

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»

**Робочий зошит**  
**з дисципліни**  
**“МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ”**  
**Для студентів спеціальності «Медицина»**  
**Частина I:**  
**“МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ”**

**Студента/ки 2 курсу**

---

(ім'я та прізвище)

---

(номер групи)

**Київ – 2022**

Александрова І.В., Довгий Р.С., Сіромолот А.А., Рудик М.П., Юмина Ю.М., Файдюк Ю.В., Степура Л.Г., Сківка Л.М. Робочий зошит дисципліни «МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ» для студентів спеціальності «Медицина» Частина I “МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ”. – Київ: [електронне видання], 2022. – 72 С.

Рецензенти:

Білявська Л.О. – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотого НАН України;

Нікольський І.С. – доктор медичних наук, професор, завідувач лабораторії імунології відділу клітинних і тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини ДУ “Національний науковий центр “Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України”.

Робочий зошит було розглянуто та затверджено на засіданні науково-методичної комісії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Протокол № 2, від «13» жовтня 2022 р.

## Практичне заняття №1

### ОРГАНІЗАЦІЯ І ПРАВИЛА РОБОТИ У МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. МЕТОДИ МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

#### Правила роботи в навчальній мікробіологічній лабораторії

У мікробіологічних лабораторіях працюють з матеріалом, що містить мікроорганізми. У зв'язку з цим необхідно дотримуватись правил роботи, які забезпечують її стерильність і запобігання можливості виникнення внутрішньолабораторних заражень:

#### *Категорично забороняється:*

1. Заходити до лабораторії у головних уборах та верхньому одязі.
2. Перебувати та працювати у лабораторії без халатів та шапочок, випускати з-під спецодягу волосся, комірці і т.п.
3. Палити та вживати їжу.
4. Вносити до лабораторії сторонні речі.
5. Класти на столи портфелі, сумки чи інші сторонні предмети.
6. У мікробіологічній лабораторії не допускаються різкі рухи та сторонні розмови. Виконання цих вимог запобігає потраплянню мікроорганізмів із повітря та ротової порожнини у досліджуваний матеріал

#### *Обов'язки студентів та чергових групи під час роботи у лабораторії*

1. До лабораторії можна входити у халаті і шапочці.
2. Кожний студент повинен працювати на своєму робочому місці.
3. Робоче місце необхідно утримувати в чистоті.
4. Матеріал для практичної роботи одержує черговий у фахівця навчальної лабораторії і роздає студентам групи в присутності викладача.
5. Використані в роботі інфіковані матеріали, пробірки з культурами бактерій необхідно знезаразити, для чого черговий здає відпрацьований матеріал у лаборантську.
6. Якщо випадково розіб'ється посуд з заразним матеріалом, чи розіллється рідкий заразний матеріал, студент повинен негайно сповістити викладача і разом з ним знезаразити інфіковане місце.
7. Після закінчення роботи студент повинен: здати черговому матеріал, одержаний на початку заняття; здати весь відпрацьований матеріал, який підлягає знезараженню, а також свої посіви у термостат; привести в порядок робоче місце, продезінфікувати його; вимити руки дезінфікуючим розчином і милом.

8. Черговий студент контролює порядок на робочих місцях студентів у групі і здає у лаборантську все, що одержав для роботи на початку заняття.
9. Забороняється викидати сміття будь-якого походження у раковину. Слід використовувати надані контейнери.
10. Переконайтеся, що всі пальники вимкнені при завершенні лабораторної роботи. Переконайтеся, що ручки на всіх виходах газу знаходяться у вимкненому положенні.
11. Інокуляційну петлю слід нагрівати до червоного кольору до і після використання.
12. Завжди поміщайте пробірки з культурою, поживним бульйоном або агаром у штатив у вертикальному положенні. Не кладіть їх на стіл і не опирайте на інші об'єкти. Вони можуть упасти на підлогу і розбитися. Усі штативи з культурами, які треба інкубувати, повинні мати такі позначення: 1) ініціали (або прізвище студента) і номер групи, 2) зразок (назва організму або кількість невідомих) і 3) дата. При використанні чашок Петрі ці позначення слід писати на денці, а не на кришці. До того часу поки не вказано інші етапи роботи, всі чашки мають бути перевернуті догори дном, всі пробірки повинні мати щільно вставлені пробки.
13. Відвідування лабораторних занять є обов'язковим.

***Практична робота 1. Ознайомитись з асептичною технікою в мікробіології, правилами роботи з пальником Бунзена. Опанування методів роботи зі світловим мікроскопом***

**Матеріали** (на групу студентів): пальники Бунзена, петлі, порожні пробірки з пробками / ковпачками, порожня чашка Петрі, імерсійна олія, 96% розчин етанолу, мікроскопи, постійні препарати дріжджів і бактерій.

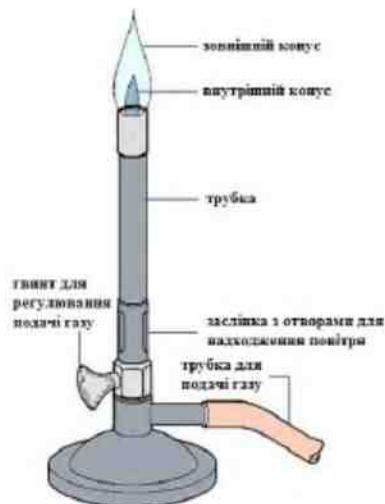
**Хід роботи:**

**Завдання 1:** *Вивчити асептичну техніку в мікробіології.*

**Крок 1.** Практика правильної роботи з пальником Бунзена.

**Пальник Бунзена**, пристрій для поєднання вогненебезпечного газу з керованими кількостями повітря до займання.

За допомогою пальника Бунзена отримують відкрите полум'я з двома областями: первинне полум'я, маленький внутрішній конус, - бліде синє полум'я; і вторинне полум'я, майже безбарвне полум'я, помітне як більший, зовнішній конус. Зовнішнє полум'я має температуру 1500 ° С. Важливо дотримуватися правил безпеки при роботі з пальником Бунзена.



**Рис 1.1. Головні частини пальника Бунзена**

**!!! Перед початком роботи з вогнем улабораторії, переконайтеся що:**

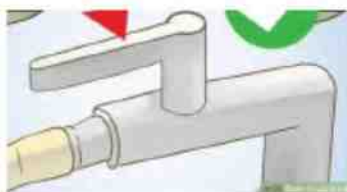
- довге волосся зав'язане ззаду у пучок.
- рукава сорочки не висять вниз.

**!!!Тримайте пальник за його основу (після того, як пальник загорівся, сам пальник буде занадто гарячим для тримання)**

**!!!Ніколи не залишайте пальник Бунзена запаленим без нагляду.**

### **Початок роботи з пальником Бунзена**

1. Перевірте, що ручка стоп-клапану крана знаходиться в положенні «перекрито» і газ не подається до пальника.
2. Відкрийте основний клапан газозабезпечення. Поверніть ручку поставки газу так, щоб він знаходився паралельно шлангу постачання.



**Рис 1.2. Положення крана газозабезпечення у відкритому стані**

3. Відкрийте клапан, що поставляє газ, розташований біля вашого робочого місця.
4. Запаліть сірник, відкрийте кран і запаліть пальник Бунзена.
5. Відрегулюйте полум'я. Якщо пальник горить, кран основи може регулювати висоту полум'я. Полум'я повинно бути відрегульовано так, щоб було блакитне чисте полум'я навколо внутрішнього синього конусу.

!!!! Якщо ви повинні залишити палик, з будь-якої причини, загасіть полум'я шляхом повороту ручки газового крану до положення «закрито».

7. Поверніть кран, розташований поблизу газозабезпечення в положення «перекрито». Поверніть ручку клапана перпендикулярно лінії газу і шланга.

!!!Перш ніж ви залишаєте лабораторію, перевірте чи ви вимкнули газ.



**Рис 1.3.** Положення крана газозабезпечення у перекритому стані

### **Крок 2.** Стерилізація бактеріальної петлі.

Бактеріальні петлі стерилізують в полум'ї пальника Бунзена до і після використання. Петлі повинні бути нагріті до червоного кольору, щоб упевнитися, що будь-які мікроорганізми та їх спори знищені. Ручка бактеріальної петлі розміщується близько до верхівки полум'я майже вертикально. Мізинець залишається вільним, щоб захопити пробку пробірки або пляшки.



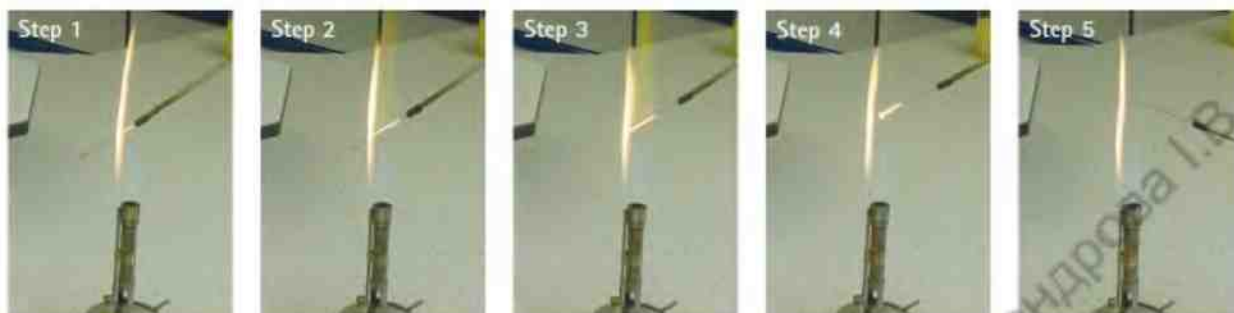
**Рис 1.4.** Положення бактеріологічної петлі в руці при стерилізації

### **Техніка прокалювання бактеріологічної петлі у полум'ї пальника**

Нагрівання кінця петлі повинно бути поступовим, тому що після використання вона містить культуру, яка може "розбризкатись" при швидкому нагріванні з можливістю вивільнення дрібних частинок культури і утворення аерозолі.

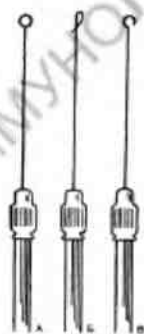
1. Розташуйте кінець дроту у світло-блакитному конусі полум'я. Це прохолодна частина полум'я.
2. Переведіть решту дроту повільно в найгарячішу область полум'я (безпосередньо над світло-блакитним конусом).

3. Тримайте там, поки дріт не стане червоним.
4. Переконайтеся, що повна довжина дроту нагріта до червоного кольору.
5. Дайте охолонути, а потім негайно використовуйте.
6. Не кладіть петлю і не махайте нею навколо.
7. Повторно стерилізуйте петлю відразу після використання



**Рис.1.5. Етапи стерилізації бактеріологічної петлі в полум'ї пальника**

Якщо петля не набирає рідину - петля не замкнена. Щоб це виправити, спочатку простерилізуйте петлю і потім зігніть петлю пінцетом. Не використовуйте ваші пальці через можливість проколювання шкіри.

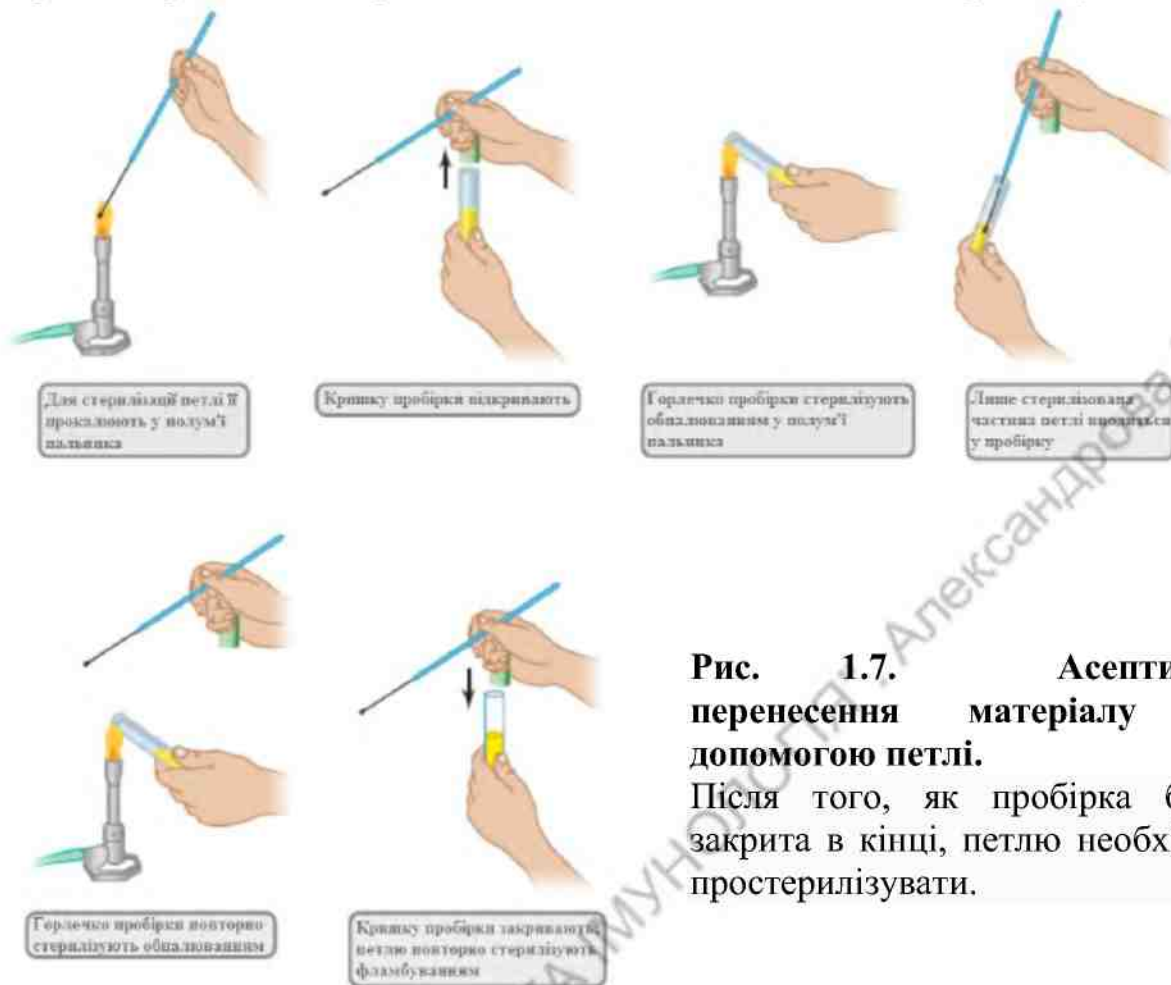


**Рис. 1.6. Бактеріологічні петлі (Позначення: А – виготовлена вірно; Б, В – невірно)**

### **Крок 3. Практика відкривання стерильних пляшок і пробірок**

1. Ослабте пробку так, щоб вона могла бути легко видалена.
2. Візьміть пробірку у ліву руку.
3. Вийміть пробку/кришку пляшки/пробірки мізинцем правої руки. (Поверніть пляшку а не пробку)
4. Не кладіть пробку/ кришку / ватно-марлеву пробку на стіл.
5. Проведіть горлечко пляшки/ пробірки вперед і назад через полум'я пальника Бунзена.
6. Після виконання необхідних процедур, наприклад посіву культури, закрийте пробку пляшки.

**Крок 4.** Практика використання петлі в асептичній техніці (рис. 1.7).



**Рис. 1.7.** Асептичне перенесення матеріалу за допомогою петлі.

Після того, як пробірка буде закрита в кінці, петлю необхідно простерилізувати.

**Крок 5.** Практика утримування та відкривання чашки Петрі однією рукою.

**Крок 6.** Практика правильного вимикання пальника Бунзена .

**Крок 7.** Ознайомтесь зі структурою автоклава, сухожарової шафи, інкубатора, бактеріальних фільтрів.

### ПРИМІТКИ відносно стерильних методів

Ви будете працювати з багатьма видами патогенних бактерій в лабораторії. Тому, ви повинні вчитися завжди працювати стерильно, захищаючи себе і оточуючих вас людей, а також уникати забруднення культури.

Пам'ятайте, що бактерії знаходяться у повітрі, на шкірі, робочому столі, і всіх об'єктах і устаткуванні, що не були стерильними.

Найбільш важливий інструмент для перенесення культур - це бактеріологічна петля, якою роблять пересів. Петлю можна швидко простерилізувати шляхом нагрівання до почервоніння у полум'ї пальника Бунзена. Суху петлю стерилізують шляхом проведення її під кутом 30° через зовнішню частину полум'я. Волога петля з бактеріями на ній повинна спочатку

бути проведена через внутрішню частину полум'я, щоб уникнути розбризкування, і потім нагріта в гарячій зовнішній частині полум'я. Завжди прожарюйте петлю в полум'ї безпосередньо перед і після використання! Дозвольте їй охолонути, перш ніж збиратимете посівний матеріал бактерій. Якщо петля розбризкує агар або бульйон, це свідчить, що вона занадто гаряча. Тримайте петлю за спеціальну ручку подібно олівцю.

**Завдання 2:** Розглянути фіксовані препарати бактерій та дріжджів із застосуванням світлового мікроскопу та замалювати

### **Використання світлового мікроскопа**

Мікроорганізми включають бактерії, гриби, найпростіші і мікроскопічні водорості. З огляду на різницю в розмірах їх спостерігають за допомогою різних методів збільшення і приготування зразків.

### **Бактерії і дріжджі**

Дріжджі можна побачити в нефарбованих вологих препаратах при збільшенні  $\times 100$ . Бактерії набагато менші і їх можна побачити незабарвленими на збільшенні  $\times 400$ , але тільки якщо мікроскоп правильно налаштований, і можна спостерігати рухливість. Збільшення  $\times 1000$  і використання імерсійного об'єктиву застосовують для дослідження забарвлених препаратів, необхідних для того, щоб побачити морфологію бактерій та деякі внутрішні структури клітини. Отримана інформація, разом з описом колоній, є відправною точкою для ідентифікації родів і видів, але потрібна подальша робота з фізіології, біохімії та молекулярної біології.

### **Цвілеві гриби**

Міцелій і спори цвілевих грибів можна спостерігати в нефарбованих вологих препаратах при збільшенні  $\times 100$ . Ідентифікація цвілевих грибів заснована на описі морфології колоній і міцелію та спор в мікроскопічних препаратах.

