

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЇ, ГЕОГРАФІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

Бесчасний С.П.

МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ

**робочий зошит до лабораторних робіт
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
спеціальності 222 Медицина**

Івано-Франківськ, 2024

УДК: 579:602.4(076)

Рекомендовано
вченою радою Херсонського державного університету
(протокол від 26.04.2024 №15)

Укладач С.П. Бесчасний – к. б.н., доцент кафедри біології людини та імунології ХДУ.

Рецензенти:

М.М. Байляк – д.б.н., професор, завідувач кафедри біохімії та біотехнології, ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника».

Н.В. Загороднюк – к. б.н., доцент кафедри б.н., доцент кафедри ботаніки, Херсонський державний університет.

Робочий зошит до лабораторних робіт з мікробіології містить протоколи виділення, культивування та ідентифікації мікроорганізмів. Наведені протоколи складають необхідний мінімум, необхідний під час проведення лабораторних занять, дозволяють сформувати відповідні навички культивування та подальшого дослідження готових мікропрепаратів. Наведено прийоми імунізації лабораторних тварин. Також наведено основні прийоми роботи з піддослідними тваринами, необхідні для імунологічних досліджень. Усі прийоми і методи цілком узгоджуються із Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Рекомендовано здобувачам другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 222 Медицина

УДК: 579:602.4(076)

© Бесчасний С.П., 2024

Зміст

1. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Основи асептики та антисептики, дезінфекція, стерилізація.....	4
2. Прості методи забарвлення мікроорганізмів. Мікроскопія.....	10
3. Класифікація мікроорганізмів. Метод фарбування за Грамом.....	13
4. Морфологія, структура бактерій. Складні методи фарбування.....	16
5. Будова спірохет, актиноміцетів, рикетсій, хламідій, мікоплазм, грибів, найпростіших.....	20
6. Середовища для культивування мікроорганізмів. Типи живлення бактерій. Типи дихання. Ріст, розмноження.....	24
7. Виділення чистих культур. Культури аеробних бактерій.....	29
8. Виділення чистих культур анаеробних бактерій.....	32
9. Методи визначення антибіотикочутливості бактерій.....	35
10. Бактеріофаги.....	38
11. Методика проведення ін'єкцій для імунізації лабораторної тварини.....	41
12. Органи і клітини імунної системи.....	43
13. Дослідження фагоцитозу.....	48
14. Антибактеріальна активність лізоциму слини.....	51
15. Визначення антигенів крові за допомогою моноклональних антитіл. Реакції на основі взаємодії антиген-антитіло.....	53
16. Вакцини.....	55
17. Проточна цитометрія. Імунофенотипування.....	58
18. Реакції зв'язування комплементу.....	61
19. Роль цитокінів у імунній системі.....	63
20. Схема отримання поліклональних та моноклональних антитіл.....	68
21. Аутоімунні процеси.....	71
22. Імунодефіцитні стани.....	75
23. Морфологія та ультраструктура вірусів. Особливості культивування вірусів...	79
24. Методи ідентифікації вірусів.....	87
25. Методика культивування вірусів у курячому ембріоні.....	91
Рекомендована література.....	95

Заняття №1.

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Основи асептики та антисептики, дезінфекція, стерилізація

Мета: засвоїти правила роботи в мікробіологічній лабораторії, розглянути класи біологічних відходів, вивчити методи і прийоми асептики та антисептики.

Питання для підготовки

1. Правила роботи в мікробіологічній лабораторії
2. Вплив фізичних та хімічних факторів на мікроорганізми
3. Методи хімічної дезінфекції
4. Методи фізичної дезінфекції
5. Стерилізація, контроль стерильності виробів медичного призначення

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Мікроорганізми, які використовуються на лабораторних заняттях, можуть бути патогенними для людини і тварин. Для цього необхідно дотримуватися певних правил, які дозволяють уникнути зараження себе та оточуючих. За умови порушення цих правил, той хто через свою необережність ставить під загрозу здоров'я інших, повинен залишити лабораторію.

