. Такі дані, одержані та узагальнені у різних регіонах країни протягом фіксованих проміжків часу, використовуються при формуванні політики антибактеріальної терапії та визначенні номенклатури антибіотиків, які випускаються в країні.

Найбільш розповсюдженими методами визначення антибіотикочутливості збудників інфекцій є диско-дифузійний (метод дисків) та серійних розведень.

Поживні середовища для визначення чутливості бактерій до антибіотиків повинні відповідати таким вимогам:

- бути стандартними та забезпечувати оптимальні умови росту мікроорганізмів;
- не містити інгібіторів бактеріального росту і великої кількості стимуляторів;
- не містити речовин, що пригнічують активність препаратів.

На результати дослідження може суттєво впливати значення рН середовища. Найдоцільніше вибирати нейтральне або дещо лужне середовище (рН 7,0-7,4), оскільки ці значення придатні для більшості антибіотиків. При визначенні чутливості бактерій використовують бульйон і 1,5-2 % агар на переварі Хоттінгера, звичайний м'ясо-пептонний бульйон і 1,5-2 % агар на ньому, середовище АГВ (агар Гівенталія-Ведьміної). Вони придатні при визначенні антибіотикочутливості стафілококів, ентеробактерій, псевдомонад. Однак стрептококи та гемофільні бактерії вимагають добавки ростових факторів; дріжджі та анаеробні бактерії – спеціальних середовищ і певних умов культивування. На результати визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків-аміноглікозидів, поліміксинів, тетрациклінів впливає вміст у поживних середовищах катіонів кальцію, магнію, що особливо важливо при дослідженні *Ps. aeruginosa*. Оптимальний вміст - 50 мг/л Ca^{2+} і 25 мг/л Mg^{2+} .

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Диско-дифузійний метод визначення антибіотикочутливості

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків слід визначати тільки у чистій культурі. Однак у ряді випадків для швидкого одержання орієнтовних даних про антибіотикограму бактерій використовують безпосередньо патологічний матеріал. Досліджуваний матеріал наносять на поверхню диференційно-діагностичних середовищ петлею або ватним тампоном. Одержану чисту культуру резуспендують у стерильному фізіологічному розчині. Суспензію у кількості 0,1 мл наносять на поверхню поживного середовища та розтирають шпателем. Бактеріальну суспензію (10^3 - 10^5 КУО/мл залежно від виду мікробів) в об'ємі 0,1 мл рівномірно розподіляють по поверхні середовища при похитуванні чашки, надлишок рідини видаляють піпеткою. На однаковій відстані кладуть диски з антибіотиками (не більше 6) (рис. 6).

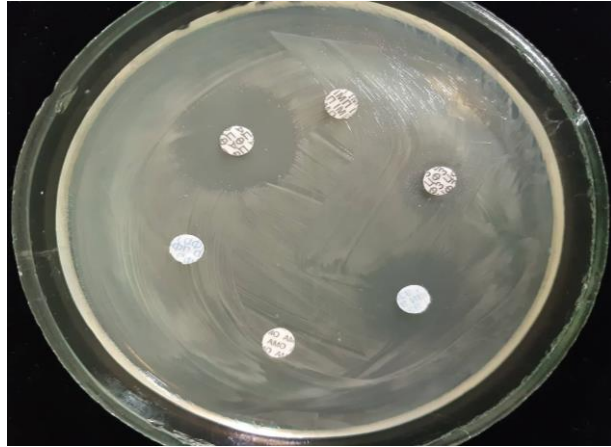


Рис. 6. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків диско-дифузійним методом

Рівномірність газону, яка визначається величиною посівної дози, – найголовніший фактор одержання достовірних результатів і підлягає кількісній оцінці та якісній стандартизації. Результати враховують через 24 та 48 годин. Для контролю стандартності проведення досліджень у кожному досліді використовують тест-культури з відомою чутливістю до антибіотиків.

Оцінку результатів проводять за таблицею “Граничні значення діаметрів зон затримки росту і значення МПК антибіотиків для інтерпретації результатів” (див. таблиця 1 додатку), яка містить граничні значення діаметрів росту для резистентних, помірно-резистентних та чутливих штамів, а також значення пригнічуючої (інгібуючої) концентрації (МПК, МІК) антибіотиків для стійких і чутливих штамів.

За своїм ступенем чутливості до антибіотиків мікроорганізми поділяються на три групи:

1 група – чутливі до антибіотиків (збудники знищуються в організмі при використанні звичайних терапевтичних доз препаратів), зона затримки росту 20 мм і більше;

2 група – помірно-резистентні (для них лікувальний ефект може бути досягнутий при використанні максимальних терапевтичних доз препаратів), зона затримки росту 15-10 мм;

3 група – резистентні (бактерицидних концентрацій препаратів в організмі створити не можливо, тому що вони будуть токсичними), зона затримки росту до 15 мм.

2. Вивчення антибіотикочутливості бактерій методом серійних розведень

Показаннями для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень є необхідність одержання кількісних даних (переважно при тяжкому перебігу інфекційних процесів) для проведення регульованої антибіотикотерапії.

Встановлення ступеня чутливості мікробів до антибактеріальних препаратів впливає на вибір антибіотика (наприклад, відмова від ліків з високою токсичністю при помірному ступені чутливості збудника до них), його дозування (концентрація антибіотика в крові повинна в 2-3 рази перевищувати його мінімальну пригнічуючу концентрацію по відношенню до збудника) і режим введення. Крім того, її кількісне визначення необхідне також для встановлення бактерицидної дії обраного препарату (як гарантії швидкого терапевтичного ефекту та безрецидивного перебігу) по відношенню до даного збудника.

Для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі готують пробірки (8-10 і більше) з двократними послідовними розведеннями препарату (табл.). Середовище попередньо розливають у пробірки по 2 мл. У першу додають 2 мл розчину антибіотика певної концентрації, перемішують і

переносять до наступної пробірки, продовжуючи розведення до передостанньої, з якої видаляють 2 мл суміші. Остання пробірка служить контролем росту культури. У тому ж бульйоні, який використовують для розведення антибіотиків, готують суспензію добової агарової або бульйонної культури бактерій з розрахунку 10^5 - 10^6 мікробних тіл в 1 мл залежно від виду збудника. Потім до кожної пробірки з розведеннями, а також до контрольної додають по 0,2 мл виготовленої суспензії. При визначенні чутливості до пеніцилінів пеніциліназоутворюючих стафілококів рекомендують використовувати одночасно велике й мале мікробне навантаження (100, 100000 та вище мікробних тіл в 1 мл). Залежно від посівної дози значення МПК препарату може коливатись: при збільшенні дози чутливість знижується за рахунок зростання кількості пеніцилінази, що утворюється в середовищі.

Таблиця

Схема визначення антибіотикочутливості методом серійних розведень

Компоненти, мл	Пробірки									Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	бактерій	анти- біотика	
МПБ	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Пеніцилін, 100 ОД/мл	2,0	→	→	→	→	→	→	↑	-	2,0	
Концентрація антибіотика, ОД/мл	50	25	12,5	6,3	3,2	1,6	0,8	0,4	-	50	
Суспензія бактерій, 10^5 /мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	
Інкубація в термостаті при 37 °С 18-24 год.											
Результат											

Пробірки інкубують у термостаті при 37 °С протягом 18-24 год. Результати враховують, визначаючи наявність або відсутність росту в середовищі з різними розведеннями препарату. Остання пробірка, в якій спостерігають затримку росту культури (прозорий бульйон), відповідає МПК (мінімальній пригнічуючій концентрації) або МБсК (мінімальній бактеріостатичній концентрації) препарату відносно даного мікроба і вказує на ступінь його чутливості. Якщо ознаки росту з'являються в усіх пробірках, досліджуваний штам резистентний до максимальної концентрації препарату, яку було взято у дослід. Відсутність росту бактерій в усіх пробірках, крім контрольної, свідчить, що МПК препарату нижча, ніж та, що використовується в досліді.

Для визначення бактерицидного ефекту антибіотика з декількох останніх пробірок, в яких немає ознак росту, роблять висів на сектори агару в чашках Петрі. Через 24-48 год. інкубації при оптимальній температурі відмічають ту найменшу концентрацію препарату в пробірці, посів з якої не дав росту, її вважають мінімальною бактерицидною концентрацією (МБцК).

Оформлення результатів:

Отримані результати оформити у вигляді таблиці для кожної досліджуваної культури:

Анти-біотик	Код диску	Діаметри зон для середовища АГВ, мм	Висновок про ступінь чутливості	МПК, мкг/мл

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Яким вимогам повинні відповідати поживні середовища для визначення антибіотикочутливості?
2. З якою метою проводиться оцінка антибіотикочутливості мікроорганізмів?
3. Які переваги методу серійних розведень над визначенням антибіотикочутливості диско-дифузійним методом?

Діагностика мікробіоти організму людини

Лабораторна робота № 6

ТЕМА: НОРМАЛЬНА МІКРОФЛОРА ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ

Мета заняття: Ознайомити студентів з методиками вивчення нормальної мікрофлори різних екоотопів організму людини.

Завдання:

1. Дослідити мікрофлору шкіри рук.
2. Дослідити мікрофлору зіву.
3. Ознайомитись з методикою визначення якісного та кількісного складу мікрофлори кишечника.

Прилади та матеріали:

1. Бактеріологічне дослідження ротової порожнини: мікроскопи, предметні та покривні скельця, чашки Петрі з МПА, кров'яним агаром, пробірки з 0,85 % розчином NaCl;
2. Бактеріологічне дослідження шкіри рук: мікроскопи, предметні та покривні скельця, чашки Петрі з МПА, пробірки з глюкозо-пептонним середовищем, стерильні ватні тампони, 0,85 % розчин NaCl.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Нормальна мікробіота організму – це сукупність мікробіоценозів, що характеризуються визначеним кількісним і якісним складом, займають той чи інший біотоп і підтримують біохімічну та імунологічну рівновагу в організмі, необхідну для збереження його здоров'я. Організм людини населяють понад 500 видів бактерій, біля 50 видів вірусів і понад 20 видів найпростіших. Загальна кількість мікроорганізмів досягає 10^{14} , що у 10 разів більше, ніж клітин організму. Слід відмітити, що всі мікроорганізми, які мешкають в тому чи іншому біотопі, знаходяться між собою у складних симбіотичних відносинах, пов'язані трофічним ланцюгами. Так, екосистеми слизових оболонок відкритих порожнин і шкіри формуються, починаючи з моменту народження дитини, і змінюються в процесі його росту і розвитку. **Сукцесія**, т.б. послідовна зміна на певній ділянці середовища існування одних біоценозів іншими, закінчується формуванням стабільної мікробної спільноти.

Вивченням нормальної мікрофлори та препаратами із молочно-кислих лактобацил (ацидофільної палички, яка використовується для приготування простокваші) першим займався видатний біолог і патолог, почесний член Петербурзької АН Ілля Мечников. Його концепція про одночасну користь та шкідливість мікрофлори організму набула у наш час всесвітнє визнання.

Нормальна мікрофлора поділяється на 2 групи:

- 1) постійна (автохтонна) – специфічна для даного біотопу;
- 2) тимчасова (аллохтонна), занесена з інших біотопів хазяїна або з оточуючого середовища.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Вивчення мікрофлори шкіри рук

Найпростіший посів для дослідження мікрофлори шкіри рук здійснюється шляхом доторкання пальців до поверхні поживного середовища (утворення так званих "відбитків").