### **Найпростіші і водорості**

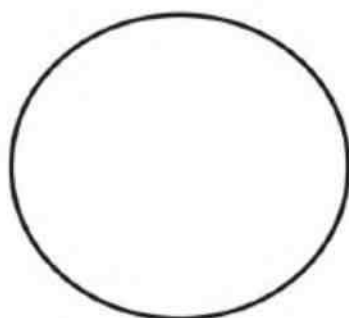
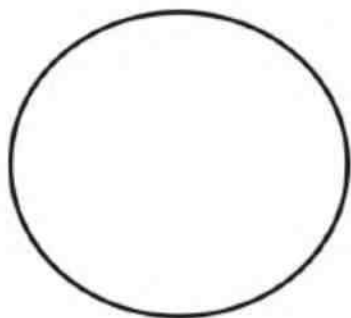
Найпростіші і водорості є великими організмами і тому легко помітні при збільшенні від 10 до 100 в нефарбованих вологих препаратах. Збільшення  $\times 100$  використовують для спостереження за природними зразками, які містять різноманітні організми. Ідентифікація водоростей і найпростіших заснована на їх мікроскопічному зовнішньому вигляді.

### **Підказки**

Відрегулюйте діафрагму, щоб досягти оптимального балансу між зображенням і відблисками.

Для перегляду вологих препаратів живих найпростіших, водоростей, дріжджів, налаштуйте об'єктив малої потужності ( $\times 10$ ), за необхідністю переведіть об'єктив на більш високу потужність ( $\times 40$ ), а потім тонко повторно фокусуйте.

Для вивчення забарвлених препаратів бактерій використовуйте об'єктив для імерсійної олії. Нанесіть на препарат одну краплю олії; покривне скло не потрібно. Зніміть препарат і витріть лінзу від масла в кінці роботи.



фарбування

збільшення

морфологія

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Яких заходів безпеки потрібно дотримуватися під час роботи з пальником Бунзена?
2. Як стерилізують бактеріологічні петлі, металеві пінцети, скляний посуд?
3. Чому стерилізують бактеріальну петлю безпосередньо перед та після використанням?
4. Чим відрізняється вибір агарових і бульйонних культур?
5. Який тип мікроскопа використовується в цій практичній роботі?
6. Який тип об'єктивної лінзи використовується для спостереження за бактеріальними клітинами?

**Література до практичної роботи 1:** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 1-52.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 2

### МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ СВІТЛОВОЇ МІКРОСКОПІЇ. ПРОСТІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ

#### **Практична робота 2. Вивчення морфології бактерій та грибів. Виготовлення фіксованих препаратів. Прості методи фарбування**

**Матеріали** (на лабораторну групу ): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, тканина, що не містить волокна, фуксиновий барвник, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, імерсійна олія, фломастер, прищепки, культури *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus megaterium*, постійні препарати дріжджів і бактерій.

#### **Хід роботи:**

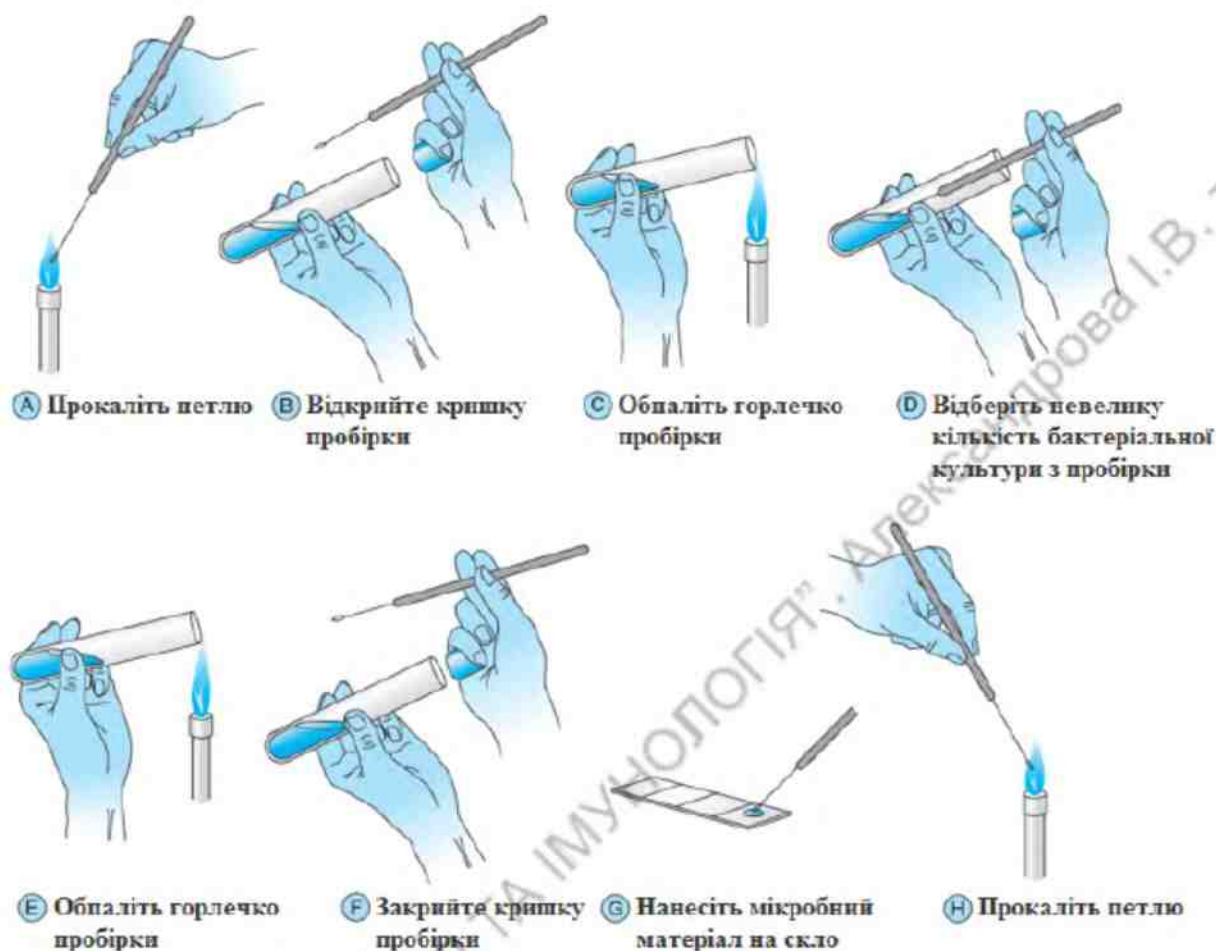
**Завдання 1:** Виготовити препаративні фіксовані мазки з різних агарових культур та дослідити їх морфологію за допомогою світлового мікроскопа. Зробити висновок про їх морфологічні ознаки (форма, розмір, розташування, здатність до агрегації). Переглянути постійні препарати бактерій різної форми. Замалювати.

**Крок 1.** Запаліть пальник Бунзена.

**Крок 2.** Дотримуючись правил асептики, виготовіть фіксовані препарати трьох наданих культур мікроорганізмів : *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus megaterium* дотримуючись наступної процедури (рис.2.1):

1. знежиріть додатково предметне скло; для цього його необхідно натерти шматком сухого господарського мила та витерти насухо марлевою серветкою;
2. із зворотного боку скла олівцем (фломастером) по склу позначіть межі майбутнього препарату та його номер;
3. прокаліть і охолодіть петлю. Нанесіть за допомогою петлі на скло краплю стерильної дистильованої води;
4. прокаліть і охолодіть петлю. Відіберіть невелику кількість бактеріальної культури з поверхні щільного середовища за допомогою петлі із дотриманням умов стерильності та внесіть у краплю води на склі;
5. розподіліть мікробний матеріал на склі рівномірним шаром у вигляді мазка правильної форми (округлої чи квадратної), площею

- 1,5-2 см<sup>2</sup>; площа розподілу бактеріальної суспензії буде залежати від її густини;
6. простерилізуйте петлю;



**Рис.2.1. Відбір проби з бактеріальної культури**

*Якщо препарат роблять з рідкої культури або проб, використання стерильної води для підготовки мазка буде непотрібним.*

7. висушіть виготовлений препарат за кімнатної температури на повітрі, помістивши предметне скло на місток кристалізатора;
8. зафіксуйте підсушений препарат жаром у полум'ї пальника; для цього скло затисніть за допомогою пінцета (прищепки) і, тримаючи скло препаратом догори, тричі проведіть через полум'я пальника; для запобігання спалення бактерій, скло над полум'ям слід тримати не більше 3-4 секунд (рис.2.2);

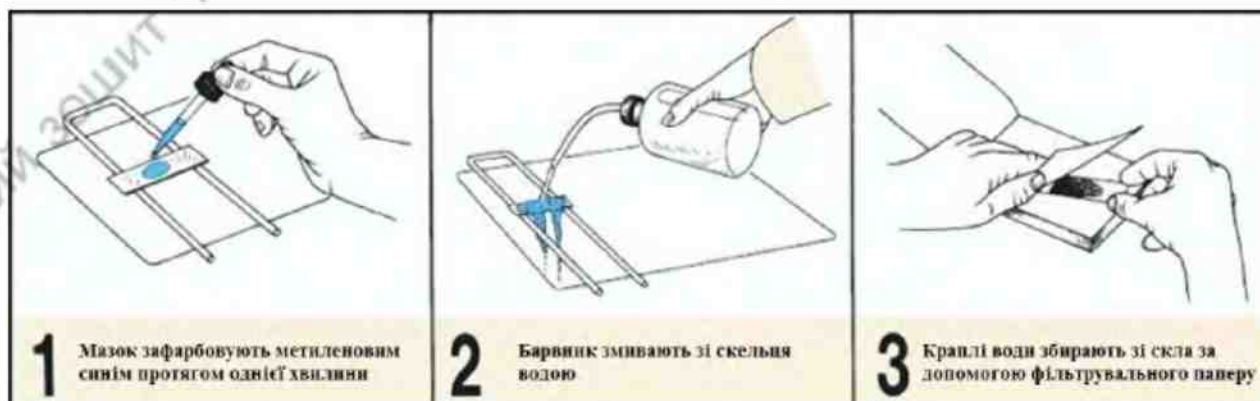


**Рис 2.2. Фіксація жаром препаративного мазка**

**Крок 3** Вимкніть пальник Бунзена

**Крок 4** Пофарбуйте препарат фуксином (рис. 2.3):

1. помістіть зафіксований препарат на місток лотка для фарбування
2. нанесіть безпосередньо на мазок краплю водно-спиртового розчину фуксину основного і витримати протягом 3 хвилин;
3. змийте барвник із препарату легким струменем води над кристалізатором, притримуючи предметне скло прищепкою або пінцетом; промивання препарату слід проводити до тих пір, поки вода, що стікає з мазка, не стане прозорою;
4. висушіть препарат на повітрі, зібравши частину води зі скла за допомогою фільтрувального паперу;



**Рис 2.3. Процес фарбування мазка**

**Крок 5.** розгляньте препарат під мікроскопом, використовуючи імерсійний об'єктив. Встановіть мікроскоп; підніміть тубус з об'єктивами:

- 1) Помістіть краплю імерсійної олії на досліджуваний мазок.
- 2) Поверніть імерсійний об'єктив в робоче положення.
- 3) Обережно опустіть об'єктив, спостерігаючи збоку, поки кінцева лінза об'єктиву не зануриться в олію і не торкнеться препарату
- 4) Налаштуйте світло діафрагмою, дивлячись через окуляр. За допомогою макрогвинта обережно піднімайте оптичну систему, дивлячись в окуляр, доки предмет не стане чітким.
- 5) Потім сфокусуйте зображення за допомогою мікрогвинта, який обережно повертайте, щоб опустити оптичну систему.

**Крок 6.** Закінчивши, помістіть препарат в спеціальну ємність з дезінфікувальним розчином для відпрацьованих скелець.

**Крок 7.** Замалюйте свої спостереження в зошит.

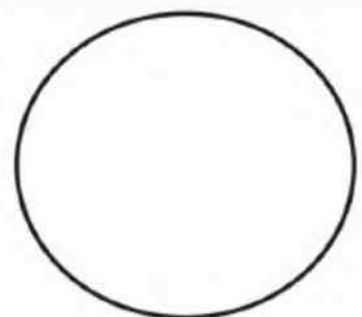
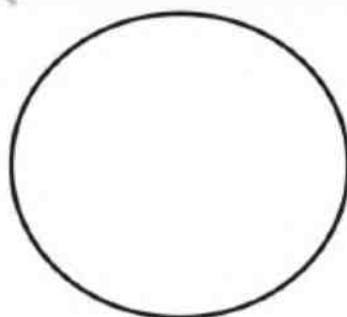
**Завдання 2:** Вивчити морфологію різних бактерій та грибів за допомогою забарвлених мазків та постійних препаратів

**Крок 1.** Розгляньте препарати бактерій різної форми та дріжджів.

**Крок 2.** Розгляньте препарати різних грибів

**Крок 3.** Замалюйте свої спостереження

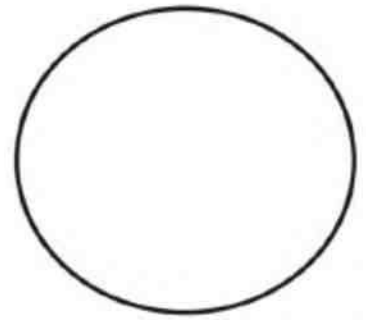
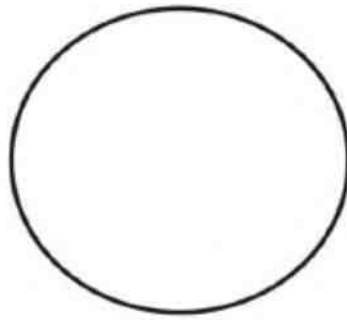
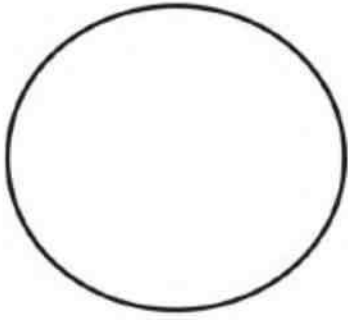
**Крок 4.** Зробіть висновок про їх морфологічні ознаки (форма, розмір, розташування, здатність до агрегації).



фарбування

збільшення

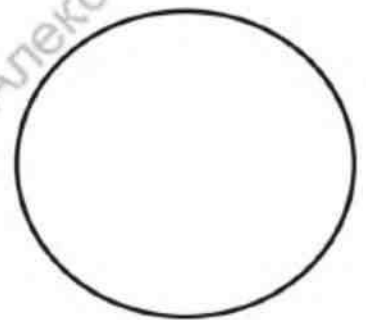
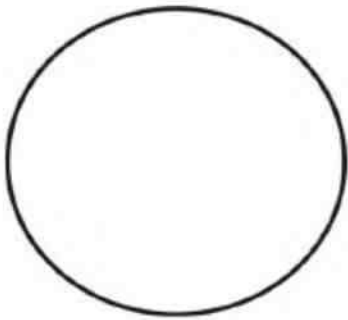
морфологія



фарбування

збільшення

морфологія



фарбування

збільшення

морфологія

**Висновок:**

---

---

---

---

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Які методи використовуються для вивчення бактеріальної морфології?
2. Які методи використовуються для вивчення морфології актиноміцетів?
3. Який тип об'єктивів використовується для дослідження актиноміцетів?
4. Яким чином досліджують морфологію актиноміцетів?

5. Які методи використовуються для вивчення морфології грибів?
6. Який тип об'єктивів використовується для мікроскопії грибів?
7. Як можна визначити рід більшості клінічних форм?
8. Які методи використовують для вивчення морфології дріжджів?
9. Які методи використовуються для вивчення найпростіших?
10. Як ви фіксували препаративний мазок в цій лабораторній роботі?
11. Який барвник ви використовували для простого фарбування бактеріального мазка?

**Література до практичної роботи 2 :** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 54-85.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 3

### ФАРБУВАННЯ КЛІТИН ЗА ГРАМОМ. КОМПЛЕКСНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ БУДОВИ КЛІТИННОЇ СТІНКИ БАКТЕРІЙ

#### Практична робота 3. Опанування методу фарбування за Грамом

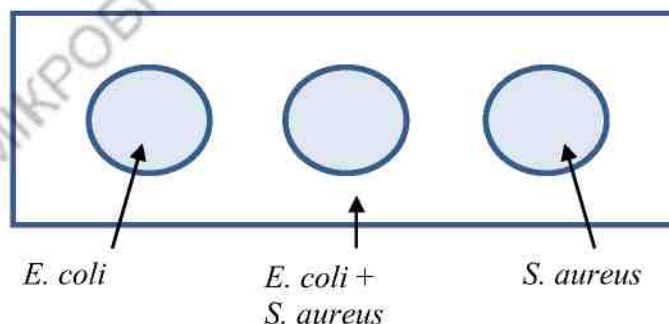
**Матеріали** (на лабораторну групу ): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, безволокниста тканина, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, імерсійна олія, 96% розчин етанолу, мікроскопи, фломастер, прищепки, культури на агаризованому середовищі *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; Розчин А (кристалічний фіолетовий) [пробірка А]; Йодовий розчин Люголя [пробірка L]; суміш етанолу + діетилового ефіру [пробірка E]; водний розчин сафранину (0,5% (мас. / об.)) [пробірка S].

#### Хід роботи:

**Завдання 1:** Приготувати фіксовані препарати з чистих бактеріальних культур та їх суміші, пофарбувати за методом Грама, дослідити під мікроскопом і зробити висновок щодо фарбування

**Крок 1.** Запаліть пальник Бунзена на робочому місці (заняття 1).

**Крок 2.** Дотримуючись вимог асептичної техніки (заняття 1), приготуйте три препаративні мазки на одному склі: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та їх суміш посередені:



**Крок 3.** Вимкніть пальник Бунзена і перекрийте подачу газу, якщо ви закінчили попередній крок.

**Крок 4.** Зафарбуйте мазки за допомогою диференціального методу Грама  
**Фарбування бактерій за Грамом**

1. Покладіть предметне скло з фіксованими мазками на місток лотка для фарбування.
2. Нанесіть 1-2 краплі розчину А (фіолетовий розчин ген ціанового фіолетового) і залишіть на 1 хвилину.
3. Тримайте скло за допомогою пінцета або прищепки (необов'язково, але уникайте зафарбованих пальців) під кутом  $45^\circ$  над лотком і вилийте фарбу, змиваючи її водою (протягом 5 секунд).
4. Нанесіть 1–2 краплі йодного розчину Люголя на мазок, витримайте протягом 1 хв. Йодний розчин діє як «морилка» (компонент, який допомагає фарбі утримуватись в клітинах), утворюється фіолетово-йодний комплекс, і мазок виглядає чорним.
5. Нанесіть кілька крапель суміші етанол + діетиловий ефір і витримайте протягом 1 хв - це етап знебарвлення. Препарат необхідно ретельно знебарвити, поки краплі, що стікають, не стануть прозорими (а не фіолетовими). Тож якщо краплі все-таки фіолетові, знову нанесіть пару крапель суміші і повторіть.
6. Тримайте скельце пінцетом під кутом  $45^\circ$  над лотком і змийте його водою (протягом 5 секунд).
7. Нанесіть 1-2 краплі розчину S (сафраніну), витримайте протягом 1 хв для фарбування клітин, у яких вимився попередній барвник.
8. Промийте препарат водою.
9. Просушіть мазок фільтрувальним папером без волокон, натискаючи зверху.