Принципи поведінки:

1. Повідомляти про випадки розбиття скляного посуду, предметного скла та отримувати інструкції стосовно їх утилізації;
2. Знати прийоми асептики та антисептики;
3. Зводити до мінімуму продукцію аерозолів, які можуть бути джерелом інфекції;
4. Мити руки перед та після лабораторного заняття;
5. Ніколи не вживати їжу та напої у лабораторії;
6. Прибирати своє робоче місце та дезінфікувати його;
7. Ніколи не застосовувати косметику, не проводити маніпуляції із контактними лінзами, не торкатися обличчя та брати до рота олівці або ручки;
8. Будь-який матеріал у лабораторії завжди вважається інфекційним;
9. Рідини, які містять патогенні мікроорганізми, переливають над посудиною з дезінфікуючим розчином.

Зовнішній вигляд:

1. Прибирати довге волосся;
2. Працювати в халаті, вдягати рукавички;
3. Користуючись піпетками заборонено піпетувати ротом;
4. Про усі травми та надзвичайні ситуації повідомляти викладачу;
5. При роботі із цвілевими грибами необхідно використовувати марлеві маски.

Мікроорганізми за ступенем небезпеки об'єднують у 4 групи:

- I. Збудник чуми;
- II. Збудники високононтагіозних епідемічних захворювань (холера, бруцельоз, туляремія, сибірська виразка, лептоспіроз, меліоїдоз, сап);
- III. Збудники епідемічних бактеріальних інфекцій: кишкових (черевний тиф, паратифи А та В, дизентерія), туберкульозу, дифтерії, кашлюку, менінгіту, гонореї, лістеріозу, трахоми, лепри; патогенні анаероби, спірохети (збудники епідемічного поворотного тифу, сифілісу);
- IV. Сальмонели, протей, ешерихії, клебсієли, гемоглобінофілні бактерії, стафілококи, стрептококи, збудники газової гангрені).

Дезінфекцією називають прийоми та методи знищення патогенних мікробів у об'єктах оточуючого середовища. Стерилізація, на відміну від дезінфекції, передбачає у об'єкті (який стерилізується) знищення усіх вегетативних та спорових, патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Робота 1. Знайомство з гігієнічною обробкою рук.

Розгляньте схему гігієнічної обробки рук та відповідним чином вимийте руки. Кожен етап проводять по п'ять разів.



Робота 2. Класифікація біологічних відходів.

Ознайомтеся із класифікацією біологічних відходів та правилами поводження з ними.

Класифікація медичних відходів

Клас небезпеки та категорія медичних відходів	Опис відходів
IV клас (мало небезпечні). Категорія А — епідемічно безпечні медичні відходи	Відходи, які за своїм складом не відрізняються від побутових і не мають контакту з біологічними рідинами пацієнтів та інфекційними хворими Харчові відходи всіх підрозділів закладу охорони здоров'я, крім інфекційних, зокрема шкіро-венерологічних і фтизіатричних