Частіше посів проводять на поверхню поживного середовища змиву з рук. Щоб отримати змив, пінцетом беруть стерильний ватний тампон, змочують його у МПБ або глюкозо-пептонному середовищі і протирають шкіру: спочатку протирають шкіру лівої, потім правої руки в такій послідовності: тил кисті, долоня, міжпальцеві проміжки, нігтьові ложа. Після цього тампон кладуть у пробірку із стерильним глюкозо-пептонним середовищем (до 1 % пептонної води додають 0,5 % глюкози і стерилізують) і перемішують деякий час, обережно обертаючи пробірку між долонями. Після закінчення змиву тампони знову занурюють у середовище. Після ретельного віджимання тампону й перемішування 1 см³ рідини вносять у стерильну чашку Петрі, заливають 15 мл розтопленого і охолодженого агару. Засіяні чашки Петрі розміщують у термостаті при температурі 37 °C на 24 години. Виймають чашки і витримують протягом 2-3 днів при кімнатній температурі. За цей час утворюються колонії сарцин, стафілококів, пігментних бактерій, цвільових та дріжджових грибів тощо. Після чого підраховують ЗМЧ.

Для визначення БГКП, стафілококів та ентерококів (індикаторні мікроорганізми) проводять посів на елективні середовища.

2. Бактеріологічне дослідження на дисбактеріоз кишечника

Основним методом діагностики дисбактеріозу є бактеріологічний метод. Випорожнення доставлені в лабораторію без консервантів у кількості 1 г поміщують в пробірку з 9-10 мл ізотонічного розчину хлориду натрію (розведення 1:10), перемішують і залишають на 10-15 хв. при кімнатній температурі. Із основного розведення готують послідувачі (1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000). 0,1 мл матеріалу засівають на середовища: Плоскірева, Левіна, Ендо – з метою виділення ентеробактерій, на середовище Сабуро – для дріжджоподібних грибів, на 5% кров'яний агар – для виявлення загальної кількості гемолітичної мікрофлори, на жовтково-сольовий – для стафілококу, ентерококагар – ентерококів, Блаурокка – біфідобактерій, лактобактерій – лактобакагар.

Після 22-24 годин продивляються посіви за виключенням середовища Сабуро. Лактозонегативні культури перевіряють стосовно їх приналежності до шигел, сальмонел, кишкових паличок, що викликають колієнтерити. Кількість мікробів визначають за кількістю колоній, що виростили на поживному середовищі, враховуючи кількість посіяного матеріалу та ступінь розведення.

На середовищі Левіна колонії патогенних мікробів прозорі, безкольорові або мають рожевий відтінок, кишкова паличка утворює сині або чорні колонії, протей росте ізольованими оранжевими колоніями, причому середовище змінює забарвлення навколо колоній протей.

На середовищах Ендо, Плоскірева, Левіна колонії кишкової палички, шигел і сальмонел безколірні, колонії кишкової палички забарвлюються в залежності від кольору індикатора: на середовищі Ендо – в червоний колір з металічним блиском, на середовищі Левіна – в синій або чорний, Плоскірева – рожевий колір. На 5 % кров'яному агарі визначають процентне співвідношення бактерій, які володіють і не володіють гемолізуючими властивостями. З 5 % кров'яного агару пересівають колонії різних видів на скошений слабо лужний агар і після 20–22-годинної інкубації при 37 °C проводять мікроскопію мазків, забарвлених за Грамом. Грамнегативні палички ідентифікують за допомогою тестів, які застосовуються при ідентифікації ентеробактерій, стафілококи досліджують на патогенність.

Посіви на середовище Сабуро перевіряють через 2–3 доби. Колонії грибів опуклі, сметаноподібні, глянцеvidні (але не мокрі), гладенькі або зморшкуваті, спочатку білі, а згодом кремові, через 1-1,5 місяці коричнюваті, з часом колонія вростає у середовище. Мікроскопічно виявляються нитки міцелію та значна кількість великих овальних або округлих клітин, що брунькуються.

Для виділення анаеробних біфідобактерій необхідно проводити посів великих розведень фекалій на середовище Блаурокка, оскільки при посіві малих розведень в цьому середовищі виростають і інші мікроби. Для цього у пробірки з 13-15 мл

регенерованого протягом 45 хв. середовища Блаурокка засівають 1 мл фекалій в розведеннях від 10^{-7} – 10^{-11} . Посіви інкубують при 37 °С 24 год. Із посівів, в яких виявлений ріст у вигляді помутніння середовища, окремих колоній або тяжів виготовляють мазок і фарбують його за Грамом. При відсутності росту посіви залишають в термостаті до 48–72 годин.

Оскільки виявлення абсолютної кількості різних груп мікроорганізмів є трудомістким, визначають їх процентне співвідношення. На середовищах Ендо і Левіна визначають процентне співвідношення мікроорганізмів лактозонегативних (безколірних), лактозопозитивних (добре забарвлених), колоній мікробів зі слабкими ферментативними властивостями (слабе розщеплення лактози – рожеві колонії).

Про відсутність дисбактеріозу свідчить переважання біфідобактерій у розведеннях фекалій 10^8 - 10^9 , повноцінної у ферментативному відношенні кишкової палички (85-90 % до загальної кількості колоній), наявності ентерокока, виявлення в сумі не більше 10-15 % колоній лактозонегативних ентеробактерій, гемолізуючих ешерихій, кокових форм, грибів роду *Candida*, протей. Дисбактеріоз може виражатись високим відсотком (25-30%) лактозонегативних та гемолізуючих ентеробактерій, гемолізуючих та негемолізуючих кокових форм, наявністю грибів роду *Candida* у вигляді форм, що брунькуються, і ниток міцелію, протей, часто асоціацій вказаних бактерій. Відсутність росту біфідобактерій у розведенні 10^{-7} переконливо свідчить про наявність дисбактеріозу.

3. Вивчення мікрофлори зіву

Матеріал із ротоглотки відбирають стерильним ватним тампоном, яким обтирають правий мигдалик, потім дужку піднебіння, язичок, ліву дужку і лівий мигдалик. Важливо слідкувати, щоб тампон не торкався слизової щік та язика. Бактеріологічне дослідження здійснюють шляхом посіву матеріалу на кров'яний агар. Для цього чашку дещо відкривають однією рукою, торкаючись тампоном поверхні агару біля краю чашки і починають проводити посів штрихами від краю до краю чашки, поступово обертаючи тампон. Посів проводять на кров'яний, сироватковий, жовтково-сольовий та шоколадний агар, середовище Ендо та Сабуро. Виявлення мікроорганізмів, які не є представниками нормальної мікрофлори, або збільшення кількості будь-якого виду автофлори на фоні хвороби, свідчить про їх етіологічну роль при даному захворюванні.

Оформлення результатів:

Отримані результати оформити у вигляді таблиць.

1. Вивчення якісного та кількісного складу мікрофлори шкіри рук

№ п/п	ЗМЧ	Культуральні властивості ізолюваних культур	Морфологічні та тинкторіальні властивості ізолюваних культур

2. Вивчення мікрофлори зіву

№ п/п	Культуральні властивості ізолюваних культур	Морфологічні та тинкторіальні властивості ізолюваних культур

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Які селективні поживні середовища використовують для якісного визначення мікрофлори кишечника?
2. Опишіть методику визначення мікрофлори зіву.
3. Як проводять змив для визначення мікрофлори шкіри рук?

Діагностика інвазійних захворювань

Лабораторна робота № 7

ТЕМА: ПАРАЗИТИЗМ. ПОХОДЖЕННЯ ПАРАЗИТИЗМУ. МЕДИЧНА ПРОТОЗООЛОГІЯ. ПІДЦАРСТВО НАЙПРОСТІШІ (*PROTOZOA*): ХАРАКТЕРИСТИКА, КЛАСИФІКАЦІЯ, МЕДИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ. ПАРАЗИТИЧНІ ПРЕДСТАВНИКИ ТИПУ САРКОМАСТИГОФОРА (*SARCOMASTIGOPHORA*), КЛАСУ АМЕБИ (*LOBOSEA*): РОЗПОВСЮДЖЕННЯ, МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ АМЕБИ ДИЗЕНТЕРІЙНОЇ (*ENTAMOEBA HISTOLYTICA*), ЦИКЛ РОЗВИТКУ, ШЛЯХИ ІНВАЗІЇ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА І ПРОФІЛАКТИКА АМЕБІАЗУ.

Мета роботи: Ознайомитись з основними поняттями та термінами медичної протозоології. Вивчити характерні особливості будови, життєві цикли розвитку, особливості амеби дизентерійної (*Entamoeba histolytica*), амеби кишкової (*E. coli*), амеби ротової (*E. gingivalis*). Ознайомитись з основними симптомами амебіазу, лабораторною діагностикою, профілактикою захворювання.

Прилади і матеріали: таблиці, рисунки, мікроскопічні препарати амеби дизентерійної.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Класифікація

Підцарство Найпростіші (*Protozoa*)

Тип Саркоджгутикові (*Sarcostigophora*)

Клас Справжні амеби (*Lobosea*)

Представники: Амеба дизентерійна (*Entamoeba histolytica*), Амеба кишкова (*E.coli*), Амеба ротова (*E. gingivalis*)

АМЕБИ

Амеба дизентерійна (*Entamoeba histolytica*) – збудник амебіазу (амебної дизентерії).

Географічне поширення: зустрічається повсюдно, частіше в країнах з тропічним і субтропічним кліматом (Індія, Північна і Центральна Африка, Південна Америка).

Морфологія: паразит існує у трьох формах:

1) тканинна вегетативна форма (*forma magna*). Розміри 20-40 мкм, дуже рухома. Цитоплазма чітко розділена на дрібнозернисту ендоплазму і склоподібну ектоплазму. Ядра в живій амебі не видно. Живиться еритроцитами, які можна побачити в ендоплазмі. Виділяє протеолітичні ферменти, патогенна.

2) просвітна вегетативна форма (*forma minuta*). Розміри 15-20 мкм. Рух більш слабкий, ніж у *forma magna*, поділ на екто- і ендоплазму відбувається тільки при утворенні псевдоніжок. Живиться бактеріями, часточками їжі. Розмножується поділом.

3) циста. Нерухома, 8-15 мкм у діаметрі, безбарвна, вкрита товстою оболонкою. Зріла циста містить 4 ядра, які добре помітні при фарбуванні розчином Люголя. Можна побачити хроматоїдні тіла (містять РНК і протеїн) у вигляді коротких паличок із заокругленими кінцями і включеннями глікогену.

Життєвий цикл. Паразитує тільки в людини.

Інвазійна форма – циста. Механізм передачі фекально-оральний. Цисти

потрапляють в організм здорової людини з забрудненою їжею, водою, брудних рук. Механічними переносниками можуть бути мухи і таргани. В кишківнику оболонка цисти розчиняється, ядра поділяються навпіл, із кожної цисти утворюється 8 просвітних форм (*forma minuta*), що є сапрофітами.

Локалізація: просвіт товстої кишки, переважно сліпа і сигмоподібна кишки. При зміні рН середовища амеби утворюють цисти, що виділяються з фекаліями (цистоносійство). За деяких умов, поки недостатньо з'ясованих, просвітня форма переходить у патогенну тканину форму (*forma magna*). Виділяє протеолітичні ферменти і проникає у стінку кишки (локалізація – всередині стінки товстої кишки), де живиться еритроцитами, викликає утворення виразок.

Основне джерело зараження оточуючих – здоровий цистоносій і хворий на амебіаз у період видужання, в яких цисти виділяються у великій кількості.

Патогенна дія: утворення мікроабсцесів стінки кишківника при проникненні амеби, після прориву яких виникають виразки різного розміру; подразнення нервових закінчень стінки кишки, що викликає гіперперистальтику і гіперсекрецію слизової оболонки; руйнування стінки кровоносних судин при поглибленні виразки, а як наслідок, кровотеча і розповсюдження з течією крові паразита в печінку та інші органи; перфорація виразки призводить до перитоніту.