### **Модифікація фарбування бактерій за Грамом за методом Синьова:**

- 1) покладіть на поверхню усіх трьох мазків смужки фільтрувального паперу, заздалегідь насиченого карболовим розчином генціанового фіолетового та висушених (модифікація Синьова), налейте на них 2-3 краплі води і щільно притисніть папір до мазків. Зафарбуйте протягом 2-3 хвилин;
- 2) зніміть фільтрувальний папір, злийте фарбу і, не промиваючи препарат водою, нанесіть на мазки розчин Люголя на 1-2 хвилини;
- 3) злийте розчин Люголя і на препарат нанесіть 1-2 краплі 96%-го етилового спирту, витримайте його протягом 30-60 секунд, злийте;
- 4) швидко промийте препарат водою;
- 5) зафарбуйте додатково всі три мазки водно-спиртовим розчином фуксину протягом 30-40 секунд для контрастного фарбування грамнегативних бактерій;
- 6) промийте препарат водою, висушіть і промікрископіюйте з імерсією.

## Модифікація фарбування бактерій за Грамом за методом Бюрка:

- 1) нанесіть на кожний із трьох мазків по 2-3 краплі розчину А (1%-ний водний розчин кристалічного фіолетового), по 1 краплі розчину В (1%-ний розчин натрію двовуглекислого) і витримайте протягом 2 хвилин;
- 2) відмийте препарат йодною протравою Бурке (тримаючи предметне скло під нахилом для рівномірного стікання барвника), після чого нанесіть свіжу протраву і витримайте протягом 2 хвилин;
- 3) промийте препарат слабким струменем води, тримаючи предметне скло під нахилом;
- 4) підсушіть предметне скло навколо препарату фільтрувальним папером, але мазок залишіть вологим;
- 5) препарат знебарвіть розчинником (суміш етилового ефіру та ацетону), наносячи його краплями на нахилений препарат доти, поки у розчиннику, який стікає, не зникне фарба;
- 6) підсушіть препарат на повітрі;
- 7) зафарбуйте додатково усі три мазки 2% водним розчином сафраніну протягом 30-40 секунд;
- 8) промийте препарат водою, висушіть на повітрі.

**Крок 5.** Промікроскопіруйте препарати з імерсією.

**Крок 6.** Закінчивши, покладіть скельця в ємність для відпрацьованих скелець.

Грампозитивні бактерії - **ФІОЛЕТОВІ**

Грамнегативні бактерії - **ЧЕРВОНІ**

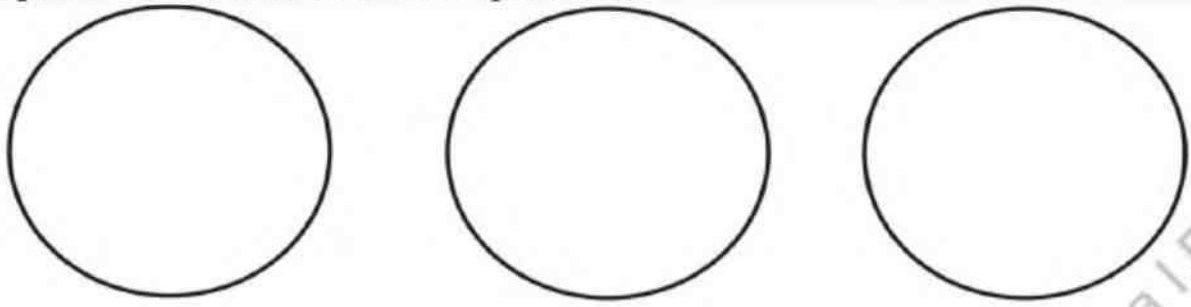
Дріжджі можуть забарвлюватись фіолетовими або червоним, але це не має таксономічного значення.

### **Важливо!**

- *Завжди використовуйте молоду культуру (не більше, ніж доба культивування), оскільки старі культури грампозитивних бактерій, як правило, втрачають здатність утримувати кристало-фіолетово-йодний комплекс і виявляються грамнегативними; але деякі бактерії природно лише слабо грампозитивні*
- *Необхідно ретельно оцінювати тривалість обробки органічними розчинниками (спиртом), оскільки надмірне знебарвлення вимиває кристалічно-фіолетовий комплекс із грампозитивних бактерій, і вони детектуватимуться як грамнегативні.*
- *Мазок має бути нанесений рівномірним шаром, інакше спирт продовжуватиме вимивати фіолетовий колір від товстих частин мазка, тоді як тонкі частини надмірно знебарвляться.*
- *В кінці знебарвлення перевірте, чи не зміло маркування спиртом.*

- Не впадайте у відчай, якщо забарвлений мазок не видно неозброєним оком; це може статися із грамнегативною реакцією.

**Крок 7.** Замалюйте свої спостереження:



фарбування

збільшення

морфологія

Грам+/Грам-

**Висновок:** \_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Яка мета використання йоду у методі фарбування за Грамом?
2. Який найважливіший етап методу фарбування за Грамом?
3. Що застосовують для знебарвлення у методах фарбування за Грамом?
4. Який барвник використовується в якості первинного барвника за методом Грама?
5. Який барвник використовують в якості вторинного за методом Грама?
6. Чому грампозитивні клітини фарбуються у фіолетовий колір?
8. Чому грамнегативні клітини забарвлюються контрастними барвниками при додатковому фарбуванні?

**Література до практичної роботи3:** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 86-93.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 4

### УЛЬТРАСТРУКТУРА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ. КОМПЛЕКСНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ, ЩО ДОЗВОЛЯЮТЬ ВИЯВЛЯТИ КОМПОНЕНТИ БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ

*Практична робота 4. Використання комплексних методів фарбування для виявлення бактеріальних ендоспор, капсул, джгутиків та волутинових включень*

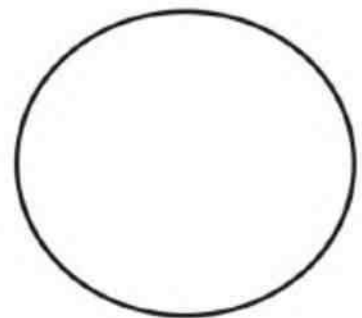
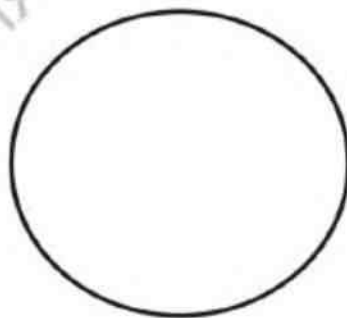
**Матеріали** (на лабораторну групу ): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, тканина, що не містить волокна, фуксиновий барвник, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, імерсійна олія, фломастер, прищепки, постійні препарати.

#### Хід роботи:

**Завдання:** Вивчити будову клітин бактерій з ендоспорами, капсулами та іншими структурами.

**Крок 1.** Розгляньте препарати мікроорганізмів під мікроскопом, використовуючи імерсійний об'єктив

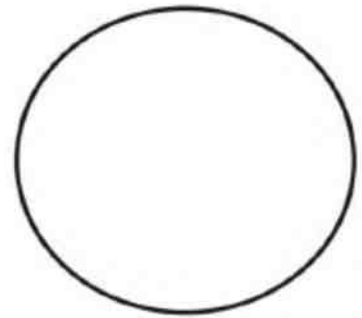
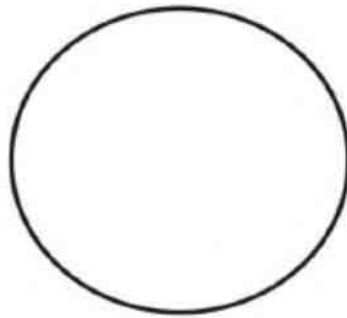
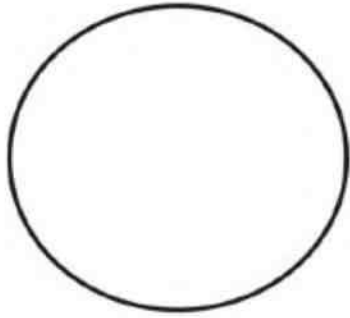
**Крок 2.** Замалуйте розглянуті препарати.



фарбування

збільшення

морфологія



фарбування

збільшення

морфологія

**Висновок:** \_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Які методи застосовують для виявлення джгутиків при світловій мікроскопії?
2. Чому у спірохет джгутики не виявляють фарбуванням?
3. В чому полягає суть методів виявлення ендоспор?
4. Чому барвники не забарвлюють капсули?
5. Яку речовину використовують для фарбування фону в техніці виявлення капсул?
6. Які барвники використовують для виявлення самої клітини в техніці фарбування капсул?
7. Що застосовують для знебарвлення в методі фарбування волютинових гранул?

**Література до практичної роботи 4 :** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 93-105.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 5

### ФІЗІОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ. ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ (ЧАСТИНА 1).

#### Практична робота 5: Перший етап виділення чистої культури мікроорганізмів: метод посіву на селективне середовище.

**Матеріали** (на лабораторну групу): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, безволокниста тканина, фуксиновий барвник, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, фломастер, прищепки, штатив для пробірок, сухі поживні середовища, компоненти поживних середовищ, анаеростат, пробірка з бактеріальною сумішшю (*E.coli* + *S.aureus*); стерильні чашки Петрі з агаризованими середовищами: МПА, Ендо, ЖСА; термостат.

#### Хід роботи:

**Завдання:** Розпочати виділення аеробної чистої культури з бактеріальної суміші методом штриха, що виснажується

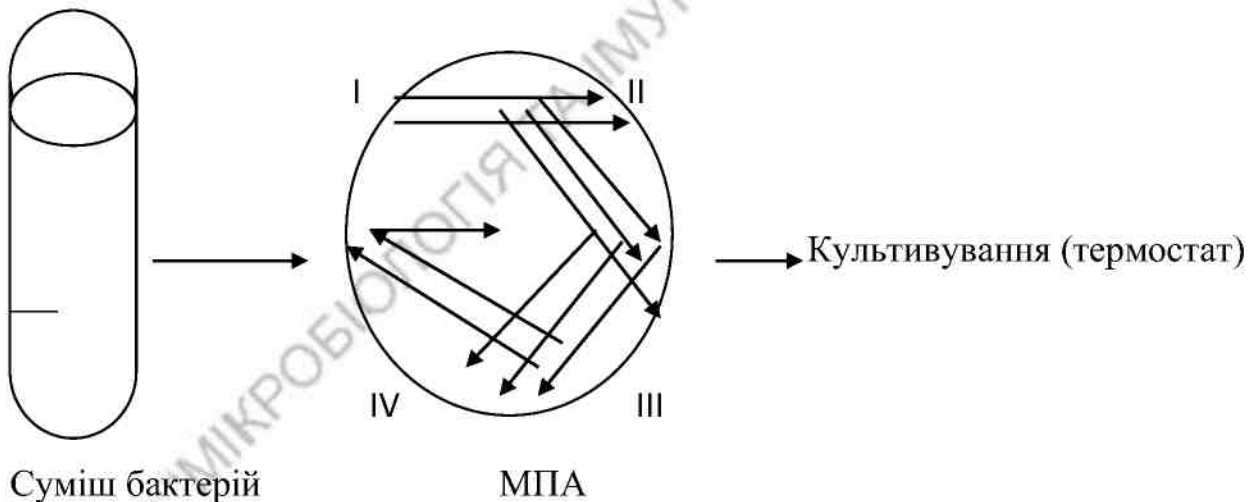


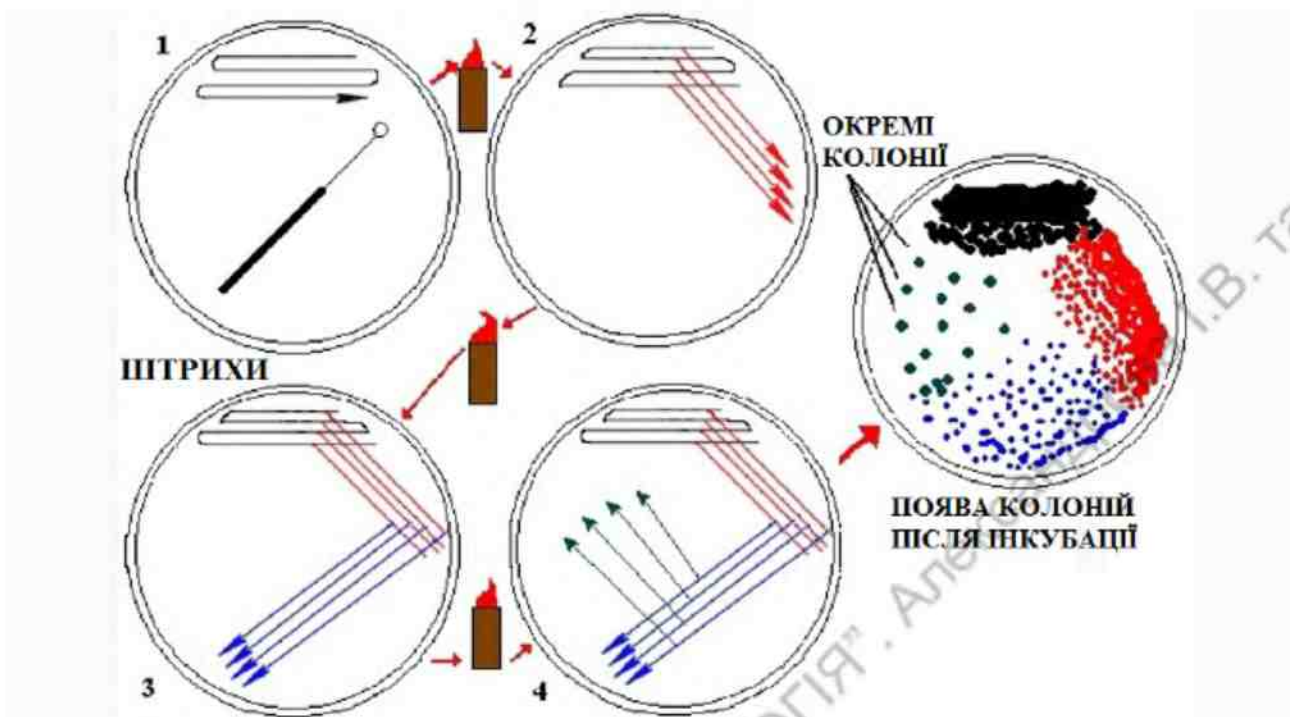
Рис 5.1. Схема процедури виділення чистої культури

**Крок 1.** Ознайомтеся з набором основних компонентів для приготування простих середовищ (пептон, хлорид натрію, агар-агар тощо).

**Крок 2.** Ознайомтеся з готовими середовищами (м'ясо-пентоновий бульйон (МПБ), м'ясо-пептоновим агаром (МПА), кров'яним агаром, коагульованою сироваткою, Ендо, Левіна, Плоскірева, Гісса тощо).

**Крок 3.** Запаліть пальник Бунзена на своєму робочому місці.

**Крок 4.** Почніть виділення чистої культури аеробних бактерій з суміші методом виснаженого штриха (рис.5.2)



**Рис.5.2.** Схема посіву виснаженим штрихом

#### **Підказки:**

Під час засіву середовища слід бути дуже обережним для запобігання зараження сторонніми мікроорганізмами

- Перед використанням проволочну петлю необхідно стерилізувати у полум'ї.
- Інокулювання середовища слід проводити під кришкою чашки Петрі та біля пальника, де є повітряний потік вгору.
- Перш ніж розпочати процедуру, ознайомтесь із наведеною нижче методикою.

1. На нижній частині чашки Петрі з МПА намалюйте лінії, щоб візуально розділити середовище на чотири сектори.
2. Стерилізуйте петлю для перенесення, перш ніж взяти зразок.
3. Зніміть пробку або ковпачок з пробірки. Рекомендується тримати пробку у правій руці (рука, яка тримає стерильну петлю). Зігніть мізинець правої руки навколо ковпачка і утримуйте його. Відкрийте культуру і наберіть краплю зразка, використовуючи стерильну петлю. Для цього введіть петлю в пробірку зі зразком культури і видаліть петлю з МПБ. Закрийте кришку пробірки і поставте її назад у штатив для пробірок
4. Засійте перший сектор. Тримайте ручку петлі для пересіву в одній руці так, як ви б тримали олівець. Відкрийте кришку чашки Петрі достатньо, щоб вставити петлю і засіяти поверхню одного сектора середовища. Петля повинна ковзати по поверхні агару; стежте за тим, щоб вона не

занурювалась в агар. Виконаний належним чином, цей процес призведе до серії паралельних ліній у верхній частині чашки.