	Меблі, інвентар, несправне або застаріле медичне та лабораторне обладнання, що не містить токсичних елементів
	Неінфікований папір та упаковка, будівельне сміття
III клас (помірно небезпечні). Категорія В — епідемічно небезпечні медичні відходи	Неінфіковані анатомічні відходи (тканини, органи, частини тіла, плацента, кров)
	Гострі предмети (голки, шприци, скальпелі та їх леза, предметні скельця, ампули, пусті пробірки, битий скляний посуд, вазофікси, пір'я, піпетки, ланцети)
	Відходи, які містять кров і біологічні рідини (матеріали, забруднені екскрементами, кров'ю або іншими біологічними рідинами людей, про інфекційний статус яких невідомо, контейнери з-під крові)
II клас (високо небезпечні). Категорія С — токсикологічно небезпечні медичні відходи	Лікарські, діагностичні, дезінфекційні засоби, фармацевтичні відходи, ліки, в яких закінчився термін придатності або які не можуть бути використані за призначенням, рентгенплівка
	Розчинники, хімічні речовини, дезінфікуючі засоби із закінченим терміном придатності або такі, які не застосовували, фіксуючі розчини
	Списані матеріали або обладнання, забруднені кров'ю і препаратами крові, іншими біологічними рідинами або екскрементами інфекційних хворих; анатомічні відходи інфекційних хворих (тканини, органи, частини тіла, плацента, ембріони тощо); відходи від хворих, які проходять курс гемодіалізу (обладнання для діалізу (трубки, фільтри тощо), простирадла, білизна, фартухи, рукавички, лабораторні халати, забруднені кров'ю)
I клас (надзвичайно небезпечні). Категорія С — токсикологічно небезпечні медичні відходи, категорія D — радіологічно небезпечні медичні відходи	Елементи живлення, предмети, що містять ртуть, прилади і обладнання, які містять важкі метали
	Лабораторні відходи (мікробіологічні культури і штами, що містять будь-які живі збудники хвороб, штучно вирощені в значних кількостях, а також лабораторні чашки та обладнання для їх переносу, інокуляції, змішування мікробіологічних культур збудників інфекційних захворювань, залишки живильних середовищ, інфіковані експериментальні тварини, їх екскременти та сміття з лабораторій, де проводилися експерименти чи дослідження)
	Цитотоксичні фармацевтичні відходи (цитотоксичні/генотоксичні препарати строком придатності, що збіг, залишки цих препаратів, забруднені цитотоксичними ліками матеріали)
	Відходи фармацевтичних препаратів, що потребують особливого обліку (містять наркотичні засоби, психотропні речовини і прекурсори; сильнодіючі)

	Відходи (матеріали), що утворюються в результаті використання радіоізотопів у медичних та/або наукових цілях у будь-якому агрегатному стані, які перевищують допустимі рівні (встановлені нормами радіаційної безпеки)
--	--

Робота 3. Методи фізичної стерилізації.

Ознайомтеся з методами фізичної стерилізації. Заповніть таблицю із характеристикою різних засобів фізичної стерилізації, які застосовуються у мікробіології.

Назва	Характеристика, принцип застосування
<p data-bbox="231 593 427 627">Стерилізатор</p> 	
<p data-bbox="159 1041 499 1153">Низькотемпературний плазмовий стерилізатор</p> 	
<p data-bbox="255 1489 399 1523">Автоклав</p> 	<p data-bbox="542 1489 1436 1523">Вкажіть температурні режими за різного тиску пари (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 атм)</p>

Сухожарова піч
("піч Пастера")



Апарат Коха



Робота 4. Методи стерилізації із застосуванням хімічних засобів – дезінфектантів.

Ознайомтеся з інструкцією з організації дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації медичних виробів і запишіть вимоги до стерилізації:

Охарактеризуйте основні групи речовин для дезінфекції:

Група	Назва, характеристика
Кислота+окиснювач	
Альдегіди	
Детергенти	
Галоїди	

Висновки: _____

Заняття №2.

Прості методи забарвлення мікроорганізмів. Мікроскопія

Мета: засвоїти правила і прийоми простих методів забарвлення мікроорганізмів та їхньої подальшої мікроскопії.

Питання для підготовки

1. Морфологія та класифікація мікроорганізмів
2. Методи мікроскопічного дослідження та правила використання імерсійної системи світлового мікроскопу
3. Яким чином визначають розміри бактеріальної клітини?
4. Правила приготування препарату із культур мікроорганізмів та його фарбування простими барвниками

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для виявлення та дослідження мікроорганізмів використовують мікроскопи. Світлові мікроскопи призначені для вивчення мікроорганізмів, які мають розміри не менше 0,2 мкм (бактерії, найпростіші), електронні – для вивчення більш дрібних мікроорганізмів (вірусів).