Клініка: інкубаційний період – від одного тижня до 3 міс., частіше 3-6 тижнів. Характерний біль у животі переймоподібного характеру, переважно в правій здухвинній ділянці (місце проекції сліпої кишки), часті позиви на дефекацію, рідкі, рівномірно забарвлені кров'ю випорожнення зі слизом 5-20 разів на день. Температура тіла нормальна або субфебрильна. При ректороманоскопії на фоні незміненої або малозміненої слизової оболонки видно виразки на різних стадіях розвитку (свіжі, які рубцюються, і такі, що вже зажили). Виразки облямовані гіперемованою слизовою оболонкою, дно вкрите некротичними масами брудно-жовтого кольору. Без лікування хвороба переходить у хронічну форму, що перебігає зі зникненням чи послабленням симптомів хвороби, або з їх посиленням.

Кишкові ускладнення можуть призвести до смерті хворого. Це перитоніт внаслідок перфорації виразки, кишкова кровотеча при руйнуванні стінки судин; амeboма – пухлиноподібний інфільтрат у стінці кишки, який зовні нагадує злоякісне новоутворення; звуження просвіту кишківника внаслідок розвитку сполучної тканини при загоєнні виразок, що може призвести до непрохідності.

Позакишкові ускладнення пов'язані з гематогенним заносом амеб в інші органи: амeбні абсцеси печінки (зустрічаються найчастіше), легень, шкіри, головного мозку. Клінічні прояви типові для абсцесів цих органів. При пункції амeбного абсцесу одержують гній шоколадного кольору. Може розвинутися амeбний гепатит, що перебігає дуже важко, з вираженою інтоксикацією, лихоманкою, збільшенням печінки.

Діагностика. Клінічна: переймоподібні болі в животі, особливо у правій здухвинній ділянці; рідкі випорожнення з домішками крові та слизу; дані ректороманоскопії. *Лабораторна:* виявлення *forma magna* у нативних чи пофарбованих мазках фекалій; дослідження нативних мазків необхідно проводити не пізніше 20 хв. після дефекації, оскільки тканинні форми амеб швидко руйнуються. Виявлення тільки *forma minuta* і цист не дозволяє встановити діагноз амебіазу і свідчить про цистоносійство. Зрілі цисти дизентерійної амеби і непатогенної кишкової амеби можна розрізнити за кількістю ядер (4 ядра в дизентерійної і 8 ядер у кишкової амеб). Серологічні реакції: РІФ, РНГА ефективні за будь-якої локалізації амеб.

Лікування. Застосовують протипаразитарні хіміопрепарати: метронідазол, тинідазол, дигідроemetин.

Профілактика. Особиста: дотримання правил особистої гігієни, кип'ятіння води,

миття овочів, фруктів, захист їжі від мух і тарганів. *Громадська*: виявлення і лікування хворих та цистосіїв, контроль за станом джерел водопостачання, знищення мух і тарганів, санітарно-просвітня робота.

Амеба ротова (*Entamoeba gingivalis*)

Морфологія: існує тільки у формі трофозоїта (вегетативна форма).

Трофозоїт розміром 6-30 мкм, цитоплазма чітко розділена на два шари. В ній можна побачити фагоцитовані бактерії і лейкоцити на різних стадіях травлення. Ядро живої амеби не візуалізується. Рух повільний, псевдоніжки широкі.

Локалізація: м'який зубний наліт, альвеоли зубів.

Патогенної дії не викликає.

Амеба кишкова (*Entamoeba coli*)

Мешкає у товстій кишці людини, але протеолітичного ферменту не виділяє, тому проникати у стінку кишки не може. *Патогенної дії* не викликає.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання:

1. На таблицях та готових препаратах розглянути зовнішній вигляд амеби дизентерійної (*Entamoeba histolytica*) – збудника амебної дизентерії.
2. На таблицях та готових препаратах розглянути цисти амеб кишок людини.
3. На таблицях розглянути схему життєвого циклу амеби дизентерійної.

Зарисувати:

1. Зовнішній вигляд амеби дизентерійної.
2. Цисти амеб кишок людини.
3. Схему життєвого циклу амеби дизентерійної. Відмітити: 4-ядерну та 8-ядерну цисти різних видів амеб-паразитів людини; основні стадії розвитку амеби дизентерійної, малу і великі вегетативні форми, цисти.

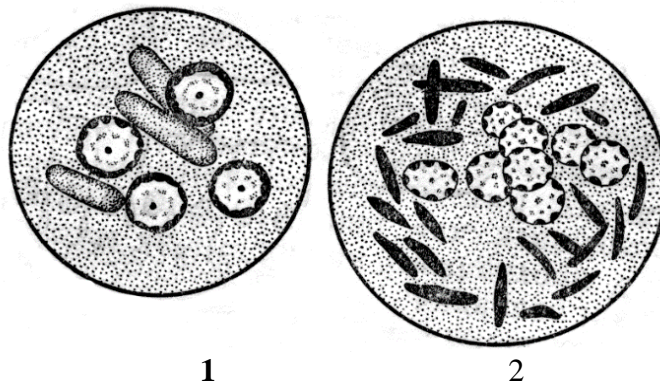


Рис. 7. Цисти амеб кишок людини:

1 – *Entamoeba histolytica* (4-ядерна циста), 2 – *Entamoeba coli* (8-ядерна циста).

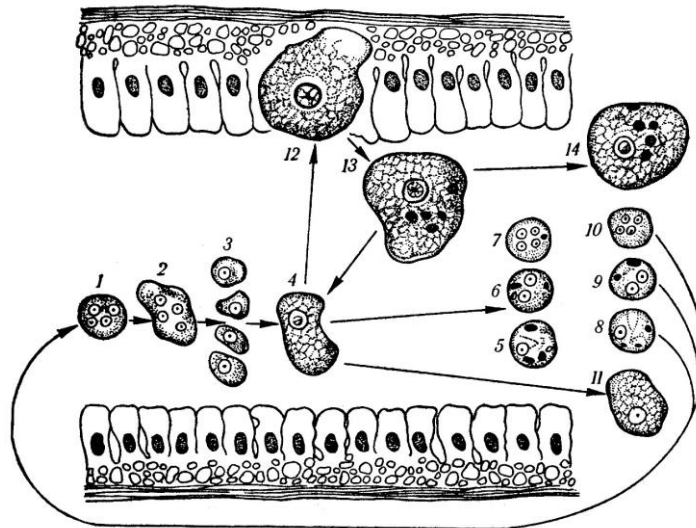


Рис. 8. Схема життєвого циклу амеби дизентерійної:
 1-2 – циста, яка потрапила у травний канал, 3 – метацистні амеби; 4 – дрібна вегетативна форма; 5-10 – цисти, виділені у навколишнє середовище; 11 – вегетативна форма кров'янистих виділень; 12 – велика вегетативна форма тканин слизової оболонки кишечника; 13-14 – велика вегетативна форма просвіту кишок.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Що вивчає медична протозоологія?
2. Загальна характеристика та класифікація паразитичних представників типу *Protozoa*.
3. Анатомо-морфологічні особливості амеби дизентерійної, її життєвий цикл.
4. Патогенна дія та клініка амєбіазу.
5. Лабораторна діагностика, можливості лікування амєбної дизентерії.

Лабораторна робота № 8

ТЕМА: ПАРАЗИТИЧНІ ПРЕДСТАВНИКИ ТИПУ САРКОМАСТИГОФОРА (*SARCOMASTIGOPHORA*), КЛАСУ ТВАРИННІ ДЖГУТИКОВІ (*ZOOMASTIGOPHORA*). РОЗПОВСЮДЖЕННЯ, МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ, ЦИКЛ РОЗВИТКУ, ШЛЯХИ ЗАРАЖЕННЯ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА І ПРОФІЛАКТИКА ПАРАЗИТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ, ВИКЛИКАНИХ ПАРАЗИТИЧНИМИ ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДІВ *TRYPANOSOMA*, *LEISHMANIA*, *TRICHOMONAS*, *LAMBLIA*.

Мета роботи: Вивчити характерні особливості будови, життєві цикли розвитку збудників трипаносомозу, лейшманіозу, трихомонозу та лямбліозу. Ознайомитись з основними симптомами, лабораторною діагностикою, профілактикою захворювань.

Прилади і матеріали: таблиці, рисунки, мікроскопічні препарати паразитичних представників класу Тваринні джгутикові (*Zoomastigophora*).

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

ТРИХОМОНАДИ

В організмі людини існують три види трихомонад:

- ▶ кишкова трихомонада (*Trichomonas hominis*) – у товстій кишці;
- ▶ ротова трихомонада (*Trichomonas tenax*) – у ротовій порожнині;
- ▶ сечостатева (піхвова) трихомонада (*Trichomonas vaginalis*) – у сечостатевих шляхах чоловіків і жінок.

Питання про патогенність кишкової і ротової трихомонад остаточно не вирішене. Піхвова трихомонада викликає урогенітальний трихомоноз.

Трихомонада піхвова (*Trichomonas vaginalis*)

Трихомонада піхвова (*Trichomonas vaginalis*) – збудник урогенітального трихомонозу.

Географічне поширення: повсюдно.

Морфологія: існує тільки у вигляді вегетативної форми (трофозоїт), цист не утворює. Трофозоїт має грушоподібне тіло довжиною 14-30 мкм. На передньому кінці тіла знаходяться 4 вільних джгутики та ундулююча мембрана, що доходить до середини тіла. Ядро одне, знаходиться ближче до переднього кінця тіла. Цитоплазма вакуолізована. Крізь усе тіло проходить аксостиль, який виступає на задньому кінці у вигляді шпички.

Життєвий цикл: паразитує тільки в людини. Передається від однієї людини до іншої тільки у вологому середовищі. В зовнішньому середовищі паразит швидко гине. Інвазійна форма – трофозоїт. Основні шляхи зараження: при статевих контактах, через вологі рушники, губки (таким шляхом від дорослих можуть заразитися діти), через гінекологічні й урологічні інструменти (недостатня стерилізація після огляду хворого).

Локалізація: у жінок у піхві, бартолинових залозах, сечоводах, сечовому міхурі, у чоловіків – в уретрі, сім'яних мішечках, простаті. Паразит прикріплюється до епітеліальних клітин слизової оболонки, іноді може проникати в підслизову оболонку статевих шляхів.

Патогенна дія: запалення слизової оболонки сечостатевих шляхів. Можливо, що трихомонада виявляє патогенність тільки в асоціації з іншими паразитами за визначених умов. Підтвердженням цього є часте безсимптомне носійство.

Клініка. Трихомоноз у жінок перебігає у вигляді гострого запалення піхви. Через 3-30 днів після зараження з'являються серозно-гнійні виділення з піхви, що супроводжуються свербіжем, печією в ділянці статевих органів. Виділення в'язкі, пінисті, жовто-зеленого кольору з неприємним запахом. Іноді з'являються ознаки запалення сечового міхура. Клінічні симптоми трихомонозу можуть виникнути в жінок, що були безсимптомними носіями, в період вагітності і після пологів, у післяменструальному періоді і в менопаузі.

Трихомоноз у чоловіків перебігає зазвичай безсимптомно, що сприяє поширенню хвороби. Іноді розвивається трихомонадний уретрит, що виявляється виділенням крапель серозної рідини з уретри.

Діагностика. Клінічна: наявність специфічних виділень із піхви. *Лабораторна:* виявлення вегетативних форм у нативних і пофарбованих мазках із піхви й уретри, рідше – в осаді сечі після центрифугування; посів на живильне середовище при підозрі на носійство, контролі після лікування. Ймовірність виявлення трихомонад у жінок вища при дослідженні виділень у перші дні після закінчення менструації, тому що кількість паразитів у цей період збільшується.

Лікування. Застосовують антипротозойні препарати: метронідазол (тинідазол, трихопол) або флагіл. Статевих партнерів лікують одночасно.

Профілактика. Особиста: відмова від безладних статевих стосунків, використання презервативів. *Громадська:* лікування хворих; стерилізація гінекологічного та урологічного інструментарію.