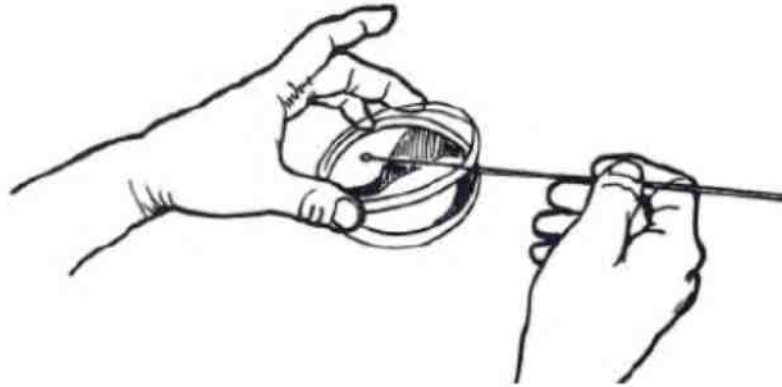


Рис 5.3. Схема посіву на чашку Петрі

5. Прокаліть петлю в полум'ї і охолодіть її. Це знищить усі бактерії на петлі. Це важливо, оскільки необхідно розподілити клітини лише з сектору 1. Прокалювання петлі необхідно проводити перед засівом кожного сектору
6. Поверніть чашку Петрі на 90 градусів проти годинникової стрілки. Засійте другий сектор середовища, торкнувшись петлею до засіяного першого сектору і зробивши 4 окремих штрихи.
7. Прокаліть і охолодіть петлю.
8. Поверніть чашку на 90 градусів проти годинникової стрілки. Засійте наступні сектори.
9. Підпишіть на чашці Петрі своє ім'я, номер групи.
10. Проведіть виділення культури на середовищах Ендо і ЖСА
11. Культивуйте посіви за температури 37 °С.

**Крок 5.** Вимкніть пальник Бунзена та припиніть подачу газу, якщо все закінчили.

**Крок 6.** Ознайомтеся (теоретично) з методикою виділення анаеробної бактеріальної чистої культури.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Охарактеризуйте основні етапи методу виділення та ідентифікації чистої культури.
2. Який головний принцип серійного розведення методу Пастера?
3. Який основний принцип методу Коха посіву на щільні середовища?
4. Що лежить в основі методу Дригальського?
5. У чому полягає принцип методу «виснаженого штриха»?

6. Охарактеризуйте метод мікрomanipуляторів для виділення одиночних клітин.
7. Поясніть головний принцип культивування аеробних мікроорганізмів.
8. Поясніть головний принцип культивування анаеробних мікроорганізмів.
9. Чому до анаеробних середовищ вносять відновник?
10. Чому на цьому занятті ви використовували три різні середовища (МПА, ЖСА, Ендо)? Який їх склад та функціональне використання?

**Література до практичної роботи 5 :** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 106-123.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

Робочий зошит "МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ" .Александрова І.В. та ін.

## Практичне заняття № 6

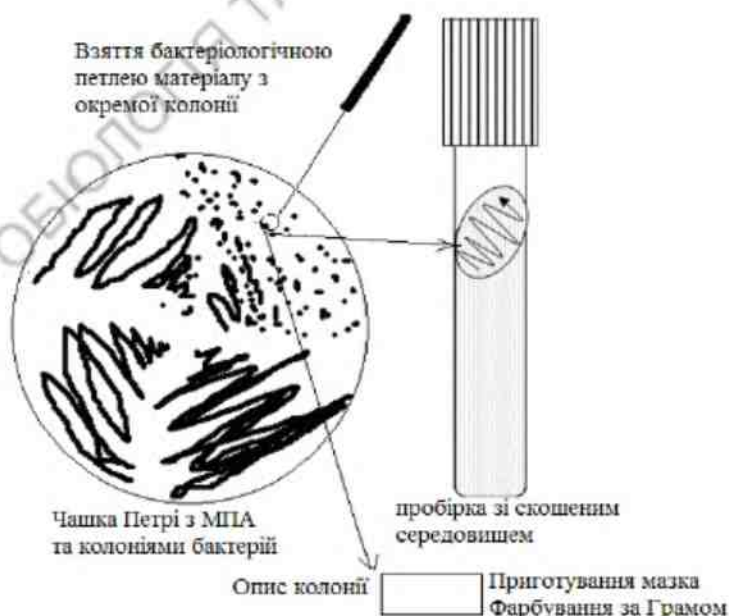
### БАКТЕРІАЛЬНИЙ РІСТ. КОЛОНІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ (ЧАСТИНА 2).

**Практична робота 6. Виділення чистої культури мікроорганізмів (частина 2): вивчення властивостей отриманих одиничних колоній бактерій**

**Матеріали** (на лабораторну групу): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, безволокниста тканина, фуксиновий барвник, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, фломастер, прищепки, штатив для пробірок, термостат, лінійка, 3% КОН, пробірки з МПА у вигляді скошеної поверхні (1 на студента).

#### Хід роботи:

**Завдання 1:** Продовжити виділення чистої культури аеробних бактерій: вивчити морфологічні властивості отриманих колоній, дослідити чистоту отриманих культур. Пересіяти колонії на щільне скошене середовище МПА у пробірці (рис 6.1)



**Рис.6.1. Схема посіву колонії на щільне середовище**

**Крок 1.** Уважно передивіться чашки Петрі з посівами. Бактерії на щільних середовищах ростуть у вигляді колоній. У більшості випадків кожна колонія

є результатом поділу окремої клітини. Іноді колонії можуть зливатися, якщо кількість клітин досить значна.

**Крок 2.** Візуально огляньте окремі колонії бактерій і опишіть їх за основними характеристиками (рис.6.2 – 6.5). Внесіть описи колоній у таблицю 6.1.



Рис. 6.2. Форми колоній.



Рис. 6.3. Поверхні колоній.



Рис. 6.4. Профілі колоній.



Рис. 6.5. Краї колоній.

## Морфолого-культуральні особливості мікроорганізмів

Поживне середовище	Кількість колоній одного типу	Ознаки колоній							Морфологія клітин
		Форма	Розмір	Колір	Поверхня	Профіль	Край	Консистенція	

**Крок 3.** Проведіть швидке визначення типу клітинної стінки отриманих бактерій. Для розрізнення грампозитивних та грамнегативних бактерій використовується 3% розчин КОН.

1. Нанесіть 2-3 краплі 3% КОН на чисте предметне скло.
2. Наберіть петлею бактерії із певної колонії.
3. Занурте петлю з бактеріями в краплю КОН і суспендуйте в ній бактерії на кілька хвилин.
4. Поява тяжів слизу характерна для грамнегативних бактерій.

Висновок щодо властивостей культури:

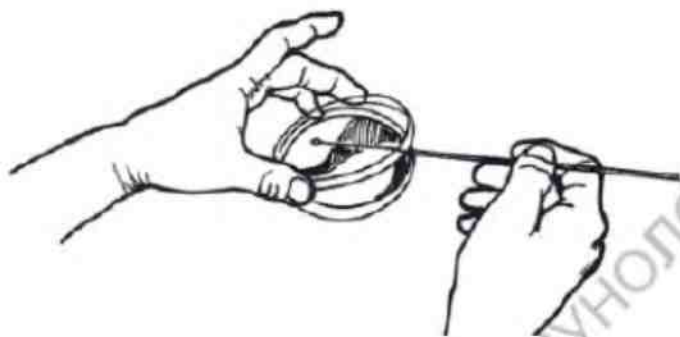

**Крок 4.** Зробіть висновок про особливості росту культур на трьох середовищах.

Висновки:


**Крок 5.** Пересійте одну колонію бактерій з селективного середовища у пробірку на скошене щільне середовище МПА.

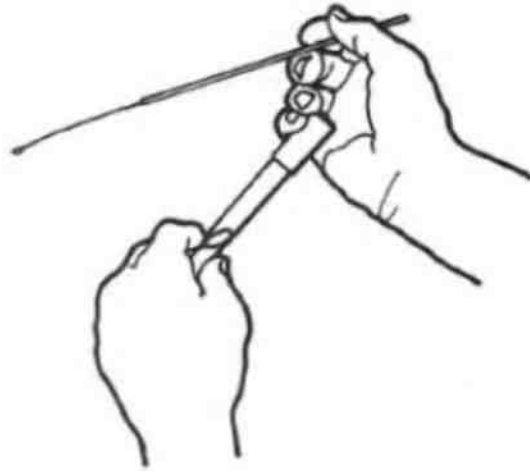
*(Цей крок дозволяє виявити сторонні бактерії, які не виростили на щільному селективному середовищі, але можуть рости на базовому середовищі МПА. Таким чином, ви можете визначити, чи ваша культура чиста).*

1. Помістіть пробірку з щільним скошеним середовищем між великим і вказівним пальцями лівої руки, таким чином, щоб було видно скошену поверхню середовища
2. Простерилізуйте петлю в полум'ї пальника
3. Привідкрийте кришку чашки Петрі, але не відкривайте повністю, щоб запобігти забрудненню зверху (рис.6.6)



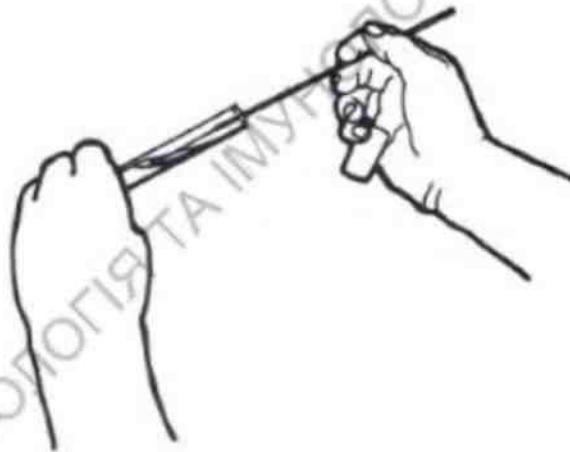
**Рис. 6.6. Робота з чашкою Петрі**

4. Охолодіть петлю, доторкнувшись до внутрішньої сторони кришки чашки Петрі. Якщо гарячою петлею доторкнутись до зони росту культури, це може призвести до розбрикування бактерій та утворення аерозолів. Наберіть петлею невеличку кількість біомаси, торкаючись петлею колонії.
5. Обережно вийміть петлю з чашки Петрі, тримаючи в зоні стерильності біля пальника.
6. Затисніть пробку, що закриває пробірку, мізинцем правої руки, зніміть пробку і тримайте затиснутою (рис.6.7)



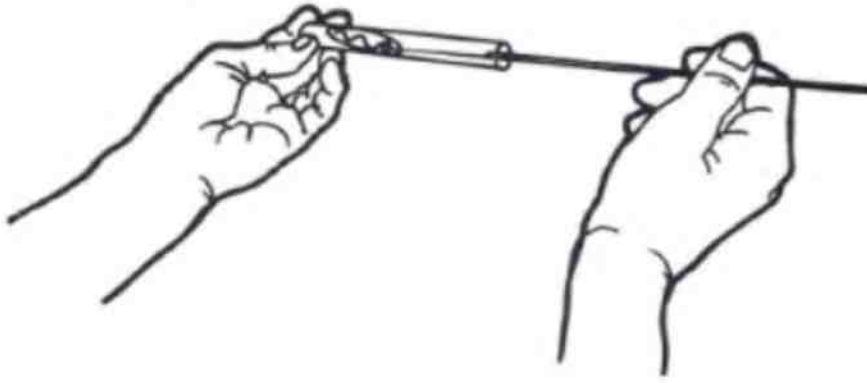
**Рис. 6.7. Зняття кришки з пробірки**

7. Профламбуйте горлечко пробірки. Проведіть відкриту частину пробірки через полум'я пальника декілька разів.
8. Введіть петлю з культурою в пробірку зі скошеним середовищем.



**Рис. 6.8. Введення бактеріальної петлі в пробірку**

9. Доторкніться петлею нижньої частини скошеної поверхні середовища. Зигзагоподібними («fish tail») рухами проведіть петлею знизу догори (рис.6.9)



**Рис. 6.9 Посів петлею в пробірку на скошену поверхню агаризованого середовища**

10. Профламбуйте горлечко отвору пробірки. Проведіть відкриту частину пробірки через полум'я пальника декілька разів.
11. Закрийте пробірку пробкою.
12. Простерилізуйте петлю, як і раніше, прокалюючи її в полум'ї пальника Бунзена. Робіть це особливо ретельно, так як петля містить багато бактерій.
13. Зазначте на пробірці своє ім'я, дату, номер групи та назву мікроорганізма.
14. Інкубуйте в термостаті за  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 18-24 годин.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Поясніть принцип роботи хемостату.
2. Як описати колонію мікроорганізмів відповідно до її форми / розміру / поверхні?
3. Як описати колонію мікроорганізмів відповідно до її консистенції / пігментації / прозорості?
4. Які інструменти використовують для мікроскопічного підрахунку клітин?
5. Як обчислюється кількість клітин на мілілітр суспензії при мікроскопічному підрахунку клітин?
6. Які розведення бактеріальної суспензії є найбільш сприятливими для підрахунку життєздатних клітин?
7. Поясніть різницю між однією клітиною та колонієутворювальною одиницею.

8. Як каламутність взаємопов'язана з оптичною щільністю, поглинанням та кількістю клітин?
9. Який швидкий тест на визначення типу клітинної стінки ви дізналися?

**Література до практичної роботи 6:** О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 124-131.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

Робочий зошит "МІКРОБІОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ". Александрова І.В. та ін.

## Практичне заняття № 7

### КЛАСИФІКАЦІЯ, НОМЕНКЛАТУРА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ. ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ (ЧАСТИНА III)

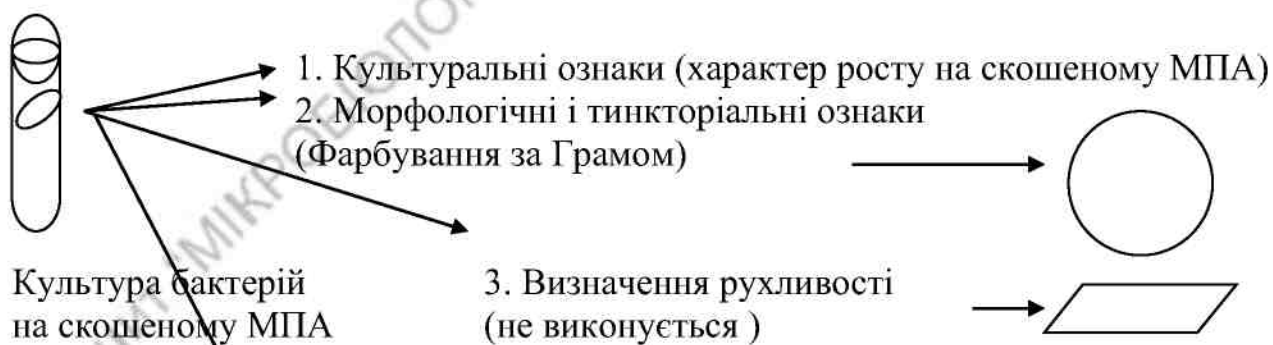
**Практична робота 7. Продовження виділення чистої культури: визначення чистоти ізольованої культури. Ідентифікація чистої культури на основі біохімічних властивостей**

**Матеріали** (на лабораторну групу): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки зі стерильною водою, петлі, скельця, мило, безволокниста тканина, фуксин, пляшки з водою для промивання препаратів, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, фломастер, прищепки, штатив для пробірок, термостат, комплект для фарбування за Грамом; пробірки із середовищем Х'ю-Лейфсона (по 2 на студента, одна із середовищем, покритим мінеральним маслом); чисті культури *E. coli* та *S. aureus* на скошеній поверхні МПА.

#### Хід роботи:

**Завдання:** Перевірити виділену культуру на чистоту. Визначити культурні, морфологічні, тинкторіальні (спорідненість до барвників) та біохімічні властивості отриманої (чистої) культури аеробних бактерій.

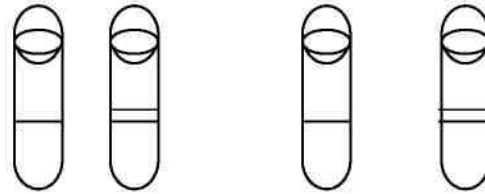
#### Частина 1



**Висновок:** Виділена чиста культура аеробних грамнегативних паличок (грампозитивних коків), - вона є морфологічно однорідною і однотинкторіальною. Для її подальшої ідентифікації треба визначити ферментативні та інші властивості.

#### Частина 2

4. Визначення ферментативних властивостей чистої культури аеробних бактерій: виявлення здатності ферментувати глюкозу за анаеробних умов, продукування газу.



OF –тест на середовищі Х'ю–Лейфсона  
за аеробних і анаеробних умов

*E. coli*

*S. aureus*

За результатом цього тесту обирають відповідні тести АРІ для подальшої ідентифікації мікроорганізма за біохімічними ознаками

### Частина 1

**Завдання 1.** Дослідити отриману культуру аеробних бактерій: Визначити культуральні, морфологічні та тинкторіальні властивості. Це дає інформацію про ЧИСТОТУ ізолюваної культури.

**Крок 1.** Уважно розгляньте ріст по штриху в пробірці досліджуваної культури. Визначіть візуально, чи культура чиста (1) . Чиста культура повинна мати один тип колоній.

**Крок 2.** Визначіть, чи є культура чистою за допомогою мікроскопії (2). Приготуйте мазок культури і зафарбуйте за Грамом. Якщо культура є чистою, то в мазках по Граму можна спостерігати лише один морфологічний тип бактерій. Замалюйте.

**Крок 3.** Заповніть таблицю і зробіть висновок про чистоту отриманої культури.

Таблиця 7.1

Властивості отриманої культури	
Культуральні властивості	
Однорідність росту (колонії)	
Морфологічні властивості	
Морфологічна однорідність	
Особливості забарвлення	
Однорідність забарвлення	
<b>Висновки про чистоту культури:</b>	

## Частина 2

**Завдання 2.** Виконайте OF-тест. Зробіть висновок про здатність мікроорганізму до аеробного дихання чи бродіння на середовищі Х'ю-Лейфсона. За отриманими результатами можна вибрати відповідний тест API для виявлення численних біохімічних ознак мікроорганізму і його подальшої ідентифікації. Для отримання достовірних результатів культура МАС БУТИ ЧИСТОЮ.

**ТЕОРЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ:** Тест на виявлення типу метаболізму мікроорганізму: аеробний чи факультативно анаеробний (OF) був розроблений Х'ю і Лейфсоном у 1953 році. Вони розробили спеціальне OF середовище для виявлення бактерій, які мають аеробний метаболізм (утилізують глюкозу з утворенням кислоти лише в присутності молекулярного кисню) і факультативно анаеробних бактерій (які утилізують глюкозу з утворенням кислоти як в присутності молекулярного кисню, так і без нього).

Мікроорганізми утилізують глюкозу як в результаті дихання (за аеробних умов) так і за бродіння (анаеробних умов). Кінцевими продуктами бродіння (ферментації) є відносно сильні кислоти, які можна виявити індикатором у звичайному середовищі для ферментації. Однак кислоти, що утворюються при окислювальній деградації глюкози, надзвичайно слабкі та кількість їх незначна, тож для їх виявлення потрібне більш чутливе середовище Х'ю-Лейфсона. У цьому середовищі кількість глюкози значно вища, ніж у середовищі, що використовується для виявлення бродіння, та зменшена кількість пептону.