Трихомонада кишкова (*Trichomonas hominis*)

Трихомонада кишкова є умовно патогенним паразитом: вона трапляється у фекаліях як здорових, так і хворих людей. Хоча, особливо в дітей раннього віку, відіграє певну роль у розвитку захворювань товстої кишки або ускладнює їх перебіг.

Географічне поширення: повсюдно.

Морфологія: форма овальна або грушоподібна, завдовжки 5-20 мкм. Ядро одне, міхуроподібне. Кількість джгутиків 3-5, вздовж усього тіла проходить ундулююча мембрана. Тіло пронизує опорний стрижень, що закінчується в задньому кінці шпичкою. Трихомонада активно рухається, обертаючись навколо поздовжньої осі.

Життєвий цикл: зараження людини відбувається через забруднену фекаліями воду або їжу. Локалізується трихомонада у товстій кишці, живиться осмотично рідкими рештками, бактеріями, яких захоплює клітинним ротом. Цист не утворює. Розмножується поздовжнім поділом. Вегетативні форми знаходять у фекаліях.

Лямблія (*Lambliа intestinalis*) – збудник лямбліозу

Географічне поширення: зустрічається повсюдно, особливо в країнах з жарким кліматом.

Морфологія: існує у двох формах:

1) трофозоїт (вегетативна форма) – грушоподібної форми, передній кінець розширений і заокруглений, задній – загострений. Довжина – 9-12 мкм, ширина – 8-10 мкм. Органели симетричні. Має 2 однакові ядра, 4 пари джгутиків, присмоктувальні диски для фіксації і два тонких аксостилі по середній лінії тіла. Рух активний, обертальний навколо поздовжньої осі. Їжу поглинає усією поверхнею тіла. Розмножується шляхом поздовжнього поділу. Умови цистоутворення остаточно не з'ясовані, можливо, відбувається в кислому середовищі.

2) циста – овальної форми, довжиною 10-14 мкм і шириною 6-10 мкм. Особливість – щільна оболонка, часто відшарована від цитоплазми. На стадії цисти паразит готується до поділу, тому ядра й органели подвоюються. Зріла циста має 4 ядра, розташовані зазвичай біля переднього полюсу. В цитоплазмі можуть бути залишки у вигляді джгутиків S-подібної форми і край присмоктувального диска.

Життєвий цикл: паразитує тільки в людини. Інвазійна форма – циста, потрапляє в організм через брудні руки, їжу і воду; механізм передачі фекально-оральний. Через 30 хв. після надходження в організм із цисти виходять 2 трофозоїти, що активно розмножуються; хвороба розвивається за умов проникнення в кишківник людини більше 100 цист.

Локалізація: слизова оболонка верхніх відділів тонкої кишки, особливо дванадцятипалої кишки (пристінкове розташування паразита). Утворення цист відбувається періодично. Цисти зберігаються інвазійними до місяця, при висиханні швидко гинуть.

Патогенна дія: лямблії подразнюють нервові рецептори слизової оболонки кишки, порушують процеси пристінкового травлення та всмоктування, особливо жирів і жиророзчинних вітамінів, сприяють розвитку запалення жовчного міхура і жовчних ходів, викликають токсично-алергічні процеси (результат всмоктування продуктів

обміну речовин лямблій і речовин, що утворилися внаслідок їх загибелі).

Клініка: інкубаційний період 10-15 днів. У дорослих переважає безсимптомне носійство лямблій.

Клінічні прояви можуть бути при масивній інвазії на фоні зниження шлункової секреції, недостатньої активності ферментів (зокрема, лактази) і зниженні рівня імуноглобулінів. Характерні періодична нудота і болі в животі, рідкі випорожнення. Температура тіла залишається нормальною. У дітей переважно спостерігається клінічно виражений лямбліоз. Болі в животі можуть бути інтенсивними, іноді виникають у нічний час і супроводжуються позивом на дефекацію («симптом будильника»). Апетит знижений, періодично нудота, блювота. Невротичні симптоми: слабкість, швидка втомлюваність, плаксивість, запаморочення, головні болі та болі в серці. Можуть бути алергічні прояви у вигляді шкірного свербіжжю, кропивниці, астматичних бронхітів.

Діагностика. Клінічна: нестійка дисфункція кишківника при малозміненому самопочутті і нормальній температурі тіла. Внаслідок безсимптомного носійства, в дорослих діагноз «лямбліоз» вірогідний тільки при ретельному обстеженні хворого і виключенні інших можливих причин захворювання. *Лабораторна:* в дуоденальному вмісті виявляють вегетативні форми, у фекаліях (нативні і пофарбовані розчином Люголя мазки) – цисти і вегетативні форми. Період інтенсивного виділення цист від 1-2 днів до двох тижнів чергується з таким же за тривалістю періодом їх відсутності. Тому дослідження проводять до 6-7 разів з проміжками 1-2 дні.

Лікування. Застосовують антипротозойні препарати: метронідазол, фуразолідон.

Профілактика. Особиста: дотримання санітарно-гігієнічних правил: миття рук, кип'ятіння води, захист продуктів від механічних переносників цист (мух і тарганів). *Громадська:* виявлення і лікування хворих та цистоносіїв (обстежують працівників харчових підприємств і дитячих установ); контроль санітарно-гігієнічного стану джерел водопостачання; знищення мух, тарганів; санітарно-просвітня робота.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання:

1. На таблицях та готових препаратах розглянути зовнішній вигляд та вивчити схему життєвого циклу:

- ▶ трипаносоми – збудника трипаносомозу;
- ▶ лейшманії – збудника лейшманіозу;
- ▶ трихомонади – збудника трихомонозу;
- ▶ лямблій – збудника лямбліозу.

Зарисувати:

1. Зовнішній вигляд трипаносоми, лейшманії, трихомонади, лямблій.
2. Схематично зарисувати життєві цикли трипаносоми та лейшманії.

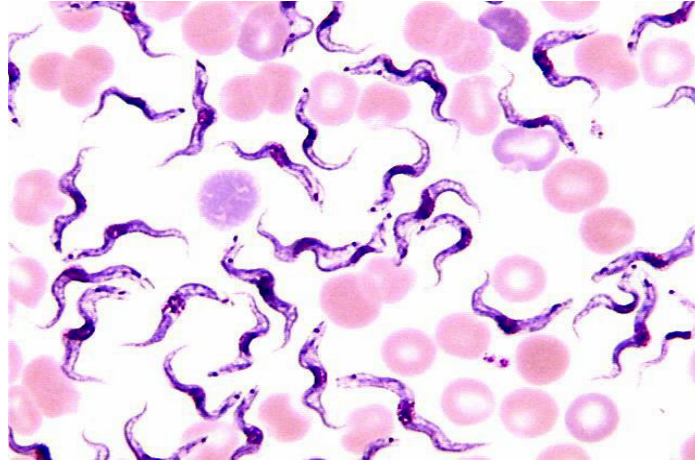


Рис. 9. Родезійська трипаносома (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) у мазку крові.



Рис. 10. Лейшманії (*Leishmania*), джгутикові форми.

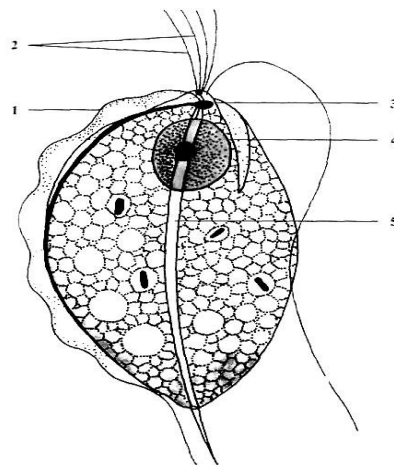


Рис. 11. Будова трихомонади: 1 – ундулююча мембрана; 2 – джгутики; 3 – блефаробласт; 4 – ядро; 5 – аксостиль.

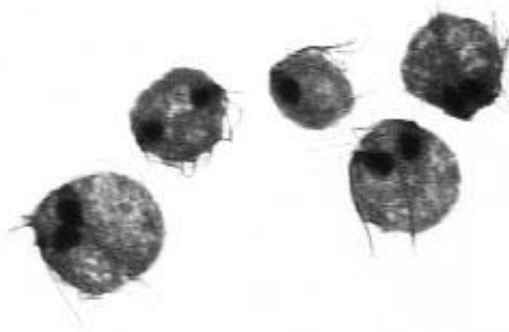


Рис. 12. Піхвова трихомонада (*Trichomonas vaginalis*), трофозоїти.

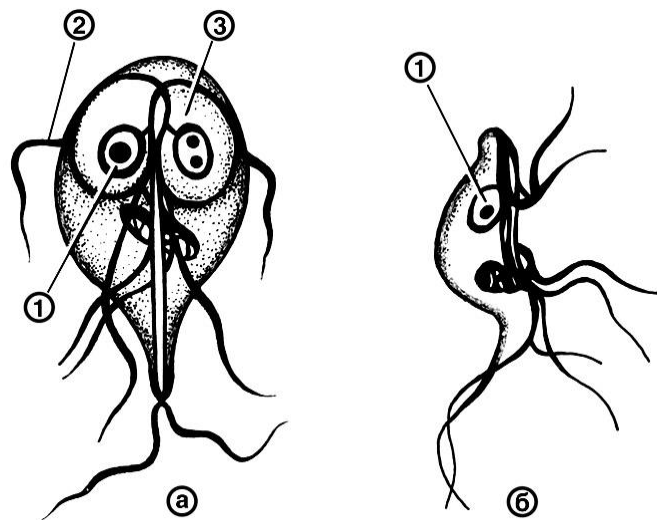


Рис. 13. Схематична будова вегетативної форми лямблій (а – вентральна поверхня лямблій, б – вигляд лямблій збоку): 1 – ядро; 2 – джгутик; 3 – присмоктувальний диск.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Загальна характеристика та класифікація паразитичних представників класу Тваринні джгутикові (*Zoomastigophora*).
2. Анатомо-морфологічні особливості, життєвий цикл збудників трипаносомозу та лейшманіозу.
3. Патогенна дія, клініка, лікування, профілактика, лабораторна діагностика трипаносомозу та лейшманіозу.
4. Анатомо-морфологічні особливості, життєвий цикл збудників трихомонозу та лямбліозу.
5. Патогенна дія, клініка, лікування, профілактика, лабораторна діагностика трихомонозу та лямбліозу.

Лабораторна робота № 9

ТЕМА: ПАРАЗИТИЧНІ ПРЕДСТАВНИКИ ТИПУ АПІКОМПЛЕКСНІ (APICOMPLEXA), КЛАСУ СПОРОВИКИ (SPOROZOA). РОЗПОВСЮДЖЕННЯ, МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ТОКСОПЛАЗМИ (TOXOPLASMA GONDII), МАЛЯРІЙНОГО ПЛАЗМОДІЮ (PLASMODIUM VIVAX, PLASMODIUM OVALE, PLASMODIUM MALARIAE). ЦИКЛИ РОЗВИТКУ, ШЛЯХИ ІНВАЗІЇ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА І ПРОФІЛАКТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗУ ТА МАЛЯРІЇ.

Мета роботи: Вивчити характерні особливості будови, життєвий цикл розвитку збудника токсоплазмозу – токсоплазми (*Toxoplasma gondii*), малярії – малярійного плазмодію (*Plasmodium vivax*). Ознайомитись із основними симптомами токсоплазмозу та малярії, лабораторною діагностикою, профілактикою захворювань.

Прилади і матеріали: таблиці, рисунки, мікроскопічні препарати токсоплазми та малярійного плазмодія.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Класифікація

Тип Апікомлексні (*Apicomplexa*)

Клас Споровики (*Sporozoa*)

Представники: Токсоплазма (*Toxoplasma gondii*), Малярійний плазмодій (*Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae*)

Токсоплазма (*Toxoplasma gondii*) – збудник токсоплазмозу

Географічне поширення: повсюдно.