Окислювально-ферментативний тест визначає, чи мікроорганізми метаболізують глюкозу шляхом бродіння (ферментації) або аеробного дихання (окислювально). Під час анаеробного процесу бродіння піруват перетворюється на різноманітні кислоти залежно від типу бродіння. Висока концентрація кислоти, що утворюється під час ферментації, змінює колір індикатора бромтимолового синього в середовищі OF із зеленого в жовтий при наявності чи відсутності кисню.

Деякі неферментуючі грамнегативні бактерії метаболізують глюкозу, використовуючи аеробне дихання, і тому виробляють лише невелику кількість слабких кислот під час циклу гліколізу та Кребса. Зменшена кількість пептону та збільшена кількість глюкози полегшує виявлення утворених таким чином слабких кислот. Для подальшого сприяння виявленню кислоти додають калій фосфатний буфер.

### **Використання:**

OF-тест використовують для визначення, чи грамнегативні бактерії метаболізують вуглеводи окислювально, ферментацією, або вони не використовують вуглеводи (нецукролітичні).

## Середовище:

X'ю-Лейфсона OF –глюкозне середовище;

## Процедура наступна:

Інокулюйте уколом дві пробірки середовища X'ю-Лейфсона досліджуваним мікроорганізмом, зануливши петлю або голку до половини агарового стовпчика пробірок.

Налийте в одну пробірку кожної пари стерильну мінеральну олію або рідкий парафін шаром 1 см (це створює анаеробний стан у пробірці, запобігаючи дифузії кисню), залишіть іншу пробірку закритою спеціальними пробками для забезпечення доступу повітря.

Інкубуйте обидві пробірки при 35° С протягом 48 годин (для повільного росту бактерій може знадобитися від 3 до 4 днів, перш ніж можна буде спостерігати результати).

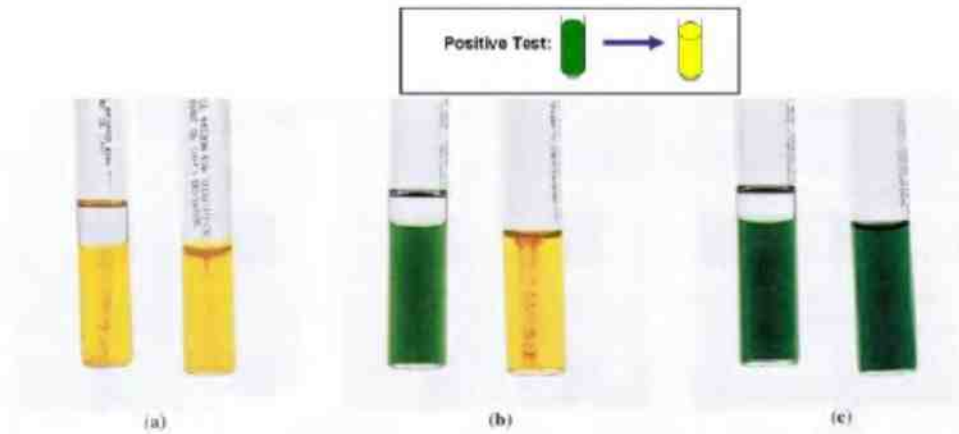
## Інтерпретація результатів OF-тесту

Утворення кислоти можна виявити за появою жовтого кольору в середовищі. У разі окислювальних мікроорганізмів зміна кольору може спостерігатись біля поверхні середовища.

1. **Ферментація глюкози:** утворення кислоти в обох («відкритих» та «закритих») пробірках. Кислота, що утворилась зменшує показник рН, бромтимоловий синій змінює забарвлення з зеленого на жовтий, наприклад *Escherichia coli*.
2. **Окиснення глюкози:** утворення кислоти у відкритій пробірці (аеробна), а не в покритій олією пробірці (анаеробна) вказує на окислювальний результат. Неферментуючі бактерії, які метаболізують глюкозу за допомогою окисного метаболізму, дають окислювальний результат, наприклад *Pseudomonas aeruginosa*.
3. **Нездатність засвоювати глюкозу (негативний OF-тест):** Несахаролітичні бактерії дають негативний результат OF-тесту. Негативний результат вказується на відсутність зміни кольору в покритій олією пробірці, а в деяких випадках підвищення рН (рН 7,6), зміна кольору бромтимолового синього з зеленого на синій у верхній частині відкритої пробірки. Підвищення рН відбувається за рахунок вироблення аміаку бактеріями, які розщеплюють пептон (білок) у середовищі, наприклад *Alcaligenes faecalis*.

## Контроль результатів для порівняння

- Ферментація глюкози: *Escherichia coli*
- Окиснення глюкози: *Pseudomonas aeruginosa*
- Несахаролітичні: *Moraxella sp.*



O/F glucose test. (a) Fermentative and oxidative; (b) oxidative; (c) glucose not metabolised or inert. © The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Services

Following are the reaction patterns:

Open (Aerobic) Tube	Covered (Anaerobic) Tube	Metabolism
Acid (Yellow)	Alkaline (Green)	Oxidative
Acid (Yellow)	Acid (Yellow)	Fermentative
Alkaline (Green)	Alkaline (Green)	Non saccharolytic (glucose not metabolised)

### Хід роботи

**Крок 1.** Візьміть пробірку з отриманою чистою культурою або отримайте пробірку з чистою культурою на скошеній поверхні агару у викладача, якщо ваша культура забруднена.

**Крок 2.** Інокулюйте чисту культуру бактерій, що виросла в пробірці з МПА у ДВІ пробірки з середовищем Х'ю-Лейфсона: одна відкрита - для аеробних умов росту, а друга - покрита шаром стерильної мінеральної олії або рідкого парафіна.

1. Візьміть дві пробірки у руку: одна зі скошеним МПА і культурою, друга - із середовищем Х'ю-Лейфсона, так, щоб поверхня агару була спрямована догори.
2. Простерилізуйте петлю в полум'ї пальника
3. Зніміть пробки обох пробірок мізинцем руки, яка тримає петлю і тримайте їх там.
4. Проведіть відкриті кінці пробірок крізь полум'я пальника дві-три рази.
5. Тримаючи петлю нерухомо в руці, перемістіть пробірку вгору таким чином, щоб кінець дроту петлі доторкнувся до середовища, де немає росту. Доторкніться петлею до біомаси і наберіть на неї небагато бактерій.
6. Тримаючи петлю нерухомо в руці, вийміть пробірку по ходу дроту.

7. Помістіть петлю вертикально в пробірку із середовищем Х'ю-Лейфсона.
8. Обережно пересуньте пробірку з середовищем по дроту, доведіть до середини стовпчика.
9. Потім, тримаючи петлю нерухомо в руці, вийміть пробірку по ходу дроту.
10. Проведіть відкриті кінці пробірок крізь полум'я пальника два-три рази. Тримайте руку з петлею нерухомо.
11. Тримаючи петлю нерухомо (пам'ятайте, на ній є біомаса), перемістіть пробірки, щоб одягнути на них пробки (ковпачки).
12. Простерилізуйте петлю, як і раніше, прокаливши її у полум'ї пальника Бунзена.
13. Зазначте на пробірці своє ім'я, дату, номер групи та напишіть природу виділеної культури мікроорганізму.
14. Повторіть етапи 1-13 для другої пробірки.
15. Інкубуйте за 37 ° С в термостаті протягом 18-24 годин.

**Крок 3. (Виконується на 8 занятті). Інтерпретація результатів.** Перевірте здатність до анаеробного росту, здатність метаболізувати глюкозу окислювальним чи ферментативним способом та здатність виробляти газ. Заповніть таблицю 7.2.

**Таблиця 7.2.**

**Результати окислювально-ферментативного тесту (OF)**

	Аеробна «відкрита» пробірка	Пробірка «закрита» шаром мінеральної олії	Інтерпретація результатів
<b>Колір</b>			
<b>Кислота</b>			
<b>Газ</b>			

**Крок 4. (Виконується на 8 занятті).** Зробіть висновок щодо біохімічних властивостей вашої бактеріальної культури, типу тесту API, який слід вибрати для подальшої ідентифікації (для бродіння або неферментуючих бактерій) та надайте висновок щодо виду, який ви ізолювали з суміші.

**Висновок:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Які основні принципи біохімічного тестування виявляють здатність бактерій виробляти харчові ферменти?
2. Які основні принципи біохімічного тестування виявляють здатність бактерій виробляти дихальні ферменти?
3. Який принцип фаготипування бактерій?
4. Яку інформацію надає хімічна характеристика бактеріальної ДНК?
5. На яких етапах ідентифікації бактерій використовується секвенування ДНК?
6. Які докази того, що ваша культура чиста?
7. Для чого використовують дві пробірки в тесті OF?
8. Що є основою зміни кольору у відкритій / герметичній пробірці?

**Література до практичної роботи 7:**

1. О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 124-135.

2. О.С.Радченко Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: Навчальний посібник.-2011. С 5-11.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 8

### АНТИМІКРОБНА ТЕРАПІЯ

**Практична робота 8. Виявлення чутливості до антимікробних препаратів чистих культур, що викликають захворювання.**

**Матеріали** (на лабораторну групу): пальники Бунзена, ємності для фарбування з містками, пробірки із стерильною водою, петлі, скельця, мило, безволокниста тканина, фуксиновий барвник, пляшки для миття, фільтрувальний папір, 96% розчин етанолу, мікроскопи, маркер, прищепки, штатив для пробірок, термостат, пастерівські піпетки, дозуючі пристрої, чашки петрі з щільним середовищем Мюллера-Хілтона; суспензія *S. aureus* та *E. coli* (24 год. культури) у пробірках, флакони з дисками, насиченими антибіотиками, шаблони для розміщення дисків.

#### Хід роботи:

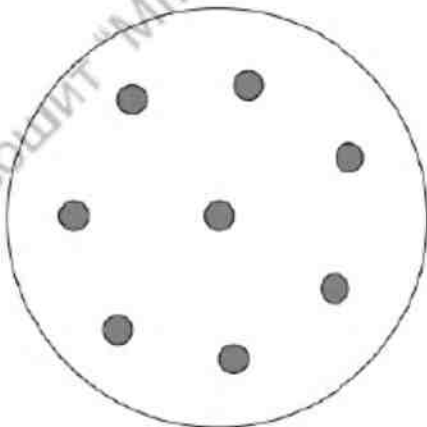
**Завдання 1.** *Визначити чутливість чистої культури бактерій до антибіотиків диско-дифузійним методом (метод Кірбі-Бауера).*

**Крок 0** Запаліть пальник Бунзена.

**Крок 1.** На поверхню затверділого агару Мюллера-Хінтона за допомогою піпетки Пастера внесіть 1 мл суспензії 24-годинної культури збудника (або, якщо чиста культура не була виділена раніше, патологічного матеріалу (гній, ексудати) отримані для дослідження та розведені ізотонічним сольовим розчином).

**Крок 2.** Рівномірно розподіліть на поверхні агару бактеріальну суспензію (злегка похитуючи чашку Петрі), видаливши після цього решту її піпеткою Пастера.

**Крок 3.** Диски з антибіотиками (5-6 дисків на чашку Петрі) розміщують на поверхні щільного середовища на відстані 25 мм один від одного (від центру до центру диску). Використовуйте поданий шаблон (рис. 8.1).



**Рис.8.1.** Шаблон для розміщення дисків з антибіотиками на агарі

Розмістіть під чашкою Петрі з середовищем Мюллера-Хінтона шаблон. Зніміть кришку з чашки і покладіть по одному диску з антибіотиками на кожне темно-сіре коло. Можна використовувати шаблон на меншу кількість дисків з антибіотиками. Пропозиції щодо друку цього шаблону див. У розділі "Додаткові примітки".

**Крок 5.** Інкубуйте посіви за 37 ° С протягом 16-18 годин.

### Додаткова інформація:

#### 1) Агар Мюллера-Хілтона

Агар Мюллера-Хілтона (МХ) вважається найкращим середовищем, яке використовують для визначення чутливості бактерій до антибіотиків з наступних причин:

- На ньому показана відтворюваність результатів визначення чутливості;
- Воно майже не інгібується сульфонамідом, триметопримом та тетрацикліном;
- На ньому задовільно росте більшість патогенних мікроорганізмів.

Зібрано велику кількість даних та досвіду щодо тестів на чутливість, проведених із цим середовищем.

#### 2) Розміщення диска

Диски розміщують на відстані не менше ніж 24 мм (від центру до центру диска) на чашці Петрі з агаром Мюллера-Хілтона. Зазвичай на 100-мм чашку слід розміщувати не більше 5 дисків.

Шаблон, представлений у цьому протоколі (рис. 8.1), має рекомендовану відстань між центрами дисків - 24 мм та дозволяє розміщувати до 8 дисків на чашці.

Слід уникати розміщення дисків впритул до краю чашки Петрі, оскільки зони затримки росту культури не будуть повністю круглими і їх важко виміряти.

Кожен диск повинен бути притиснутий пінцетом, щоб забезпечити повний контакт з поверхнею агару або нерівномірної зони.

Форма зони затримки росту може мати неправильну форму, якщо поверхня середовища не рівна і диск не повністю прилягає до неї.

Необхідний діапазон температур для культивування становить 35°C ± 2°C. Важливо, що за температури вище 35 ° С не можливо виявити стійкий до метициліну стафілокок.

Не можна інкубувати чашки з посівами в CO<sub>2</sub>, оскільки це знижує рН агару і призводить до помилок через неправильне значення рН середовища.

Результати можна враховувати після 18 годин інкубації, за винятком визначення чутливості бактерій роду *Staphylococcus* до оксациліну або ванкоміцину, або бактерій роду *Enterococcus* до ванкоміцину.

Враховують результати для інших антимикробних дисків, після чого додатково інкубують посіви протягом цілої доби, перш ніж повідомляти про чутливість до ванкоміцину або оксациліну.

**Висновок:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Які важливі кроки необхідно зробити перед початком призначення антибактеріального лікування?
2. Назвіть методи вивчення антагонізму мікроорганізмів.
3. Охарактеризуйте типи тестів, що проводять перед призначенням хіміотерапії.
4. Як бактерії в біоплівках можна ефективно лікувати антибіотиками?
5. Який головний принцип / переваги / недоліки диско-дифузійного методу?
6. Який головний принцип / переваги / недоліки оцінювання МІК Е-тестом?
7. Чим відрізняються різні варіанти методів серійних розведень?
8. Який хіміотерапевтичний засіб та протокол використовують для лікування сифілісу?

**Література до практичної роботи 8:**

1. О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 124-135.
2. Домбровська І.В. Вивчення чутливості та резистентності до антибіотиків та біоцидів :Навчальний посібник.-2013 .- 94 с.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 9

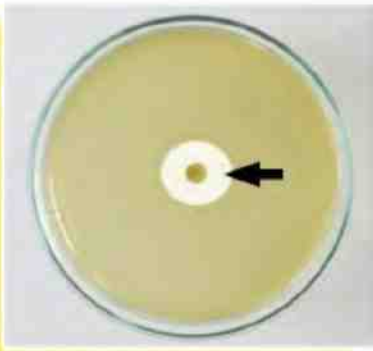
### ІНФЕКЦІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНИЙ ПРОЦЕС

**Практична робота 9. Врахування та інтерпретація результатів виявлення чутливості бактерій до антибіотиків**

**Матеріали** (на лабораторну групу): лінійка, чашки Петрі, засіяні на 8 занятті, таблиця інтерпретації результатів (на вибір).

#### Хід роботи:

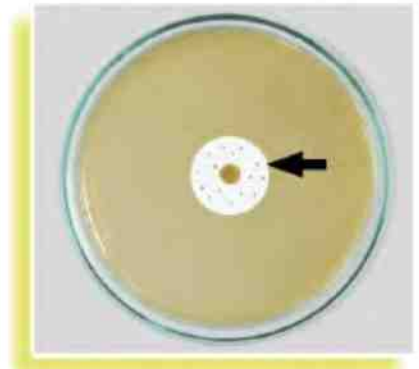
**Завдання 1.** *Визначте чутливість бактеріальної чистої культури до антибіотиків: повідомте, чи є мікроорганізм (*S. aureus* / *E.coli*) стійким, чутливим або проміжним щодо застосованих антибіотиків.*



**Крок 1.** Виявити та виміряти зону затримки росту.

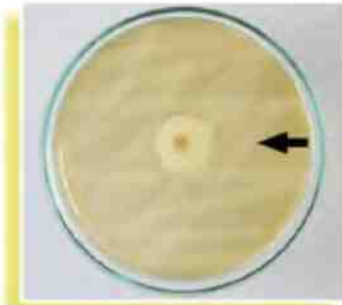
1. Зона затримки росту (стрілка) - це зона, в якій не видно росту.
2. Якщо ріст доходить до краю диска, її враховують як зону 0 мм.

3. Іноді спостерігають окремі колонії у зоні затримки росту. Ці колонії є або мутантними організмами, більш стійкими до випробуваного препарату, або культура не була чистою, і вони є іншим організмом. Якщо шляхом повторного тестування буде встановлено, що явище повторюється, організм повинен вважатися стійким до цього препарату.



4. Виміряйте та запишіть діаметр зон затримки росту за допомогою лінійки. Результати вимірювань наводять в міліметрах.

## Крок 2. Критерії оцінки отриманих результатів.

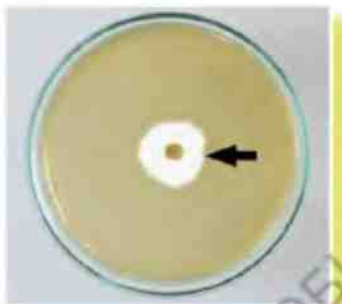


1. Не враховують зони затримки росту, якщо на чашках немає суцільного росту, а виростили лише поодинокі колонії (стрілка).

2. Іноді зони затримки росту двох сусідніх дисків перекриваються (стрілка) настільки, що стає неможливим виміряти діаметр зони.



Якщо зони сусідніх дисків з антибіотиками перекриваються, діаметр зони можна визначити, вимірюючи **радіус** зони. Виміряйте відстань від центру антибіотичного диска до точки на межі зони, де є чіткий край. Помножьте це вимірювання на 2, щоб визначити діаметр зони інгібіції



3. Не враховують результати, якщо зони затримки росту мають вигляд не рівномірного кола (стрілка).