Морфологія: в організмі людини існує у вигляді:

1) вегетативної форми (ендозоїт) – півмісяцевої форми, довжиною 4-7 мкм. Один кінець загострений, другий заокруглений. На загостреному передньому кінці знаходиться апарат проникнення у клітину хазяїна (апикальний комплекс) – коноїд (для прикріплення до клітини) і роптрії, що містять ферменти для розчинення клітинної мембрани. В центрі або на задньому полюсі клітини розташоване ядро. За методом Романовського – Гімзи ядро забарвлюється в червоно-фіолетовий колір, цитоплазма – в голубий.

2) справжні (тканинні) цисти – сферичні або овальні утворення, розміром 50-200 мкм, є скупченням кількох сотень ендозоїтів, оточених щільною захисною оболонкою.

Життєвий цикл: складний, зі зміною хазяїв та чергуванням статевого і безстатевого розмноження.

Проміжні хазяїни – ссавці, зокрема людина, багато видів птахів, рідше рептилії. *Остаточний хазяїн* – ссавці родини котячих. Людина заражається токсоплазмами при: - потраплянні ооцист у рот із брудних рук, немитих овочів і фруктів, шерсті кішок; - вживанні в їжу погано прожареного м'яса і некип'яченого молока від хворих тварин; - через ушкоджену шкіру при обробленні м'яса хворих тварин, лабораторних дослідженнях крові хворих; - трансплацентарно. В першому випадку *інвазійна стадія* – зріла ооциста, у всіх інших – ендозоїти і справжні цисти. В організмі проміжного хазяїна відбувається безстатеве розмноження паразита. Ендозоїти з кишківника проникають у лімфатичну систему, а згодом у клітини внутрішніх органів.

Локалізація: головний мозок, сітківка ока, серцевий і скелетні м'язи, лімфатичні вузли, печінка, легені та інші органи. В них ендозоїти поділяються навпіл або внутрішнім

брунькуванням, з утворенням 12-32 дочірніх клітин. Скупчення ендозоїтів усередині ураженої клітини називається псевдоцистою. Клітинна мембрана розривається, ендозоїти виходять і проникають у сусідні клітини. В цей період токсоплазма виділяється з екскретами організму (слиною, молоком, сльозами). При наростанні імунної відповіді організму токсоплазми починають утворювати справжні цисти. Вони зберігаються впродовж усього життя хазяїна і при зниженні імунітету можуть зумовлювати загострення захворювання. Таким чином, в організмі проміжного хазяїна (людини) можна знайти наступні стадії розвитку токсоплазм: *ендозоїти*, *псевдоцисти* в гострій стадії і *справжні цисти* в хронічній стадії хвороби. Остаточний хазяїн (кішка) зазвичай заражається, з'ївши м'ясо хворих тварин. У внутрішніх органах кішки відбувається безстатеве розмноження паразита, в епітелії тонкої кишки – статеве (тобто кішка є остаточним і проміжним хазяїном токсоплазми). У клітинах епітелію тонкої кишки відбувається ендогонія, потім гаметогонія. З ендозоїтів утворюються макро- і мікрогаметоцити, згодом гаплоїдні макро- і мікрогамети. Після їхнього злиття виникає зигота, що покривається товстою оболонкою (ооциста). Ооциста виділяється з фекаліями кішки у зовнішнє середовище, де зберігається роками. Всередині ооцисти у ґрунті за кілька днів формуються 2 спори, у кожній із яких 4 спорозоїти. При заковтуванні зрілої ооцисти заражаються остаточні і проміжні хазяїни.

Патогенна дія: пошкодження клітин хазяїна внаслідок розмноження токсоплазм у гострий період інвазії; звапняковані цисти в тканинах мозку і сітківці ока у хронічний період інвазії можуть призвести до сліпоти й ураження нервової системи.

Клініка. Залежно від механізму зараження розрізняють *набутий* і *уроджений* токсоплазмоз. *Набутий* токсоплазмоз може перебігати безсимптомно, зараження виявляється тільки імунологічними зрушеннями. Це найбільш частий варіант у осіб з нормальним імунітетом. При порушенні імунітету патологія прогресує, що проявляється лихоманкою, збільшенням лімфатичних вузлів (насамперед уражаються шийні і потиличні лімфовузли, рідше пахвові), ураженням нервової системи (енцефаліт, менінгоенцефаліт), серця, селезінки. При тривалому перебігу настає виснаження організму (слабкість, адинамія, погіршення апетиту, порушення сну, зниження пам'яті). Хвороба часто має хвилеподібний перебіг, коли клінічно виражені ознаки хвороби змінюються безсимптомним періодом. *Уроджений* токсоплазмоз виникає при інфікуванні плоду через плаценту. Розвивається зазвичай при зараженні жінки токсоплазмами під час вагітності. Прояв залежить від віку плоду на момент інфікування. При зараженні в першому триместрі вагітності відбувається викидень або народжується дитина з уродженими вадами розвитку, тяжким ураженням ЦНС та очей. Зараження у другому триместрі вагітності призводить до ураження внутрішніх органів і нервової системи. При зараженні плоду незадовго до народження розвивається гостра генералізована форма токсоплазмозу. В немовляти спостерігається лихоманка, збільшення лімфовузлів, збільшення селезінки, висипка на шкірі, запалення легень. Якщо хвороба закінчується видужанням, можуть зберегтися незворотні зміни нервової системи та очей (розумова відсталість, паралічі, епілептичні напади, запалення судинної оболонки та сітківки ока).

Діагностика. Клінічна: утруднена внаслідок розмаїтості клінічної картини. *Лабораторна:* мікроскопія мазків крові, пунктату лімфовузлів, центрифугату спинномозкової рідини, плаценти. *Біологічний метод* – зараження білих мишей матеріалом, взятим у хворого, і дослідження тканин та органів тварин через 10-12 днів. *Серологічні реакції:* внутрішньошкірна алергічна проба з токсоплазміном на даний час застосовується зрідка, тому що вона не дає характеристики біологічної активності процесу і малоспецифічна внаслідок високої алергізації населення впродовж останніх років. Остаточний діагноз ставиться на основі комплексу клінічних і лабораторних

досліджень. У дорослих хворих позитивні серологічні реакції на токсоплазмоз не завжди свідчать про хворобу. Вони можуть бути позитивні в 20-30 % здорових людей.

Лікування. Застосовують антипротозойні препарати: хлоридин та ін.

Профілактика. Особиста: кип'ятіння молока, термічна обробка м'яса, дотримання правил особистої гігієни, вагітним жінкам небажано тримати у житловому будинку кішок. *Громадська:* серологічне обстеження вагітних і лікування за необхідності (профілактика уродженого токсоплазмозу).

Малярійний плазмодій – збудник малярії

Для людини патогенними є чотири види малярійного плазмодія:

Plasmodium vivax – збудник триденної малярії; *Plasmodium ovale* – збудник *ovale-малярії* (малярія типу триденної); *Plasmodium malariae* – збудник чотириденної малярії; *Plasmodium falciparum* – збудник тропічної малярії.

Географічне поширення: в усіх країнах Африки і Середнього Сходу, Південно-Східної Азії, на островах Тихого океану, Центральній і Південній Америці (між 40° південної широти і 60° північної широти).

Морфологія: малярійний плазмодій проходить складний життєвий цикл з кількома стадіями розвитку.

В організмі людини виявляють декілька стадій.

Спорозоїт – інвазійна стадія; розміром 1x15 мкм, веретеноподібної форми.

Стадії, що проходять у клітинах печінки:

- *тканинний (передеритроцитарний) шизонт* – округлої форми, розміром 50-70 мкм;
- *тканинний мерозоїт* – діаметром близько 0,7 мкм, округлий або овальний, з ексцентрично розташованим ядром.

Стадії, що проходять у еритроцитах:

- *еритроцитарний трофозоїт* проходить у свою чергу наступні стадії розвитку:
 - *кільцеподібний трофозоїт* – займає не більше 1/3-1/5 діаметра еритроцита; при фарбуванні за методом Романовського – Гімзи в центрі трофозоїта знаходиться безбарвна вакуоля, цитоплазма розташована у вигляді обідка блакитного кольору, ядро темно-червоне;
 - *амебоподібний трофозоїт* – займає більше половини еритроцита, має нестандартну форму внаслідок появи псевдоніжок, рухомий; вакуоля зменшується, в цитоплазмі містяться зерна темно-коричневого пігменту, які утворилися внаслідок розщеплення гемоглобіну;
 - *зрілий трофозоїт* займає майже весь еритроцит, округлої форми; вакуоля маленька або відсутня; ядро велике, кількість зерен пігменту збільшується.
- *шизонт* характеризується ядром, що поділилося; навколо кожного дочірнього ядра відокремлюється цитоплазма з утворенням мерозоїтів. Пігмент виштовхується з цитоплазми і збирається в купку збоку від центру еритроцита;
- *мерозоїт* – нагадує за будовою тканинний, розміром близько 1,5 мкм;
- *жіночі і чоловічі гаметоцити* (макро- і мікрогаметоцити) – незрілі статеві клітини округлої форми (*Pl. falciparum* – півмісяцеві). Жіночі гаметоцити зовні нагадують зрілі трофозоїти, але більші за них набувають блакитного забарвлення. Чоловічі гаметоцити зазвичай менші за розміром, ніж жіночі, сірувато-блакитні, з великим пухким блідо-рожевим ядром, розташованим у центрі клітини.

Життєвий цикл. Для малярійного плазмодія характерний складний життєвий цикл зі зміною хазяїв і чергуванням статевого та безстатевого розмноження. *Проміжний хазяїн* – людина. *Остаточний хазяїн* і специфічний переносник – самка комара роду

Anopheles. Зараження людини відбувається при укусі самки комара роду *Anopheles*.

Інвазійна стадія – спорозоїт. Зі слиною комара спорозоїти потрапляють у кров'яне русло і через 30-40 хв. у *місце первинної локалізації* – клітини печінки. В цих клітинах вони проходять (прееритроцитарну) частину циклу розвитку. Вона відповідає інкубаційному періоду хвороби. В клітинах печінки розвивається стадія *тканинних шизонтів*. Тканинні шизонти збільшуються у розмірі та починають ділитись шляхом *шизогонії* (безстатеве розмноження паразита). З кожного шизонта виникає від 1000 до 5000 *тканинних мерозоїтів*, які руйнують гепатоцит і потрапляють у кров'яне русло. Тривалість цього періоду 6-9 діб, залежно від виду плазмодія. У *Pl. vivax* і *Pl. ovale* виявлені два різновиди спорозоїтів: *тахіспорозоїти* і *брадиспорозоїти (гіпнозоїти)*. Тахіспорозоїти починають свій розвиток одразу, брадиспорозоїти знаходяться у печінці в «дрімаючому» стані впродовж декількох місяців або років і зумовлюють пізні рецидиви триденної малярії.

Тканинні мерозоїти проникають в еритроцити і починається *еритроцитарна частина циклу розвитку*. В еритроцитах паразит послідовно проходить стадії кільця, амебоподібного і зрілого трофозоїта, шизонта і мерозоїта. У трофозоїта утворюється велика вакуоль, а цитоплазма і ядро розташовуються у викляді обдка по периферії. Паразит набуває форму кільця (*кільцеподібний трофозоїт*). При фарбуванні за методом Романовського – Гімзи цитоплазма зафарбовується у блакитний колір, а ядро – у темно-червоний. Після цього вакуоль зменшується, кількість цитоплазми збільшується, утворюються псевдоподії (*амебоподібний трофозоїт*). Після того як плазмодій розростається на стільки, що займає весь еритроцит, він втягує псевдоподії і набуває округлої форми (*зрілий трофозоїт*). Ядро плазмодія послідовно ділиться декілька разів, утворюючи від 12 до 20 (як правило 16) ядер. Навколо ядер відокремлюється цитоплазма – формуються *мерозоїти*.

Після утворення мерозоїтів еритроцит розривається, у кров'яне русло потрапляють продукти життєдіяльності плазмодія, оболонки еритроцитів та інші токсичні речовини, а мерозоїти, що вивільнилися, проникають у нові еритроцити. Тривалість періоду еритроцитарної шизогонії складає 48 год для *Pl. vivax*, *Pl. ovale*, *Pl. falciparum* і 72 год – для *Pl. malariae*. Після накопичення певної кількості збудника у хворого починаються напади малярії. При триденній малярії (*Pl. vivax* і *Pl. ovale*) напади повторюються кожних 48 год (через день), при чотириденній (*Pl. malariae*) – кожні 72 год (через 2 дні). При тропічній малярії синхронності в закінченні еритроцитарної шизогонії немає, тому лихоманка постійна, неправильна. Зараження також можливе при переливанні крові, трансплацентарно. Інвазійними в цьому випадку будуть еритроцитарні стадії розвитку паразита (крім гаметоцитів).

Після декількох циклів еритроцитарної шизогонії з еритроцитах починається *гаметогонія* – утворюються мікро- і макрогаметоцити. Вони є інвазійними для комара, і, якщо не потраплять у його організм, гинуть через кілька днів. *Гаметоцити* разом з кров'ю хворого потрапляють у шлунок комара і дозрівають, утворюючи гаплоїдні гамети. Чоловічі гаметоцити змінюються більш суттєво: їхнє ядро ділиться на 8 частин, з цитоплазми утворюється відповідна кількість джгутикоподібних ниток, що відокремлюються і вільно плавають у шлунку комара (ексфлагеляція). Чоловічі і жіночі гамети зливаються з утворенням зиготи (статеве розмноження). Через 18-24 год. вона стає рухомою, утворює оокінету, що проходить крізь стінку шлунка комара, і на його зовнішній поверхні перетворюється в ооцисту. Всередині ооцисти проходить *спорогонія* – процес утворення безлічі (кількох тисяч) спорозоїтів. Згодом оболонка ооцисти розривається, спорозоїти з течією гемолімфи потрапляють у слинні залози самки комара.

Процес розвитку плазмодія в організмі комара продовжується 7–45 діб, залежно від температури навколишнього повітря.

Патогенна дія: розвиток малярійного нападу як реакції організму на дію пірогенних білків, що вивільняються при руйнуванні уражених еритроцитів; розвиток анемії внаслідок розпаду еритроцитів; аутоімунні процеси.

Клініка. Інкубаційний період близько 7-20 днів, іноді довше. Потім розвивається первинна (свіжа) малярія. Характеризується типовими нападами лихоманки. Напад проходить зі зміною трьох послідовних фаз:

1) фаза «ознобу» – починається з підвищення температури до 39-40°C, шкіра холодна, шорстка («гусяча шкіра»), губи синюшні, може бути нудота і блювота; тривалість фази від 3-40 хв. до 2-3 годин;

2) фаза «жару» – характеризується збереженням високої температури, наростає головний біль, болі у м'язах; з'являється відчуття жару, шкіра гаряча на дотик; продовжується 3-4 години;

3) фаза потовиділення – температура швидко знижується до норми або нижче норми, виражене потовиділення; самопочуття поліпшується, але зберігається загальна слабкість, настає тривалий глибокий сон.

Загальна тривалість малярійного нападу від 6 до 14 годин. Після декількох нападів збільшуються і стають болючими печінка та селезінка. Внаслідок масового розпаду еритроцитів розвивається анемія. Шкіра хворого набуває характерного блідо-жовтого кольору, може бути сіруватою внаслідок відкладання малярійного пігменту. За кілька тижнів напади припиняються. У хворих, які не одержали лікування, після короткого безпропасного періоду (кілька днів – 2-3 місяці) настають ранні рецидиви, зумовлені розмноженням збережених у кров'яному руслі паразитів. За клінічними проявами ранні рецидиви подібні до первинної малярійної атаки.

Діагностика. Клінічна: характерна лихоманка, збільшення селезінки, анемія. *Лабораторна:* виявлення паразитів у мазку і товстій краплі крові (у товстій краплі проглядається більший об'єм крові, внаслідок чого ймовірність знайти паразита значно вища, для визначення виду збудника зручніше досліджувати мазок крові). Дослідження проводять під час нападу і в міжнападний період 2-3 доби підряд. Максимальна кількість паразитів знаходиться в першій краплі крові. *Серологічні методи:* РІФ, РНГА та ін. Ці методи з основному застосовуються для обстеження донорів і підтвердження раніше перенесеної малярії.

Лікування. Застосовують протималярійні препарати: хлорохін-фосфат (делагіл) та ін.

Профілактика. Особиста: захист від укусів комарів, профілактичний прийом протималярійних препаратів. *Громадська:* оздоровлення місцевості за допомогою меліоративних заходів, знищення комарів та їх личинок за допомогою інсектицидів, розведення біологічних ворогів комарів, виявлення і лікування хворих.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання:

На таблицях, готових препаратах ознайомитися з зовнішнім виглядом і циклом розвитку токсоплазми – збудника токсоплазмозу, малярійного плазмодія – збудника малярії.

Зарисувати:

Субмікроскопічну будову та цикли розвитку токсоплазми і малярійного плазмодію.

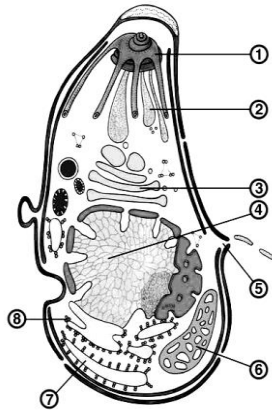


Рис. 14. Схема ультраструктури токсоплазми (спорозоїта):
 1 – коноїд, 2 – роптрії, 3 – комплекс Гольджі, 4 – ядро, 5 – ультрацитосом (пора), 6 – мітохондрія, 7 – ендоплазматичний ретикулум, 8 – рибосома.

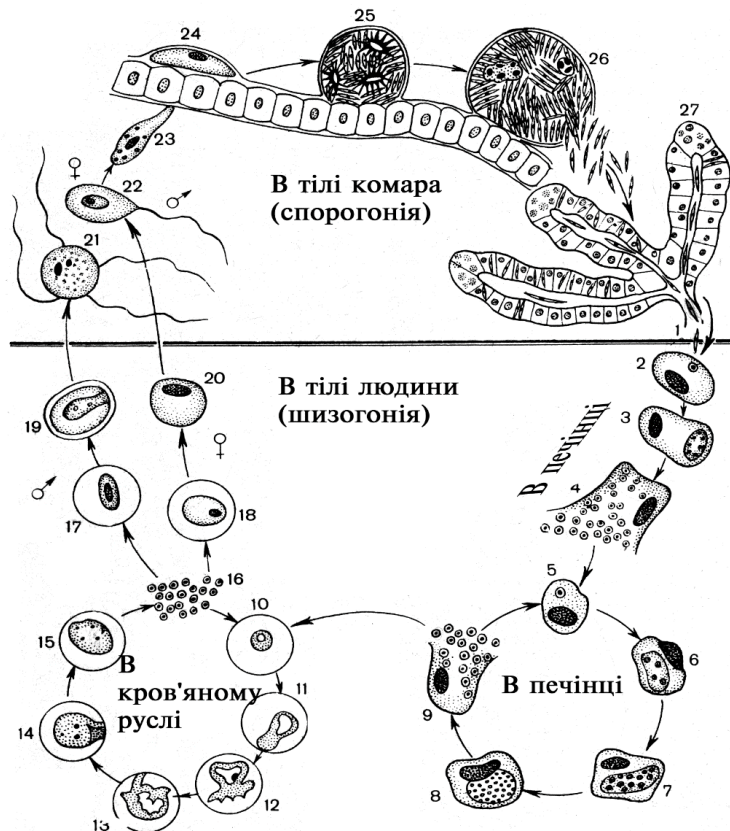


Рис. 15. Цикл розвитку збудника триденної малярії:
 1 – спорозоїт, що виходить із слинної залози в слину комара; 2-4 – розвиток спорозоїта в клітині печінки; 5-9 – розвиток наступного покоління; 10-15 – розвиток усередині еритроциту; 16 – шизогонія; 17 та 19 – мікрогаметоцити; 18 та 20 – макрогаметоцити; 21 – утворення мікрогамет; 22 – копуляція макро- і мікрогамет; 23 – оокінета; 24-25 – утворення ооцисти на стінках шлунка комара; 26 – розрив зрілої ооцисти та вихід спорозоїтів; 27 – спорозоїти в слинній залозі.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Морфологічні особливості, розповсюдження, класифікація, життєвий цикл, будника токсоплазмозу.
2. Патогенна дія, лабораторна діагностика, лікування та профілактика токсоплазмозу.
3. Географічне поширення, морфологічні особливості, життєвий цикл малярійного плазмодія.
4. Патогенна дія, лабораторна діагностика, профілактика та можливості лікування малярії.

Лабораторна робота № 10

ТЕМА: ТИП ПЛОСКІ ЧЕРВИ (*PLATHELMINTHES*). ХАРАКТЕРИСТИКА, КЛАСИФІКАЦІЯ, ЖИТТЄВІ ЦИКЛИ, МЕДИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПАРАЗИТИЧНИХ ПРЕДСТАВНИКІВ ІЗ КЛАСУ СТЬОЖКОВІ ЧЕРВИ (*CESTOIDEA*) – НЕОЗБРОЄНОГО ЦІП'ЯКА (*TAENIARHYNCHUS SAGINATUS*), ОЗБРОЄНОГО ЦІП'ЯКА (*TAENIA SOLIUM*), КАРЛИКОВОГО ЦІП'ЯКА (*HYMENOLEPIS NANA*).

Мета роботи: Вивчити основних паразитів людини з класу Стьожкових червів, збудників теніаринхозу, теніозу, гіменолепідозу.

Прилади і матеріали: таблиці, рисунки, препарати паразитичних представників із класу *Cestoidea*.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Класифікація

Тип Плоскі черви (*Plathelminthes*)

Клас Стьожкові черви (*Cestoidea*)

Представники: Неозброєний (бичачий) ціп'як (*Taeniarhynchus saginatus*), Озброєний (свинячий) ціп'як (*Taenia solium*), Карликовий ціп'як (*Hymenolepis nana*).

Неозброєний (бичачий) ціп'як (*Taeniarhynchus saginatus*) – збудник теніаринхозу

Географічне поширення: зустрічається повсюдно. Частота захворювання переважає в Центральній Європі, на території колишнього Радянського Союзу, на півночі Африки, Південній Америці.

Морфологія. Статевозріла особина близько 5-6 метрів довжиною (може досягати довжини 12-20 м), складається із 1000-2000 члеників. Сколекс округлий, 1-2 мм діаметром, має 4 пігментовані присоски. Шийка коротка і тонка. Гермафродитний членик має дволопатевої яєчник. Зрілі членики прямокутної форми, розміром 20-30 x 12 мм, довжина членика перевищує ширину (3:1-4:1). Матка закритого типу, розгалужена у вигляді стовбура, від якого з кожного боку відходять 17-35 бічних відгалужень, містить до 150000 яєць. Кінцеві членики здатні до активного руху.

Яйця округлої форми, мають зародок – онкосферу з трьома парами гачків. Онкосфера оточена двоконтурною радіально посмугованою товстою оболонкою жовтаво-коричневого кольору (ембріофор). Зовнішня оболонка яйця тонка, безбарвна, в яєць, що виділилися, дуже швидко руйнується.

Фіна типу цистицерк (*Cysticercus bovi*), відрізняється від фіни свинячого ціп'яка меншими розмірами (7,5-10 X 4-6 мм) і має вигляд просяного зернятка.