4. Дані, отримані при тестуванні антибіотиків не враховують, якщо зони затримки росту, що утворюються на чашці, інокульованій контрольним штамом, не відповідають встановленим межам

## Крок 3 Інтерпретація результатів.

1. Порівняйте діаметр зони затримки росту тестових ізолятів з діаграмою, що міститься в таблиці інтерпретаційного стандарту для ветеринарних збудників (таблиці 9.1 та 9.2).

2. Інтерпретуйте результат як резистентний (R), помірний (I) або чутливий (S) за допомогою таблиці 9.2, запишіть свої спостереження в таблицю 9.3

**Приклад: диск з антибіотиком: хлорамфенікол, 30 мкг (C-30)**

**Зона затримки росту (діаметр, мм): 16**

**Інтерпретація: Помірний**

**Крок 4.** Зробіть висновок: яку хіміотерапію можна застосовувати пацієнтам із захворюванням, викликаним дослідженим збудником.

**Таблиця 9.1**

**Допустимі межі діапазону зон затримки росту (мм) контрольних штаблів, рекомендовані для використання визначення антимікробної чутливості бактерій за диско-дифузійним методом.**

Antimicrobial	Disk	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>a</sup>
Agent	Content	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 49619
Amikacin	30 µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin-	20/10µg	18-24	28-36	-	-
Clavulanic acid <sup>b</sup>					
Ampicillin	10µg	16-22	27-35	-	30-36
Cefazolin	30µg	21-27	29-35	-	-
Cefoxitin	30µg	23-20	23-2	-	-
Cephalothin	30 µg	15-21	29-37	-	26-32
Chloramphenicol 30µg	21-27	19-26	-	26-32	
Clindamycin	2 µg	-	24-3	-	19-25
Erythromycin	15µg	-	22-30	-	25-30
Gentamicin	10µg	19-26	19-27	16-21	-
Imipenem	10µg	26-32	-	20-28	-
Kanamycin	30µg	17-25	19-26	-	-
Oxacillin	1µg	-	18-24	-	≤12 <sup>c</sup>
Penicillin	10 units		26-37	-	24-30
Rifampin	5µg	8-10	26-34	-	25-30
Tetracycline	30µg	18-25	24-30	-	27-31
Ticarcillin	75µg	24-30	-	21-27	-
Ticarcillin-	75/10µg	24-30	29-37	20-28	-
Clavulanic acid					
Spectinomycin	100 µg	21-25	13-17	10-14	-
Sulfisoxazole	250 µg or 300 µg	15-23	24-34	-	-
Trimethoprim-	1.25/	23-29	24-32	-	20-28
Sulfamethoxazole <sup>c</sup>	23.75 µg				
Vancomycin	30µg-		17-21	-	20-27

**Примітки.** \* Адаптовано з M31-A2 NCCLS, 2002. Стандарти ефективності антимікробних дисків та тестів на сприйнятливість до розрідження бактерій, виділених від тварин; затверджено стандарт-друге видання. Документ NCCLS M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Пенсильванія 19087-1898, США.

"-" немає встановленого діапазону. a - застосовується лише з використанням агару Мюллера-Хінтона, доповненого 5% дефібриною кров'ю овець, інкубується в 5% CO<sub>2</sub>. b - помаранчевий для *E. coli* ATCC 35218 становить 17-22 мм. c - найкраще оцінюють за допомогою *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 з прийнятним діаметром зони 18-24 мм. d - дуже середньозалежний спеціально з ентерококами.

Таблиця 9.2.

Інтерпретація стандартів діаметр зон для збудників інфекційних захворювань

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter (mm)			
		S	I	F	R
Amikacin*	30µg	≥17	15-16		≤14
Gentamicin*	10µg	≥15	13-14		≤12
Kanamycin*	30µg	≥18	14-17		≤13
Spectinomycin	100µg	≥14	11-13		≤10
Amoxicillin-clavulanic acid*					
Staphylococci	20/10µg	≥20	-		≤19
Other organisms	20/10µg	≥18	14-17		≤13
Ticarcillin-clavulanic acid*					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75/10µg	≥15	-		≤14
Gram(-)enteric organisms	75/10µg	≥20	15-19		≤14
Ampicillin*					
Enterobacteriaceae	10µg	≥17	14-16		≤13
Staphylococci	10µg	≥29	-		≤28
Enterococci	10µg	≥17	-		≤16
Streptococci (not <i>S. pneumoniae</i> )	10µg	≥26	19-25		≤18
Oxacillin*					
Staphylococci	1 µg	≥13	11-12		≤10
Penicillin*					
Staphylococci	10 units	≥29	-		≤28
Enterococci	10 units	≥15	-		≤14
<i>S. pneumoniae</i>	1µg oxacillin	≥20	-		-
Streptococci (not <i>S. pneumoniae</i> )	10 units	≥28	20-27		≤19
Ticarcillin*					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75µg	≥15	-		≤14
Gram (-) enteric organisms	75µg	≥20	15-19		≤14
Penicillin-novobiocin	10 units/30 µg	≥18	15-17		≤14
Imipenem*	10µg	≥16	14-15		≤13
Cephalothin*	30µg	≥18	15-17		≤14
Cefazolin*	30µg	≥18	15-17		≤14
Ceftiofur	30µg	≥21	18-20		≤17
Enrofloxacin (canine/feline)	5µg	≥23	-	17-22	≤16
Enrofloxacin (chickens/turkeys)	5µg	≥23	17-22		≤16
Enrofloxacin (bovine)	5µg	≥21	17-20		≤16
Difloxacin	10µg	≥21	18-20		≤17
Orbifloxacin	10µg	≥28	-	18-22	≤17
Clindamycin	2µg	≥21	15-20		≤14
Pirlimycin	2µg	≥13	-		≤12
Erythromycin*					
Streptococci	15µg	≥21	16-20		≤15
Organisms other than Streptococci	15µg	≥23	14-22		≤13
Tilmicocin (Bovine)	15µg	≥14	11-13		≤10
Tilmicosin (Swine)	15µg	≥11			≤10
Chloramphenicol*					
Streptococci (not <i>S. pneumoniae</i> )	30µg	≥21	18-20		≤17
<i>S. pneumoniae</i>	30µg	≥21	-		≤20
Organisms other than Streptococci	30µg	≥18	13-17		≤12

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter (mm)			
		S	I	F	R
Florfenicol	30µg	≥ 19	15- 18		≤ 14
Tiamulin	30µg	≥ 9	-		≤ 8
Trimethoprim-sulfamethoxazole*					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.25/23.75µg	≥ 19	16-18		≤ 15
Organisms other than <i>S. pneumoniae</i>	1.25/23.75µg	≥ 16	11-15		≤ 10
Rifampin*					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	≥ 19	17-18		≤ 16
Organisms other than Streptococci	5	≥ 20	17-19		≤ 16
Sulfisoxazole*	250 or 300	≥ 17	13- 16		≤ 12
Tetracycline*					
Streptococci	30	≥ 23	19-22		≤ 18
Organisms other than Streptococci	30	≥ 19	15-18		≤ 14
Vancomycin*					
Enterococci	30	≥ 17	15-16		≤ 14
Streptococci	30	≥ 17	-		
Other gram-positive organisms	30	≥ 12	10-11		≤ 9

Позначення:

**S – Чутливий (Susceptible)**

**I – Помірний (Intermediate)**

**R – Резистентний (Resistant)**

**F – Варіабельний (Flexible)** ; слід вважати сприйнятливим, якщо застосовуються відповідні модифікації дозування, зазначені в упаковці

Таблиця 9.3

**Результати та їх інтерпретація тесту на виявлення чутливості до антибіотиків \_\_\_\_\_**

	Назва антибіотиків	Діаметр зони затримки росту (мм)	Інтерпретація (чутливий, резистентний, помірний )
1			
2			
3			
4			
5			
6			
<b>Висновок:</b>			

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Що є результатом дослідження антибіотикочутливості бактерій диско-дифузійним методом?
2. Яким методом можна безпосередньо визначити МПК?
3. Як визначити діаметр зони затримки росту, якщо відбулось часткове злиття цих зон?
4. У яких випадках результати антибіотикограм вважають недостовірними.

**Завдання для семінару**

Підготуйте міні-звіти про одне з наступних мікробних захворювань (захворювання на вибір студента): кандидоз, чума, холера, малярія, хвороба шлунка (*Helicobacter pylori*), менінгіт, дизентерія, правець, гонорея, сифіліс, туберкульоз, дифтерія, псевдомембранозний коліт, сальмонельоз, лямбліоз, токсоплазмоз, трихінельоз, сибірська виразка тощо (захворювання, які спричинені бактеріями, найпростішими (або іншими паразитами тварин) та грибами (дріжджі).

Звіт повинен містити такі розділи:

- Характеристика збудника (збудника інфекції),
- шляхи передачі та зараження,
- ознаки та симптоми,
- специфічне лікування захворювання.

**Література до практичної роботи 9:**

1. О.С.Радченко, Л.Г.Степура, І.В.Домбровська, І.М.Фуртат, Л.О.Михальський Практикум із загальної мікробіології.-К.: «Київський університет» 2011. С 124-135.
2. Домбровська І.В. Вивчення чутливості та резистентності до антибіотиків та біоцидів :Навчальний посібник.-2013 .- 94 с.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 10

### ТЕСТОВА МОДУЛЬНА КОНТРОЛЬНА РОБОТА

#### Приклади контрольних питань:

#### 1. Оберіть зі списку аніонний барвник:

- A. Кришталевий фіолетовий
- B. Метиленовий синій
- C. Малахітовий зелений
- D. Нігрозин
- E. Барвник Гімза

#### 2. Бактеріальні ендоспори:

- A. Постійні структурні компоненти бактеріальних клітин
- B. Використовуються для зберігання поживних речовин
- C. Легко інактивуються за підвищених температур
- D. Легко інактивуються ультрафіолетовим випромінюванням
- E. Виявляються за допомогою кислотно-стійкого барвника

#### 3. Якщо збудником інфекції є бактерія, то наступне є характерним для неї:

- A. Має мембранні органели
- B. Має апарат Гольджі
- C. Містить 70S рибосоми та ДНК, зв'язану з гістонами
- D. Містить рибосоми 80S і ДНК, зв'язану з гістонами
- E. Має цитоплазматичну мембрану

#### 4. Зовнішня мембрана:

- A. Полімер рибітолу або гліцерину (спирти) та фосфоліпиду
- B. Полімер гліканних (цукрових) ланцюгів, зшитий короткими пептидними фрагментами
- C. Складається з ліпиду А та О- полісахариду
- D. Складається з фосфоліпідів, ліпополісахаридів, ліпопротеїдів та поверхневих білків
- E. Складається з гліканів (NAM і NAG), пов'язаних між собою

## Практичне заняття № 1 РЕАКЦІЇ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ

### Дослід 1. Визначення активності лізоциму у біологічних рідинах

**Матеріали** (на групу студентів): спектрофотометр, суспензія клітин *Micrococcus luteus* ATCC4698, буферний розчин (0,05 М фосфату калію, рН 6,24), контрольний розчин лізоциму, тестована сироватка, кювети (2), дистильована вода, пробірки, контейнер для відходів з дезінфектантом, автоматичні дозатори об'ємом 1 мл і 0,2 мл, наконечники для автоматичних дозаторів, марлеві серветки/фільтрувальний папір, секундомір.

### Хід роботи

1. Отримати пробірку, що містить робочу суспензію (0,15 мг/мл) клітин *M. luteus*.
2. Отримати досліджувані зразки (контрольний розчин лізоциму, сироватка\*).

\*Сироватка: отримана зі зразка крові, взятої без антикоагулянта. Для отримання сироватки зразок крові інкубувати 30 хв у термостаті за 37°C для активації процесу коагуляції, потім – 30 хв у холодильнику за 4°C для ретракції утвореного згустка; після цього провести центрифугування за 400g протягом 10 хвилин і відібрати сироватку.

3. Додати 2,5 мл суспензії клітин *M. luteus* у кювету. Помістити кювету у спектрофотометр і виміряти світлопоглинання за  $\lambda=450$  нм. Оптимальним для проведення лабораторного дослідження є показник екстинкції  $> 0,7$ . Через одну хвилину повторно провести вимірювання світлопоглинання суспензії клітин *M. luteus* і переконатися, що показник екстинкції залишився незмінним (початкова екстинкція).
4. Додати до кювети з розчином *M. luteus* 0,1 мл буфера. Ретельно перемішати, використовуючи фіксовану кількість піпетувань суспензії (наприклад, 20 разів). Провести вимірювання світлопоглинання впродовж не менше, ніж 3 хв, з інтервалом 1 хв. Занести результати вимірювання у **таблицю 1** (колонка для показників екстинкції з додаванням буфера).
5. Вийняти кювету з приладу, видалити її вміст у посудину з дезінфектантом. Промити кювету дистильованою водою. Внести у кювету 2,5 мл суспензії

клітин *M. luteus*. Помістити кювету у спектрофотометр і спостерігати за світлопоглинанням приблизно 15 секунд. Показник екстинкції повинен бути стійким і не відрізнятись від показника початкової екстинкції.

6. Додати до кювети 0,1 мл контрольного розчину лізоциму. Ретельно перемішати, використовуючи фіксовану кількість піпетувань суспензії (наприклад, 20 разів). Провести вимірювання світлопоглинання впродовж не менше, ніж 3 хв, з інтервалом 1 хв. Занести результати вимірювання у **таблицю 1** (колонка для показників екстинкції з додаванням розчину лізоцима).
7. Повторити пп.5 і 6 ходу роботи для зразка сироватки. Занести результати вимірювання у **таблицю 1** (колонка для показників екстинкції з додаванням сироватки).
8. Визначити максимальне значення лінійної швидкості зміни екстинкції ( $\Delta A_{450}/\text{хв}$ ) для проб з додаванням буфера, контрольного розчину лізоцима та сироватки. Для цього необхідно розрахувати показник зміни екстинкції для кожної часової точки у всіх трьох пробах:  
 $\Delta A_{450} 1 = A_1 - A_0$ ;  $\Delta A_{450} 2 = A_2 - A_1$ ;  $\Delta A_{450} 3 = A_3 - A_2$ . Занести показники максимального значення лінійної швидкості зміни екстинкції у **таблицю 1** ( $\Delta A_{450}$ ) для кожної проби.
9. Розрахувати концентрацію лізоциму (Од/мл) у контрольному розчині лізоциму і сироватці, використовуючи формулу:

$$\text{Концентрація лізоциму (U/мл)} = \frac{(\Delta A_{450}/\text{хв дослід} - \Delta A_{450}/\text{хв контроль}) \times \text{ФР}}{(0,001) \times (0,1)}$$

де:

ФР\*\* = фактор розведення

0.001 = лінійна швидкість зміни екстинкції ( $\Delta A_{450}/\text{хв}$ ) для 1 Од лізоциму

0.1 = об'єм (мл) дослідного розчину у зразку

\*\* - ФР для контрольного розчину лізоциму=1, ФР для сироватки = 0,1.

Результати розрахунків занести у **таблицю 2**.

**Таблиця 1. Показники екстинкції**

	Час (хв)	Буфер	Контрольний розчин лізоциму	Сироватка
A <sub>0</sub>	0			
A <sub>1</sub>	1			
A <sub>2</sub>	2			
A <sub>3</sub>	3			
A <sub>4</sub>	4			
A <sub>5</sub>	5			
Макс. ΔA <sub>450</sub>				

**Таблиця 2. Концентрація лізоциму**

Зразок	Концентрація лізоциму (U/мл)
Контрольний розчин лізоциму	
Сироватка крові	

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Що таке лізоцим? До якого типу хімічних речовин належить лізоцим?
2. Яка функція лізоциму? Який субстрат дії лізоциму?
3. Де можна знайти лізоцим в організмі людини?
4. Який метод оцінки активності лізоциму буде використано на занятті?
5. Який буфер буде використано у цій лабораторній роботі?
6. Чому у цій лабораторній роботі буде використано культуру *M. luteus*?
7. Які біологічні рідини буде використано у поточній лабораторній роботі?
8. Як змінюється поглинання світла зі збільшенням помутніння суспензії?
9. За якої довжини хвилі буде оцінюватися поглинання світла?

**Література до практичної роботи 1:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p.: 27-40, 141-182.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 2

### РЕАКЦІЇ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ

#### *Дослід 2. Виявлення С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові за допомогою методу латекс-аглютинації*

**Матеріали** (на групу студентів): СРБ латексний реагент: суспензія однорідних полістиролових частинок, покритих моноспецифічними (козячими) антитілами, специфічними до СРБ людини у фізіологічному розчині, рН  $7,5 \pm 0,5$ . Чутливість реагентів складає приблизно 6 (5-10) мг/л; СРБ-позитивна контрольна сироватка: стабілізована попередньо розведена сироватка людини, що містить  $>20$  мг/л СРБ; СРБ-негативна контрольна сироватка: стабілізована попередньо розведена сироватка людини; дослідні сироватки, гліциновий буфер (готовий до використання), тест-пластини, палички для перемішування, таймер, пробірки, штативи для пробірок, контейнер з дезінфектантом для відходів, автоматизовані піпетки для відмірювання об'ємів від 0,01 мл до 1 мл, наконечники для піпеток.

#### **Хід роботи**

##### **Метод 1 (Якісний)**

1. Довести всі реактиви та зразки сироватки до кімнатної температури.
2. Обережно струсити флакон з СРБ-латексним реагентом, щоб ресуспендувати частинки латексу.
3. Позитивні та негативні контролю повинні ставитися при кожній постановці тесту.
4. Використовуючи одноразові наконечники піпетки, внести одну краплю (0,01 мл) досліджуваної сироватки на коло на тест-пластині. Використовуючи окремі одноразові наконечники піпетки, додати позитивні та негативні контрольні сироватки на інші кола.
5. Додати одну краплю СРБ-латексного реагенту до кожного кола на тест-пластині, що містить зразки. Отриману суміш ретельно перемішати наконечником піпетки або паличкою. Не використовувати один і той же наконечник (або паличку) для перемішування різних досліджуваних сироваток або контролю, оскільки це може призвести до перехресної контамінації.
6. Обережно погойдувати тест-пластину протягом 3 хвилин.