Життєвий цикл: неозброєний ціп'як – біогельмінт. *Остаточний хазяїн* – людина. *Локалізація* в тілі остаточного хазяїна – тонка кишка.

Проміжний хазяїн – велика рогата худоба. В зовнішнє середовище членики виділяються з фекаліями хворого або активно виповзають через задній прохід. Велика рогата худоба заражається, поїдаючи забруднену яйцями траву. В травному тракті проміжного хазяїна онкосфери вивільнюються, проникають у кровоносні судини і з течією крові потрапляють у міжм'язову сполучну тканину скелетних м'язів, серцевий м'яз, язик. Через 7 місяців після зараження фіни є інвазійними для людини і зберігають інвазійність до 2-х років. Людина заражається, з'ївши погано термічно оброблену фінозну яловичину.

Інвазійна стадія – цистицерк. У кишківнику сколекс паразита вивертається, прикріплюється до стінки кишківника і починається ріст стробіли. Через три місяці ціп'як досягає статевої зрілості. Тривалість життя – близько 10 років. Розвиток фін в організмі людини неможливий.

Патогенна дія: внаслідок виділення паразитом антипротеолітичних ферментів порушується травлення та всмоктування; призводить до схуднення; механічне ураження слизової оболонки кишківника органами фіксації.

Клініка. Інкубаційний період – від 8 до 10 тижнів. Іноді єдиною скаргою хворих є виділення члеників ціп'яка під час дефекації. Однак (особливо в дітей та осіб, ослаблених іншими захворюваннями) можуть бути нудота, блювота, запаморочення, біль у животі, роздратованість, холецистит, панкреатит.

Діагностика. Клінічна: виділення члеників з фекаліями і виявлення їх. *Лабораторна:* гельмінтоскопія фекалій, вид паразита визначають за кількістю відгалужень матки (від 17 до 35); овоскопія зішкрібка з періанальних складок або виявлення яєць за допомогою методу «липкої стрічки». Виявлення тільки яєць не дозволяє розрізнити озброєного і неозброєного ціп'яків.

Лікування. Застосовують протиглистяні препарати (празиквантел).

Профілактика. Особиста: дотримання правил особистої гігієни, ретельна термічна обробка яловичини. *Громадська:* контроль яловичини на ринках і бойнях перед продажем, попередження фекального забруднення навколишнього середовища, санітарно-просвітня робота.

Озброєний (свинячий) ціп'як (*Taenia solium*) – збудник тениозу

Географічне поширення: повсюдно. Частота захворювання більша в Південній і Східній Африці, Південній і Центральній Америці, на території СНД.

Морфологія. Статевозріла особина близько 2-3 м довжиною, має до 1000 члеників. Сколекс округлий, 1-2 мм у діаметрі, має 4 присоски і хоботок з подвійним віночком гачків. На сколексі розміщені залози, секрет яких полегшує прикріплення до слизової оболонки кишківника хазяїна. Особливість гермафродитних члеників – трилопатевий яєчник (дві основні частки й одна дрібна додаткова частка).

Зрілі членики прямокутної форми, розміром 12-15 x 6-7 мм, довжина членика перевищує ширину (2:1). Містить розгалужену матку, що має вигляд стовбура, від якого з кожного боку відходять 7-12 пар бічних гілок. Матка закритого типу (позбавлена вивідного отвору), кожний членник містить 30000-50000 яєць.

Яйця за будовою подібні до яєць неозброєного ціп'яка.

Фіна типу цистицерк (*Cysticercus cellulosae*) має вигляд прозорого пухирця розміром з рисову зернину (17-20 x 7-10 мм), молочно-білого кольору. Заповнена рідиною з високим вмістом альбуміну і солей. Всередину пухирця завернутий сколекс,

що просвічує у вигляді білої крапки.

Життєвий цикл: озброєний цїп'як – біогельмінт. *Остаточний хазяїн* – тільки людина. *Локалізація* статевозрілої особини: тонка кишка. *Проміжний хазяїн* – домашні і дикі свині, рідше собаки, кішки, мавпи. Проміжним хазяїном може також бути людина, у якої розвивається цистицеркоз. З фекаліями хворого в зовнішнє середовище пасивно виділяються 5-6 зрілих члеників, що відірвалися від стробіли. Свині заражаються, поїдаючи фекалії хворого або зараженого яйцями цїп'яка. В травному тракті проміжного хазяїна онкосфери вивільняються і за допомогою гачків проникають у кровоносні судини кишкової стінки. З кров'ю вони заносяться у міжм'язову сполучну тканину, де через 2-2,5 міс. формуються цистицерки. В організмі свині цистицерки зберігаються живими до 2-х років, а пізніше гинуть і звапнюються. Людина заражається теніозом, з'ївши погано термічно оброблену фінозну свинину.

Інвазійна стадія – цистицерк. У кишківнику під дією травних ферментів сколекс вивертається, прикріплюється до його стінки і починається ріст стробіли. Через 2,5-3 міс. після зараження паразит досягає статевої зрілості. Тривалість життя – до 25 років. Теніоз може ускладнюватися цистицеркозом, при якому людина є проміжним хазяїном свинячого цїп'яка. Інвазійна стадія в такому випадку – яйце. Потрапляє в організм людини при випадковому заковтуванні яєць із брудних рук, із зараженою водою і їжею або при потраплянні зрілих члеників у шлунок під час блювоти. Онкосфери, що звільнилися під дією ферментів, проникають у кров і розносяться по тілу, потрапляють в очі, головний мозок, серцевий м'яз, де через 2-4 міс. перетворюються в цистицерки.

Патогенна дія: подібна до теніаринхозу.

Клініка. Здебільшого хвороба перебігає безсимптомно, проявляється тільки виділенням члеників з фекаліями. В інших випадках пацієнтів турбує головний біль, слабкість, зниження або підвищення апетиту, голодні болі в животі, нудота, блювота, пронос, що змінюється запором. Дуже рідко спостерігається механічна кишкова непрохідність. Клінічні прояви цистицеркозу дуже різноманітні і залежать від локалізації цистицерків. Цистицеркоз м'язів і підшкірної клітковини зазвичай проходить непоміченим. Цистицеркоз мозку може виявлятися: епілептичними нападами, підвищенням внутрішньочерепного тиску та ін. Цистицеркоз очей призводить до зниження гостроти зору, а в тяжких випадках – до сліпоти та атрофії ока. Цистицеркоз серця проявляється порушенням серцевого ритму.

Діагностика. Клінічна: виділення члеників з фекаліями. *Лабораторна:* гельмінтоскопія фекалій. Вид паразита визначають за кількістю відгалужень матки (7-12); при руйнуванні члеників можливе виявлення яєць гельмінта (овоскопія). Овоскопія не дозволяє розрізнити озброєного і неозброєного цїп'яків, тому при використанні цього методу діагностики ставиться узагальнений діагноз – теніїдоз. Діагностика цистицеркозу важка внаслідок різноманітної клінічної картини. Допомагають рентгенографія черепа, УЗД, комп'ютерна томографія, офтальмоскопія та ін. Специфічна лабораторна діагностика – серологічні реакції.

Лікування. За два-три дні до початку лікування рекомендують дієту з обмеженням жирів і грубої клітковини, очисні клізми з метою максимального спорожнювання просвіту кишки. Використовують протиглистяні препарати обережно, щоб не викликати нудоту і блювоту, що може призвести до ускладнення – цистицеркозу.

Профілактика. Особиста: дотримання правил особистої гігієни, ретельна термічна обробка свинини. *Громадська:* контроль свинини на ринках і бойнях перед продажем, попередження фекального забруднення навколишнього середовища, санітарно-просвітня робота.

Карликовий цїп'як (*Hymenolepis nana*) – збудник гіменолепідозу

Географічне поширення: повсюдно.

Морфологія. Статевозріла особина білого кольору, довжиною 10-45 мм, складається із 100-300 члеників. Сколекс має чотири присоски та втяжний хоботок з одним віночком із 20-30 гачків. Гермафродитні членики мають три кулястих сім'яники, розташованих в один ряд. Яєчник витягнутий у довжину, дволопатекий, за ним розміщений непарний жовтвник. Зрілі членики широкі і короткі (0,22 x 0,5-1,0 мм), мають мішкоподібну матку, в якій від 100 до 200 яєць.

Яйця округлі або овальні (50 x x 40 мкм), прозорі, з тонкою двоконтурною оболонкою. У центральній частині яйця знаходиться безбарвна округла онкосфера. Вона має свою власну оболонку і три пари гачків, розташованих паралельно або під невеликим кутом один до одного. Між оболонками яйця й онкосфери помітні довгі ниткоподібні придатки – філаменти, що відходять по шість від кожного полюса онкосфери. *Фіна* – цистицеркоїд.

Життєвий цикл: людина є остаточним і проміжним хазяїном карликового цїп'яка.

Локалізація в тілі остаточного хазяїна – тонка кишка.

Інвазійна стадія – яйце. Зараження відбувається при заковтуванні яєць із брудних рук. У тонкій кишці онкосфери вивільнюються, проникають усередину ворсинок тонкої кишки і перетворюються в фіну. Через 4-6 діб цистицеркоїди руйнують ворсинки; цїп'яки, що виходять, прикріплюються до стінки кишки і за 2-3 тижні досягають статевої зрілості. Весь життєвий цикл карликового цїп'яка триває близько місяця. Із зрілих яєць онкосфери можуть виходити у просвіт кишківника, починаючи новий цикл розвитку (аутоінвазія). При недотриманні правил особистої гігієни можливе повторне зараження хазяїна (аутореінвазія). Внаслідок цих процесів кількість паразитів у хазяїна може досягати декількох сотень.

Патогенна дія. Ураження слизової оболонки внаслідок дії ферментів онкосфер і механічне зруйнування ворсинок кишківника цистицеркоїдами; порушення процесів травлення і всмоктування в тонкій кишці, розвиток дисбактеріозу.

Клініка. Хворіють в основному діти. При невеликій кількості паразитів хвороба проходить безсимптомно. При інтенсивній інвазії характерні зниження апетиту, нудота, непостійні випорожнення. Можуть бути болі в животі, алергічні висипки.

Діагностика. Клінічна: поєднання непостійної діареї і токсично-алергічних явищ.

Лабораторна: овоскопія свіжовиділених фекалій, тому що яйця цїп'яка швидко руйнуються і деформуються в зовнішньому середовищі. Дослідження повторюють тричі з інтервалом 5-7 днів внаслідок непостійного виділення яєць при невеликому ступені інвазії.

Лікування. Застосовують протиглистяні препарати.

Профілактика. Особиста: дотримання правил особистої гігієни. *Громадська:* профілактичне обстеження дітей у дитячих садках і школярів молодших класів, працівників дитячих садків і харчових підприємств. При виявленні хворих обстежують усіх членів родини. Виконання вимог санітарного режиму в дитячих установах, боротьба з гризунами, санітарно-просвітня робота.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання 1.

На рисунках розглянути особливості зовнішнього вигляду ціп'яка неозброєного (*Taeniarrhynchus saginatus*), ознайомитися і вивчити будову сколекса, члеників та цикл розвитку ціп'яка неозброєного.

Зарисувати:

Морфологічну будову та схему життєвого циклу ціп'яка неозброєного.

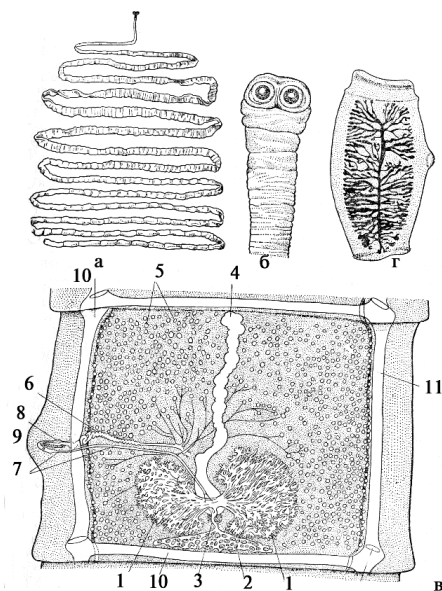


Рис. 17. Морфологія ціп'яка неозброєного:

a – зовнішній вигляд ціп'яка; *б* – сколекс; *в* – гермафродитна проглатида; *г* – зріла проглатида; 1 – яєчник, 2 – жовтківник, 3 – тільце Меліса, 4 – матка, 5 – сім'яники, 6 – сім'япровід, 7 – піхва, 8 – цирусна сумка, 9 – статева клоака, 10 – канали видільної системи, 11 – нервовий стовбур.

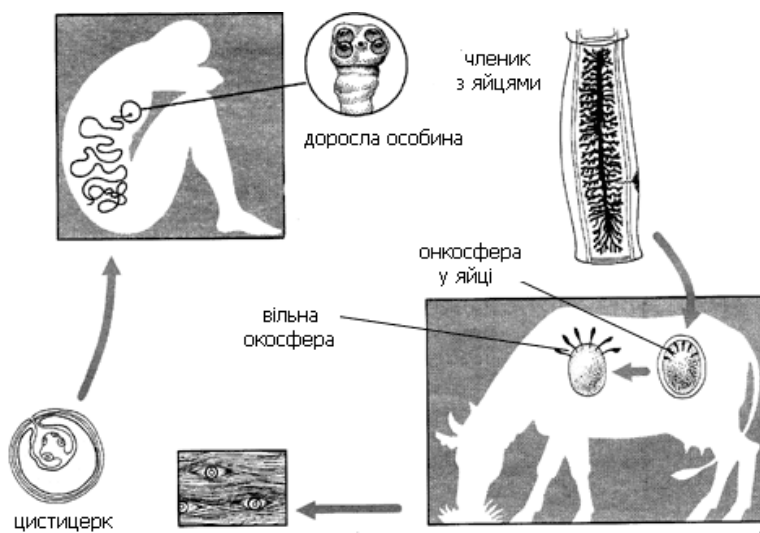


Рис. 18. Життєвий цикл ціп'яка неозброєного.

Завдання 2.

На рисунках розглянути особливості зовнішнього вигляду ціп'яка озброєного (*Taenia solium*), ознайомитись і вивчити будову сколекса, члеників та цикл розвитку ціп'яка озброєного.

Зарисувати:

Морфологічну будову та схему життєвого циклу цїп'яка озброєного.

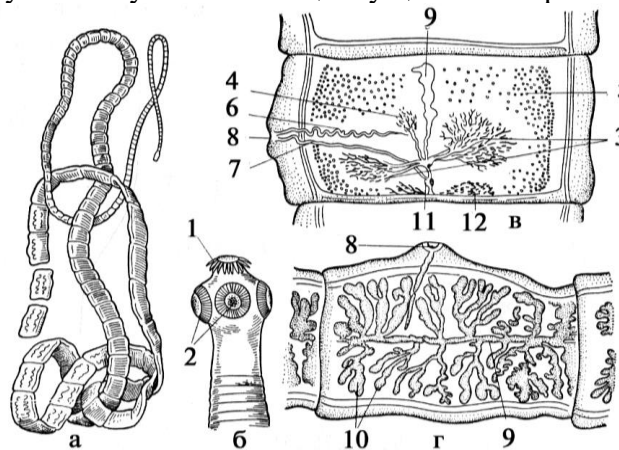


Рис. 19. Морфологія цїп'яка озброєного:

а – стробїла; *б* – сколекс; *в* – гермафродитна проглотида; *г* – зріла проглотида; 1 – гачки на сколексї; 2 – присоски; 3 – яєчник; 4 – третя (додаткова) долька яєчника; 5 – сїм'яники; 6 – сїм'япровїд; 7 – піхва; 8 – цирусна сумка; 9 – головний стовбур матки; 10 – бокові відгалуження матки; 11 – тїльце Мелїса; 12 – жовтївник.

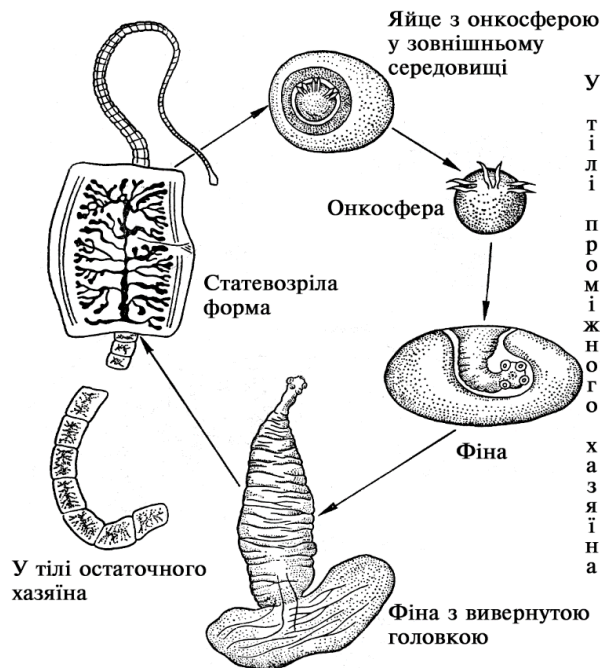


Рис. 20. Цикл розвитку цїп'яка озброєного.

Примїтка. Проміжний хазяїн: домашні та дикі свинї, рїдко собаки, кїшки, мавпи; остаточний хазяїн: тїльки людина.

Завдання 3.

На рисунках розглянути особливостї зовнішнього вигляду та цикл розвитку цїп'яка карликового (*Hymenolepis nana*).

Зарисувати:

Морфологічну будову та схему життєвого циклу цїп'яка карликового.

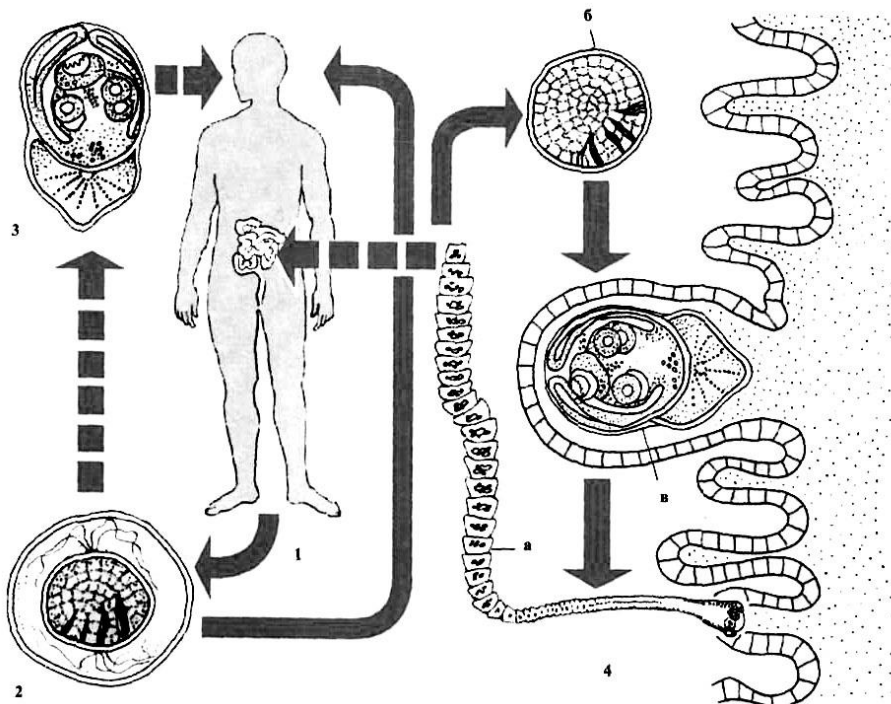


Рис. 21. Життєвий цикл ціп'яка карликового:
1 – людина – остаточний та проміжний хазяїн; 2 – яйце; 3 – цистицеркоїд; 4 – життєвий цикл карликового ціп'яка в кишках людини без виходу у зовнішнє середовище (а – доросла особина, б – онкосфера, в – фіна).

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ:

1. Анатомо-морфологічні особливості та життєвий цикл ціп'яка незброєного.
2. Патогенна дія збудника, клініка, лабораторна діагностика, лікування та профілактика теніаринхозу.
3. Анатомо-морфологічні особливості та життєвий цикл ціп'яка озброєного.
4. Патогенна дія збудника, клініка, лабораторна діагностика та профілактика теніозу.
5. Анатомо-морфологічні особливості та життєвий цикл ціп'яка карликового.
6. Патогенна дія збудника, клініка, лабораторна діагностика, лікування та профілактика гіменолепідозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Власенко В. В. Практикум з мікробіології / В. В. Власенко, І. В. Березовський. – Вінниця, 2005. – 200 с.
2. ГОСТ 18963-73. Вода питна. Методи санітарно-бактеріологічного аналізу.
3. ГОСТ 21237-75. М'ясо. Методи бактеріологічного аналізу.
4. ГОСТ 9958-81. Вироби ковбасні і продукти із м'яса. Методи бактеріологічного аналізу
5. Екологія мікроорганізмів: Навчальний посібник./[Кривцова М.В., Ніколайчук М.В.]. – Ужгород: Гражда, 2011. – 204 с.
6. Закон України N 4004-XII (4004-12) від 24.02.94 р. Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення.
7. Закон України N 771/97-ВР |від 23.12.97 р. Про якість та безпеку харчових продуктів і продовольчої сировини.
8. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник / за ред. В. П. Широбокова. – 2-е вид. – Вінниця Нова книга, 2011. – 952 с.
9. Методичні вказівки „Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води”. Затв. наказом МОЗ України, № 60 від 3.02.05.
10. Мікробіологія. Навчально-методичний посібник/[Петросова В.І., Кривцова М.В., Сікура А.О., Бобрик Н.Ю.].– Ужгород: Говерла, 2015.– 220 с.
11. Мікробіологія. Практикум. (2006). Т.М. Фурзікова, М.Г. Сергійчук, В.В. Власенко, Ю.В. Швець, В.К. Позур, ред. Київ: Фітосоціоцентр.
12. Мікробіологія / [В. В. Власенко, І. Г. Власенко, І. В. Березовський та ін.]. –Вінниця : Едельвейс і К, 2011. – 200 с.
13. Мікробіологія : практик. для лабор. робіт / [В. В. Власенко, І. Г. Власенко, В. В. Блащук та ін. / [– Вінниця : Едельвейс і К, 2010. – 100 с.
14. Мікробіологія м'яса та м'ясопродуктів : практикум / [В. В. Власенко, В. Г. Скибіцький, І. Г. Власенко та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2008. – 132 с.
15. Мікробіологія молока та молочних продуктів : підручник / [В. Г. Скибіцький, В. В. Власенко, М. В. Мельник та ін.]. – Вінниця : Едельвейс і К, 2008. – 412 с.
16. Харченко С. М. Мікробіологія / С. М. Харченко. – К. : Сільгоспосвіта, 1994. – 350 с.
17. Basic medical microbiology (2018). P.R. Murray. Elsevier.
18. Medical microbiology: A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control.nineteenth edition (2019). M.R. Barer, W. Irving, A. Swann, N. Perera. Elsevier.
19. Medical microbiology. Eighth edition (2016). P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, Elsevier. UK standarts of Microbiology Investigations.

Identification of Staphylococcus Species, Micrococcus and Rothia Species (2014). Public Health England.

20. Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., Joloba, M.L., NajjukaKateete, F.C. (2010) Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 9(23), 7 p.

21. Murray P. R. Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed / P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller. – Washington: ASM Press, 2015. – 848 p.

22. Medical Microbiology, 18th Ed. with studentconsult online access / D. Greenwood, R. C. B. Slake, M. Barer, L. Irving. – Churchill Livingstone, 2012. – 794 p.