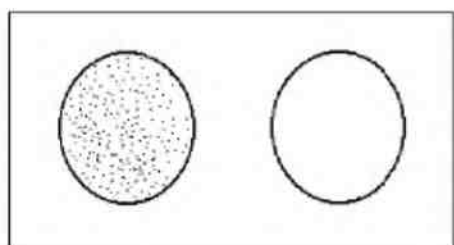
7. Утворення макроскопічного преципітату потрібно спостерігати при бічному освітленні.

8. Порівняти реакцію дослідної сироватки з СРБ-позитивною та СРБ-негативною контрольними сироватками.

9. Інтерпретація результатів якісного тесту:

- При негативній реакції спостерігається утворення рівномірної «молочної» суспензії без аглютинації, як це спостерігається з негативним контролем СРБ;

- Позитивна реакція проявляється утворенням будь-якої помітної аглютинації в реакційній суміші. Реакцію зразка слід порівнювати з негативним контролем СРБ (рис. 2.1)



Позитивна

Негативна

**Рис 2.1.** Позитивний та негативний результати реакції преципітації.

Сироватки, які дають позитивну реакцію в якісному тесті, повинні бути проаналізовані за допомогою титраційного (напівкількісного) методу, щоб верифікувати граничні результати.

### **Метод 2 (напівкількісний)**

1. На кожен дослідну сироватку, яку потрібно титрувати, взяти щонайменше 6 пробірок і позначити їх наступним чином: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 тощо.

2. У кожен пробірку додати 0,2 мл гліцинового буферу.

3. У пробірку №1 додати 0,2 мл нерозведеної сироватки.

4. Зробити послідовні двократні розведення, перемішуючи піпетуванням вміст пробірки №1 і переносячи 0,2 мл у пробірку № 2. Повторити серійні перенесення для кожної пробірки. Для 6 пробірок розведення становлять від 1:2 до 1:64. За необхідності можна зробити додаткові розведення сироватки. Для титрування кожної досліджуваної сироватки потрібно використовувати окремий наконечник піпетки.

5. Повторити кроки 3 – 7, як в описі методу 1 (якісний).

6. Інтерпретація результатів напівкількісного тесту:

Кінцевою точкою (титром) вважається найбільше розведення досліджуваного зразка, при якому спостерігається аглютинація. Приблизна концентрація СРБ у зразку пацієнта обчислюється наступним чином:  $6 \times \text{титр СРБ} = \text{мг/л}$ .

### Обмеження процедури

- Тривалість постановки реакції є критичною. Якщо тривалість постановки реакції перевищує 3 хвилини, висихання реакційної суміші може дати хибно позитивний результат;
- Заморожування СРБ-латексного реагенту може призвести до спонтанної аглютинації;
- При постановці тесту слід використовувати лише сироватку. Сильно ліпемічні або інфіковані сироватки можуть давати хибно позитивні результати;
- Тести на виявлення СРБ можуть дати хибно негативний результат у тому випадку, коли СРБ присутній у високій концентрації. У цій тест-системі СРБ є антигеном; антитіло, специфічне до СРБ, нанесено на частинки латексу. Якщо у зразку дуже висока концентрація СРБ, утворення ґратки не відбувається. Цей ефект має назву "прозона" (надлишок антигену, див. Рис. 2.2). Тому доцільно перевірити всі негативні сироватки шляхом повторного тестування з розведенням 1:10. Ефект прозони можна спостерігати за умови надлишку антитіл або антигенів. При високих концентраціях антитіл кількість їх паратопів може значно перевищувати кількість епітопів антигенів. Як результат, більшість антитіл зв'язують антиген лише одновалентно, а не багатовалентно. Антитіла, які зв'язуються одновалентно, не можуть перехресно зв'язувати один антиген з іншим, що також не призводить до утворення ґратки преципітату.

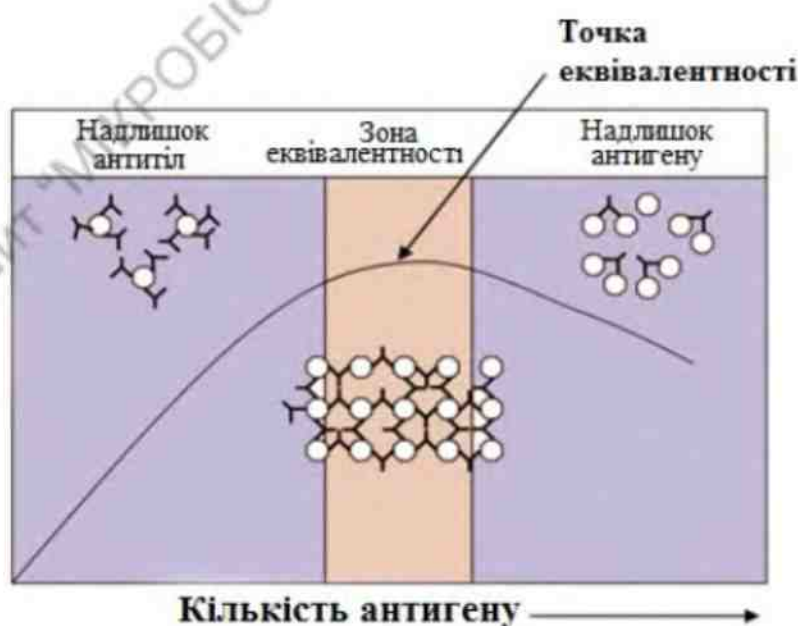


Рис 2.2. Ефект прозони.

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Яку речовину досліджують на даному занятті?
2. Які функції виконує С-реактивний білок?
3. До якого класу білків належить СРБ? Про що свідчать високі рівні СРБ?
4. Назвіть три причини, які викликають зростання рівня СРБ.
5. Вкажіть три переваги, які має тест на виявлення рівня СРБ над визначенням швидкості осідання еритроцитів при їх використанні в якості маркерів завалення.
6. Опишіть принцип методу визначення рівня СРБ, застосованого на занятті?
7. Якою речовиною покриті латексні частинки? Які зразки є прийнятними для аналізу?
8. Яка температура та тривалість зберігання зразків є допустимими?
9. Чому рекомендується аналізувати розведені та нерозведені зразки?
10. Опишіть ефект «прозони».

**Література до практичної роботи 2:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - pp.: 168; 656-659.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 3

### РЕАКЦІЇ НАБУТОГО ІМУНІТЕТУ

#### Дослід 3. Реакція зв'язування комплекменту

**Матеріали** (на групу студентів): антиген, інактивована досліджувана сироватка, комплемент (сироватка мурчака), індикаторна система: еритроцити барана, вкриті гемолізином, водяна баня для інкубації, круглодонний 96-лунковий планшет, буфер (фізіологічний розчин з  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ ), контейнер з дезінфікантом для відходів, автоматичні дозатори об'ємом 0,01 мл і 0,2 мл, наконечники для автоматичних дозаторів.

#### Хід роботи

Постановка реакції здійснюється в 2 етапи: підготовчий етап, який виконується інженерами навчальної лабораторії, та безпосередньо постановка реакції, яка здійснюється студентами.

#### I. Підготовка реактивів (виконується інженерами навчальної лабораторії):

##### 1) Отримання еритроцитів барана (ЕБ):

Тварина повинна бути віком від 1 до 5 років. Кров у барана беруть шляхом пункції яремної вени не частіше ніж 1 раз на 10 днів, в об'ємі  $\leq 200$  мл у суху стерильну посудину зі скляними кульками, котру струшують протягом 5-10 хвилин після взяття крові для формування фібринових згустків. Після цього кров фільтрують через подвійний шар марлі для видалення фібринових згустків. У день постановки реакції ЕБ трьох-п'ятикратно відмивають ізотонічним розчином хлориду натрію шляхом центрифугування. Центрифугують 10 хвилин при 200 g. Після останнього центрифугування безбарвний надосад зливають, а осад знову центрифугують для його ущільнення. Надосадову рідину знову видаляють, а зі щільного осаду готують 3% завись ЕБ в ізотонічному розчині натрію хлориду (на 3 мл щільного осаду еритроцитів додають 97 мл ізотонічного розчину натрію хлориду). Відмиті еритроцити придатні для використання лише один день. За наявності гемолізу ЕБ для використання непридатні.

##### 2) Титрування компонентів реакції:

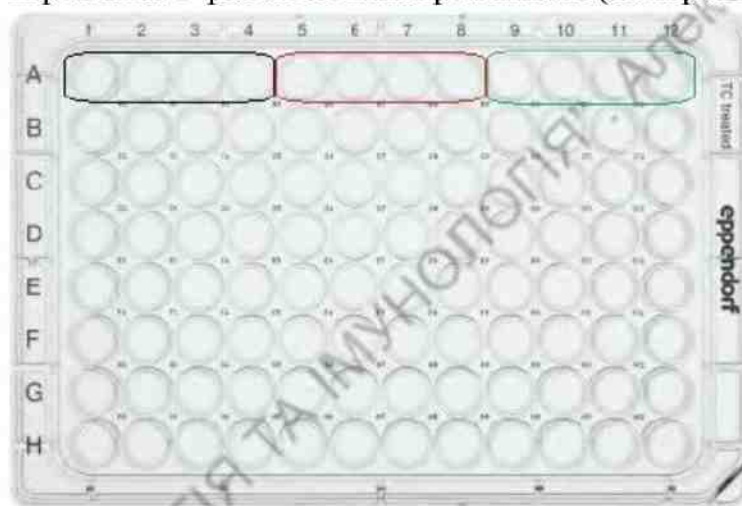
1. Позитивна контрольна сироватка: ліофілізат розчинити в 1 мл фізіологічного розчину. Вміст перелити в пробірку, **інактивувати сироватку 30 хв при 56°C на водяній бані для інактивації ендogenous комплекменту**. Далі інактивовану сироватку розвести фізіологічним розчином у співвідношенні 1:8.
2. Негативна контрольна сироватка: ліофілізат розчинити в 1 мл фізіологічного розчину. Вміст перелити в пробірку, **інактивувати сироватку 30 хв при 56°C на водяній бані для інактивації ендogenous комплекменту**. Далі інактивовану сироватку розвести у співвідношенні 1:4 фізіологічним розчином.
- 3а. Кардіоліпіновий антиген. Розфасований у рідкому стані. Розвести фізіологічним розчином відповідно до вимог виробника.
- 3б. Трепонемний антиген. Ліофілізат розчинити у фізіологічному розчині до концентрації, рекомендованої виробником.

- 3в. Комплемент. Ліофілізат розчинити у фізіологічному розчині до концентрації, рекомендованої виробником.
4. Гемолітична сироватка. Приготувати у робочому титрі згідно рекомендацій виробника.
5. 3% завись еритроцитів барана. Для приготування 5 мл робочої суспензії потрібно змішати 150 мкл ЕБ та 4,85мл фізіологічного розчину.

## II. Постановка реакції (виконується студентами):

Постановку реакції проводять у 96-лунковому круглодонному планшеті. Одному студенту/підгрупі студентів викладачем буде виділено 4 лунки планшета на постановку реакції, одна дослідна лунка та три контрольних (рис.3.1):

- 1) Позитивна сироватка з антигеном (дослідна лунка);
- 2) Позитивна сироватка з фізіологічним розчином (контрольна лунка);
- 3) Негативна сироватка з антигеном (контрольна лунка);
- 4) Негативна сироватка с фізіологічним розчином (контрольна лунка).



**Рис. 3.1.** Круглодонний планшет для постановки РЗК. Перший ряд планшета поділений на сектори (виділені різними кольорами) для використання підгрупами студентів (одна підгрупа використовує 1 сектор). Інші ряди лунок планшета можуть бути поділені на сектори подібним чином.

**Увага:** Для кожної маніпуляції використовується окремий наконечник для дозатора!

- 1) У лунки 1 і 2 внести по 20 мкл попередньо інактивованої позитивної сироватки.
- 2) У лунки 3 і 4 внести по 20 мкл попередньо інактивованої негативної сироватки.
- 3) У лунки 1 і 3 додати по 20 мкл робочого розчину антигену.
- 4) У лунки 2 і 4 додати по 20 мкл фізіологічного розчину.
- 5) У всі лунки внести по 20 мкл робочого розчину комплементу.
- 6) Вміст лунок ретельно перемішати піпетуванням. Далі планшет інкубувати в термостаті 30хв при 37 °С.

**Паралельно** з першим етапом потрібно приготувати гемолітичну систему: необхідно змішати рівні об'єми 3% суспензії еритроцитів та

гемолітичної сироватки (у робочому титрі, наприклад, до 5 мл приготованого 3% завису ЕБ потрібно додати 5мл гемолітичної сироватки). Добре перемішати. Отриману суміш інкубувати 30 хвилин при 37 °С для сенсibiliзації еритроцитів. Після завершення двох паралельних інкубацій: планшета та гемолітичної системи

- 7) У всі лунки додати по 40 мкл гемолітичної системи. Вміст лунок ретельно перемішати піпетуванням. Планшет інкубувати в термостаті 45хв при 37 °С, періодично струшуючи під час інкубації.

**Табл.1. Схема вмісту лунок планшета з описом ходу роботи**

Лунка 1 (дослід)	Лунка 2 (контроль)	Лунка 3 (контроль)	Лунка 4 (контроль)
1) Додати 20 мкл <b>позитивної</b> сироватки 2) Додати 20 мкл розчину <b>антигену</b> 3) Додати 20 мкл розчину комплементу 4) Ретельно перемішати	1) Додати 20 мкл <b>позитивної</b> сироватки 2) Додати 20 мкл <b>фізіологічного розчину</b> 3) Додати 20 мкл розчину комплементу 4) Ретельно перемішати	1) Додати 20 мкл <b>негативної</b> сироватки 2) Додати 20 мкл розчину <b>антигену</b> 3) Додати 20 мкл розчину комплементу 4) Ретельно перемішати	1) Додати 20 мкл <b>негативної</b> сироватки 2) Додати 20 мкл <b>фізіологічного розчину</b> 3) Додати 20 мкл розчину комплементу 4) Ретельно перемішати
Інкубувати 30хв в термостаті при 37 °С.			
1) Додати 40 мкл розчину гемолітичної системи 2) Ретельно перемішати	1) Додати 40 мкл розчину гемолітичної системи 2) Ретельно перемішати	1) Додати 40 мкл розчину гемолітичної системи 2) Ретельно перемішати	1) Додати 40 мкл розчину гемолітичної системи 2) Ретельно перемішати
1) Інкубувати 45хв в термостаті при 37 °С, періодично струшуючи. 2) Провести оцінку результатів.			

### Ресстрація та інтерпретація результатів

**Позитивна РЗК:** якщо не спостерігається гемолізу, це вказує на позитивну реакцію зв'язування комплементу. Антитіло реагує з антигеном, утворений комплекс зв'язує комплемент, тому лізис еритроцитів не відбувається через відсутність вільного комплементу.

**Негативна РЗК:** якщо спостерігається гемоліз еритроцитів, це вказує на негативну реакцію зв'язування комплементу. Комплекси антиген-антитіло не утворюються, тому комплемент залишається вільним і гемолізує еритроцити.

## **Висновок**

---

---

---

### **Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Дайте визначення терміну “комплемент”. Опишіть три шляхи активації комплекменту.
2. Поясніть принцип реакції зв'язування комплекменту.
3. Опишіть етапи реакції зв'язування комплекменту.
4. Яке найпоширеніше джерело екзогенного комплекменту використовується при постановці РЗК?
5. Найвище розведення сироватки морських свинок, що викликає лізис еритроцитів, називається ...?
6. Що таке амбоцептор?
7. Назвіть переваги та недоліки РЗК.
8. Яким чином оцінюють результати РЗК? Які умови виконання цієї реакції?
9. Назвіть основні модифікації непрямой РЗК?
10. Яке практичне використання РЗК в медицині (діагностиці)?

**Література до практичної роботи 3:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p.: 187-220; 658-660.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 4

### ВРОДЖЕНА КЛІТИННА ІМУННА ВІДПОВІДЬ. ФАГОЦИТОЗ

#### *Дослід 4. Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів крові*

**Матеріали** (на групу студентів): предметні скельця, пробірки з бактеріальною культурою, інкубатор, волога камера, дистильована вода, контейнерз дезінфектантом для відходів, автоматизовані піпетки для відмірювання об'єму 0,02 мл, розчин Хенкса, барвники для фарбування за методом Паппенгейма-Крюкова.

#### **Хід роботи**

##### Тест на фагоцитоз

1. Додати краплю капілярної крові на поверхню знежиреного предметного скла.
2. Інкубувати протягом 30 хвилин при 37 °С у вологій камері.
3. Видалити згусток крові ковзним рухом скла вниз.
4. Промити адгезовані клітини теплим (37 °С) збалансованим сольовим розчином Хенкса.
5. Додати 20 мкл бактеріальної суспензії в концентрації  $10^{7-8}$  клітин/мл до цитологічного препарату.
6. Інкубувати протягом 30-40 хвилин при 37 °С у вологій камері.
7. Промити скельце теплим (37 °С) розчином Хенкса, щоб видалити бактеріальні клітини, які не були фагоцитовані лейкоцитами крові.
8. Висушити препарат на повітрі.
9. Фарбування за методом Паппенгейма-Крюкова: використання фіксуючого барвника Май-Грюнвальда і барвника Романовського-Гімзе дозволяє добре диференціювати клітини. Спершу потрібно нанести на цитологічний препарат фіксуючий барвник Май-Грюнвальда на 5 хвилин; промити препарат дистильованою водою; нанести на цитологічний препарат барвник Романовського-Гімзе на 20 хвилин (перед використанням барвник розводиться дистильованою водою у співвідношенні **1:10**); залишити скло під кутом в штативі і висушити на повітрі.
10. Дослідити пофарбовані препарати з використанням 40-кратного збільшення об'єктива та розрахувати відсоток фагоцитозу (ФІ) – відсоток фагоцитуючих клітин (що містять поглинені бактерії) на 100 фагоцитарних клітин (моноцитів та нейтрофілів).

#### **Висновок**

---

---

---

---

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Чому після додавання крові на скло його потрібно інкубувати протягом 30 хвилин при температурі 37 °С?
2. Які типи клітин адгезують до скла?
3. Чому для відмивання клітин використовується збалансований сольовий розчин Хенкса, а не дистильована вода?
4. Яку концентрацію бактеріальних клітин потрібно вносити на скло?
5. Який барвник-фіксатор використовується при фарбуванні препарату методом Паппенгейма-Крюкова?
6. Яке розведення потрібно робити при приготуванні барвника Романовського-Гімза?
7. Яке збільшення об'єктива мікроскопа слід використовувати при дослідженні фагоцитозу?
8. Які фізичні та хімічні чинники блокують процес фагоцитозу?
9. Які фізичні та хімічні умови сприяють поглинанню бактеріальних клітин фагоцитами?
10. Які клітини є непрофесійними фагоцитами?

**Література до практичної роботи 4:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p.: 147-152.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 5

# АДАПТИВНА ГУМОРАЛЬНА ІМУННА ВІДПОВІДЬ. МУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

### Дослід 5. Імуноферментний аналіз (ІФА)

**Матеріали** (на групу студентів): 96-лунковий планшет для ІФА (або окремі «стріпи», що можна від'єднувати) із сорбованими моноклональними антитілами «захвату» проти цільового антигену, позитивний контроль (розчин з антитілами до досліджуваного антигену), негативний контроль (розчин без антитіл до досліджуваного антигену), кон'югат антитіл з пероксидазою хрому (HRP) - т.з. антитіла «детекції», дослідні сироватки, буфер для розведення зразків, концентрований розчин (x20) для промивання лунок планшету, дистильована вода, фільтрувальний папір, хромогенний субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМВ), розчин стоп-реагенту (1N HCl), контейнер з дезінфектантом для відходів, дозатори 0,02 мл, 0,1 мл та 0,2 мл, 1 мл, наконечники для дозаторів.

Примітка: **ОБОВ'ЯЗКОВО** змінюйте наконечники для дозаторів, після додаванням нових реагентів, сироваток та контролів у лунки планшету («стріпу»)

### Хід роботи

Ця експериментальна процедура є варіантом *прямого сандвіч-ІФА* для виявлення цільового *антигену* у сироватці крові. (див. схему аналізу на рисунку нижче).

У роботі використовуються два моноклональних антитіла з різною епітопною специфічністю до цільового антигену. Антитіла «захвату» іммобілізуються на твердій фазі (внутрішня поверхня лунки), антитіла «детекції» кон'югується з пероксидазою хрому (HRP). У лунки послідовно з часовими проміжками і необхідними умовами інкубації додаються досліджуваний зразок (сироватка крові) та кон'югат антитіл з пероксидазою хрому; під час інкубації цільовий антиген, що міститься у досліджуваному зразку, зв'язується з антитілами «захвату», потім до отриманого комплексу приєднується кон'югат (лише до комплексу «антитіло «захвату» - антиген»). Незв'язані компоненти видаляються під час процедури промивання лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югату антитіл прямо пропорційна кількості цільового антигену у досліджуваному зразку.

## Проведення експерименту (див. таблицю 1)

1. Кожна група (підгрупа) студентів повинна отримати смужку («стріп») з 8 лунок, закритих моноклональними антитілами, специфічними до цільового антигену (антитіла «захвату»).

- \* Додайте 100 мкл розчину кон'югату (антитіла «детекції») в кожен лунку.
- \* Додайте 20 мкл негативного контролю до перших двох лунок (A і B).
- \* Додайте 20 мкл позитивного контролю до двох наступних лунок (C і D).
- \* Додайте 20 мкл досліджуваної сироватки №1 до лунок E і F.
- \* Додайте 20 мкл досліджуваної сироватки №2 у лунки G та H.

**Інкубуйте планшет (окремий «стріп») протягом 60 хв при 37 ° C в термостаті.**

*Примітка:* розчини слід додавати на дно 96-лункового планшета (його окремого «стріпу») обережно, не торкаючись внутрішніх стінок лунки і не спричиняючи піноутворення (утворення бульбашок через піпетування розчинів з повітрям).

2. Під час періоду інкубації приготуйте 15 мл робочого розчину для промивання з концентрату (x20) розчину для промивання: розведіть 0,750 мл концентрованого розчину для промивання та 14,250 мл дистильованої води. Розчин потрібно ретельно перемішати, уникаючи утворення піни.

3. В кінці періоду інкубації видаліть рідину з лунок «стріпу» (96-лункового планшета) до контейнеру для відходів. Промийте лунки, заповнивши кожен 300 мкл робочого розчину для промивання, після чого видаліть до контейнеру для відходів; повторіть процедуру ще 4 рази. Залиште останню рідину з процедури промивання в лунках, поки ви не будете готові додати наступний реагент.

*Примітка.* Важливо, щоб лунки планшета для ІФА ніколи повністю не пересихали. Не видаляйте рідину з лунок поки ви не будете готові додати наступний реагент; щоб видалити більшість залишків робочого розчину для промивання акуратно струсіть планшет на фільтрувальний папір, легко постукуючи об поверхню фільтрувального паперу.

4. Додайте до лунок по 100 хромогенного субстрату (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, ТМВ).

*Примітка.* Не забудьте змінити наконечники для дозаторів між різними парами лунок.

5. Інкубуйте планшет («стріп») за температури + 18... 25 ° С протягом 15-20 хвилин у темному місці.

6. Додайте по 100 мкл розчину стоп-реагенту (1N HCl).

**Примітка.** Не забудьте змінити наконечники для дозаторів між різними парами лунок.

Додавання стоп-розчину слід проводити у тому ж порядку, що і розчин хромогенного субстрату.

7. Для кількісного ІФА не пізніше ніж за 5 хвилин слід визначити оптичну щільність у лунках «стріпу» 96-лункового планшету на мультилунковому спектрофотометрі за довжини хвилі 450 нм.

Таблиця 1. Схема проведення ІФА на лунках планшету

A і B (негативні контролю)	C і D (позитивні контролю)	E та F (дослідна сироватки #1)	G та H (дослідна сироватки #2)
5) Додати 100 мкл <b>кон'югату</b> (антитіла мічені пероксидазою хрону) 6) Внести по 20 мкл розчину негативного контролю	1) Додати 100 мкл <b>кон'югату</b> (антитіла мічені пероксидазою хрону) 2) Внести по 20 μl розчину позитивного контролю	1) Додати 100 мкл <b>кон'югату</b> (антитіла мічені пероксидазою хрону) 2) Внести по 20 мкл <b>дослідної сироватки крові #1</b>	1) Додати 100 мкл <b>кон'югату</b> (антитіла мічені пероксидазою хрону) 2) Внести по 20 мкл <b>дослідної сироватки крові #2</b>
Інкубуйте планшет (окремий «стріп») протягом 60 хв при 37 ° С в термостаті			
1) Злийте вміст лунок 2) Додайте по 300 мкл of <b>робочого</b> розчину для промивання ( <b>НЕ КОНЦЕНТРАТУ</b> ) 3) Після акуратного струшування планшету з розчином для промивання, видаліть рідину з лунок. Повторіть цей крок ще 4 рази. 4) Остаточо видаліть розчин для промивання з лунок і негайно додайте наступний реагент 5) Внесіть по 100 мкл розчину ТМВ (хромогенний субстрат)			
Інкубуйте планшет (окремий «стріп») протягом 15 хв при кімнатній температурі (18... 25 ° С) у темному місці			
1) <b>!!!хромогенний субстрат НЕ ВИДАЛЯЙТЕ з лунок.</b> Додати до нього по 100 мкл стоп-реагенту, акуратно струшуйте планшет протягом 1-2 хв 2) Зчитайте результати за допомогою мультилункового спектрофотометра			

### Інтерпретація результатів

**Позитивний результат:** Тільки лунки, які містять антиген, специфічно зв'язаний з антитілами, що сорбовані на лунки (антитіла «захвату»), і кон'югат (антитіла «детекції»), забарвлюються у блакитний колір. Реакція фермент-

субстрат зупиняється додаванням стоп-реагенту і колір лунок змінюється на жовтий (зміна рН).

**Негативний результат:** розчин у лунках, які не містять антиген, не змінить колір і буде безбарвним після додавання стоп-реагенту.

Зробіть висновок про наявність аналізованого антигену у досліджуваних сироватках №1 та №2.

**Висновок** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Яке діагностичне значення оцінки рівня антитіл? Які існують методи для виявлення специфічних антитіл?
2. Охарактеризуйте принцип сандвіч ІФА та основні переваги цього методу.
3. Охарактеризуйте принцип та основні переваги постановки конкурентного ІФА.
4. Які субстанції можна виявити за допомогою ІФА?
5. Який біологічний матеріал можна перевірити на наявність специфічних антитіл методом ІФА?
6. Вкажіть різницю між антитілами «захвату» та «детекції» у сандвіч-методиці ІФА.
7. Яка мета використання антитіл, кон'югованих з ферментами, у непряму сандвіч-варіанті ІФА?
8. Який метод використовується для аналізу результатів ІФА?
9. Як можна визначити кількість аналізованих речовин (антитіл чи антигенів) за допомогою різних методів ІФА?
10. Яке обладнання та реактиви потрібні для проведення ІФА? Який принцип використовується для візуалізації результатів ІФА?

**Література до практичної роботи 5:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p. 17; 80-91; 261-277; 385-415; 416- 427; 467-474; 659-664.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

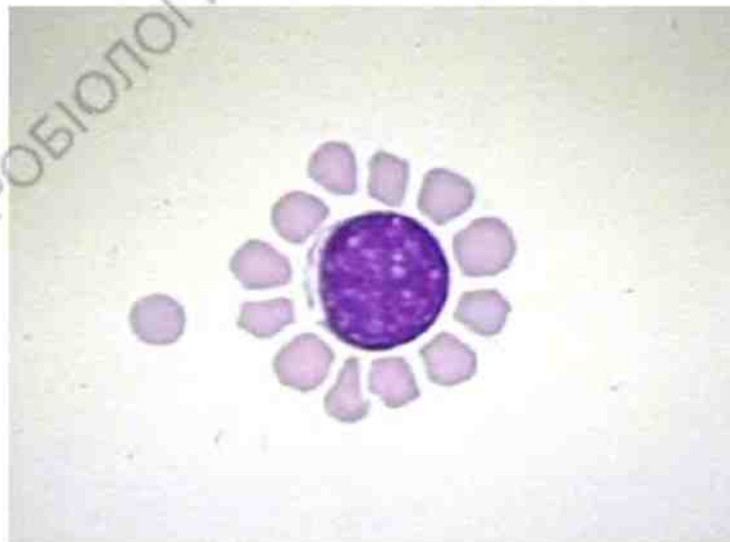
## Практичне заняття № 6

### АДАПТИВНА КЛІТИННА ІМУННА ВІДПОВІДЬ. ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ

**Дослід 6.** Імунофенотипування лейкоцитів периферичної крові *in vitro* з використанням еритроцитарних діагностичних систем «Анти-CD4» та «Анти-CD3»

**Матеріали** (на групу студентів): еритроцитарні діагностичні системи «Анти-CD4» та «Анти-CD3» з інструкцією, венозна кров, гепарин, розчин градієнта густини  $d=1,07$ , натрій-фосфатний буфер рН 7,2-7,4, розчин глутаральдегіду (0,12%), барвник Романовського-Гімзе, предметні скельця, дистильована вода, контейнер з дезінфектантом для відходів, центрифуга, пробірки (10 мл), інкубатор, холодильник, автоматичні дозатори (20 – 200 мкл), світловий мікроскоп.

**Принцип методу:** еритроцити барана кон'югують з моноклональними антитілами проти фенотипових маркерів Т-клітин (CD3) та Т-хелперів (CD4). Т-клітини, що експресують маркери CD3 та CD4, змішуються з еритроцитами барана, вкритими анти-CD3 та анти-CD4 антитілами, і ці еритроцити барана утворюють "розетки" навколо Т-клітин внаслідок з'єднання кон'югованих на їх поверхні антитіл з CD3 та CD4 (рис. 6.1).



**Рис. 6.1.** «Розетки», що утворилися при зв'язуванні Т-лімфоцитів з еритроцитами барана.

## Хід роботи

### ОТРИМАННЯ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЛЕЙКОЦИТІВ

3-5 мл крові з вени змішують у пробірці з гепарином (концентрація гепарину 200-250 Од/мл). Гепаринізовану кров розводять у 2 рази натрій-фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Мононуклеарні лейкоцити отримують центрифугуванням у градієнті щільності 1,077. Виділені клітини промивають 2-3 рази натрій-фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Необхідна кінцева концентрація клітин –  $2 \times 10^6$ /мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

### ПРОТОКОЛ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Додати 0,05 мл (50 мкл) CD-діагностикуму та 0,05 мл концентрату лімфоцитів у пробірку.
2. Інкубувати суміш протягом 40 хв при 37 °С.
3. Центрифугувати при 1000 об/хв протягом 5 хв.
4. Інкубувати протягом 1 години в холодильнику при 4 °С.
5. Видалити супернатант.
6. Додати до осаду 0,05 мл 0,12% розчину глутаральдегіду і обережно ресуспендувати (без утворення піни!). Інкубувати 5-7 хв, ще раз обережно ресуспендувати.
7. Розподілити суспензію приблизно на 1 см<sup>2</sup> площі знежиреного скла.
8. Висушити мазок, зафіксувати спиртом і зафарбувати барвником Романовського.
9. Визначити відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів, які зв'язали щонайменше 3 еритроцити (на 100 клітин) за допомогою світлового мікроскопа.

***Не потрібно враховувати: гранулоцити, агрегати клітин, та лейкоцити у складі клітинних агрегатів.***

***Примітка: розеткоутворюючі лімфоцити в нативних концентратах лімфоцитів можна підрахувати за допомогою камери Горяєва.***

Відсоток Т-клітин дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів при застосуванні CD3 діагностикуму.

У нормі їх відносна кількість становить 50-80% (в середньому 60 (±5,0%)) для дорослих та 47-76% (в середньому 55 (±4,8%)) для дітей.

Відсоток Т-хелперів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів при застосуванні CD4 діагностикуму.

У нормі їх кількість становить 33-46% (в середньому 40 ( $\pm 3,0\%$ )) для дорослих.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Питання, на які Ви маєте дати відповідь перед практичною роботою:**

1. Який зразок крові використовується для імунофенотипування клітин периферичної крові при проведенні даної практичної роботи?
2. Яке обладнання можна використовувати для підрахунку лімфоцитів?
3. Які CD-маркери експресуються на поверхні цитотоксичних лімфоцитів та Т-хелперів?
4. Які молекули кон'югуються з еритроцитами барана для проведення імунофенотипування периферичної крові?
5. Яке збільшення об'єктива світлового мікроскопа дозволяє спостерігати розеткоутворюючі лімфоцити при проведенні даної практичної роботи?
6. Яку концентрацію лімфоцитів варто використовувати для виготовлення мазка?
7. Який метод використовується для фарбування мазка лімфоцитів при проведенні даної практичної роботи?
8. Опишіть принцип та основні переваги методу проточної цитометрії.
9. Яких умов інкубації слід дотримуватися для утворення розеток Т-лімфоцитів з еритроцитами, вкритими анти-CD3 антитілами (або анти-CD4 антитілами)?
10. Який відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів повинен спостерігатися в нормі?

**Література до практичної роботи 6:** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p. 95-100 ;247-255; 299-324; 357-381; 388-406; 427-446; 467-474.

**ПІБ студента:** \_\_\_\_\_

**Підпис студента** \_\_\_\_\_

**ПІБ викладача:** \_\_\_\_\_

**Підпис викладача** \_\_\_\_\_

## Практичне заняття № 7

### ІМУНОПАТОЛОГІЯ ТА ІМУНОМОДУЛЯТОРИ

#### Теми доповідей для семінару «ІМУНОПАТОЛОГІЯ»

Підготувати міні-доповідь (усну доповідь на 5 хв у роздрукованому вигляді з 5-7 слайдами презентації PowerPoint) про один із патологічних станів на вибір студента: **відторгнення трансплантату** (хронічне, надгостре та гостре відторгнення алотрансплантату, реакція «трансплантат проти хазяїна» тощо), **алергійні захворювання** (контактний дерматит, алергійний риніт, алергічна астма, харчова алергія, тощо), **аутоімунні захворювання** (міастенія гравіс, антифосфоліпідний синдром, перніціозна анемія, системний червоний вовчак, тиреоїдит Хашімото, інсуліно-залежний цукровий діабет I типу, хвороба Грейвса тощо), **первинні та вторинні імунодефіцити, окрім СНІДу** (синдром ДіДжорджі, X-зчеплена агамаглобулінемія, ТКІД - тяжкий комбінований імунодефіцит, хронічний гранулематоз тощо).

Доповідь повинна включати такі пункти: 1. Причини (патогенез) та фактори ризику. 2. Діагностика. 3. Симптоми. 4. Специфічне лікування хвороби.

#### Теми доповідей для семінару «МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА В ДІАГНОСТИЦІ, ТЕРАПІЇ ТА ТЕРАНОСТИЦІ»

Підготувати міні-доповідь (усну доповідь на 5 хв у роздрукованому вигляді з 5-7 слайдами презентації PowerPoint) про один із препаратів терапевтичних моноклональних антитіл на вибір студента: Rituximab, Daclizumab, Infliximab, Adalimumab, Herceptin, Alemtuzumab, Basiliximab, Efalizumab, Abciximab тощо.

Доповідь повинна включати такі пункти: 1. Походження (ксеногенні, химерні, гуманізовані, рекомбінантні тощо). 2. Антигенна специфічність. 3. Терапевтичне застосування та механізм(и) терапевтичного ефекту. 4. Побічна дія.

**Література до практичної роботи 7. Immunopathology :** Kuby Immunology: 7th Edition/ By Owen, Punt, & Stranford. – 2013. - p.p. 485-513; 518-549; 593-623.

**Monoclonal antibodies:** M.M. Khan. Immunopharmacology, Springer Science+Business Media, LLC – 2008. - pp.107-121.

**Практичне заняття № 10**  
**ТЕСТОВА МОДУЛЬНА КОНТРОЛЬНА РОБОТА**

**Приклади контрольних питань:**

**1. Який шлях активації комплементу не потребує наявності антитіла (імунного комплексу) або поверхні бактеріальної клітини для ініціації?**

- A. Альтернативний
- B. Класичний
- C. Лектиновий
- D. Усі шляхи активації комплементу ініціюються комплексом антиген-антитіло

**2 Який компонент клітинної стінки бактерій є субстратом дії лізоциму?**

- A. пептидоглікан
- B. ліпополісахарид
- C. тейхоеві кислоти
- D. ліпопротеїни

**3. Імуноглобуліни якого класу зв'язуються з поверхневими рецепторами базофілів та мастоцитів з високою спорідненістю:**

- A. IgA
- B. IgD
- C. IgE
- D. IgG

**4. Гранули яких клітин містять гістамін та серотонін?**

- A. Макрофагів
- B. Базофілів
- C. Моноцитів
- D. Еозинофілів