Відношення мікроорганізмів до барвників називаються тинкторіальними властивостями. У мікробіології широко використовуються анілінові барвники. Більшість мікроорганізмів краще сприймають основні барвники. Загалом, методи забарвлення поділяються на прості (або орієнтовані) та складні (диференційні), які виявляють хімічні та структурні особливості бактеріальної клітини.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Робота 1. Особливості різних видів мікроскопії.

Охарактеризуйте різні види мікроскопії, які застосовуються у мікробіології:

Назва	Характеристика (принцип, з якою метою використовується)
Світлова, імерсійна	
Темнопольна	

Фазово -контрасна	
Люмінесцентна	
Електронна	

Робота 2. Знайомство з простими барвниками, які використовують у бактеріології.

Розгляньте барвники для простого фарбування мікроорганізмів та рецепти їх приготування. Об'єднайте фігурними дужками та підпишіть колір (яким забарвлюються бактерії):

- Фуксин (основний, нейтральний)
- Конго червоний
- Метиленовий синій
- Толуїдиновий синій
- Генціанвіолет
- Метиленовий фіолетовий
- Хризоїдин
- Везувін
- Брильянтовий зелений
- Малахітовий зелений

Робота 3. Приготування мазку з подальшою імерсійною мікроскопією.

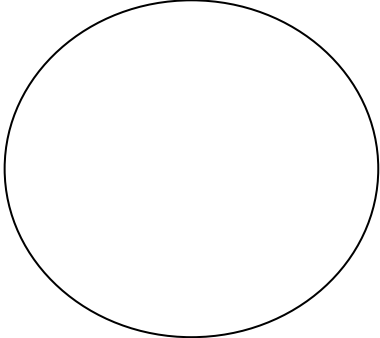
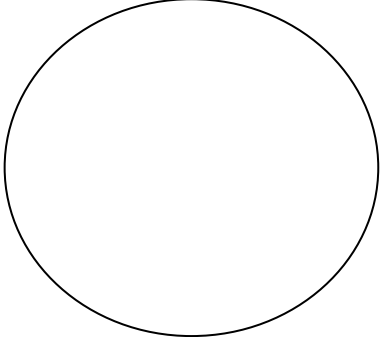
Приготуйте мазок культури стафілокока і кишкової палички та зафарбуйте їх за допомогою фуксину Пфейфера й метиленовим синім.

Етапи виготовлення препарату:

1. Отримання мазка

2. Висушування
3. Тричі фіксувати в полум'ї
4. Фарбування
5. Промивання та висушування.

Користуючись імерсійною системою мікроскопа розгляньте отримані препарати та зарисуйте побачене:

	Рисунок 1.
	Рисунок 2.

Висновки: _____

Заняття № 3.

Класифікація мікроорганізмів. Метод фарбування за Грамом

Мета: вивчити морфологічні та тинкторіальні властивості бактерій, оволодіти навичками фарбування мазків за методом Грама.

Питання для підготовки

1. Структура бактеріальної клітини
2. Складні методи фарбування: за Грамом, Циль-Нільсоном
3. Капсули та джгутики бактерій, методи їх вивчення
4. Спороутворення у мікроорганізмів
5. Взаємодія барвників із структурами бактерій

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

За умов використання складних методів забарвлення застосовують два барвника. Серед них – один барвник є основним, інший – додатковим. Окрім барвників, за складних методів фарбування використовують різноманітні знебарвлюючі сполуки (кислоти або спирти).

Особливістю забарвлення за Грамом є неоднакова сприйнятливість бактерій до барвників трифенілметанової групи. Бактерії, плазматична мембрана яких охоче зв'язується з цими барвниками та йодом, називаються грампозитивними (стафілококи, стрептококи). Грамнегативні (гонококи, менінгококи) не зафарбовуються метиловим фіолетовим та йодом, а натомість – зафарбовуються фуксином, набуваючи рожевого кольору. Разом з тим, забарвленість за Грамом є діагностичною ознакою для мікроорганізмів.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Робота 1. Розглянути та замалювати препарати-мазки основних форм бактерій.

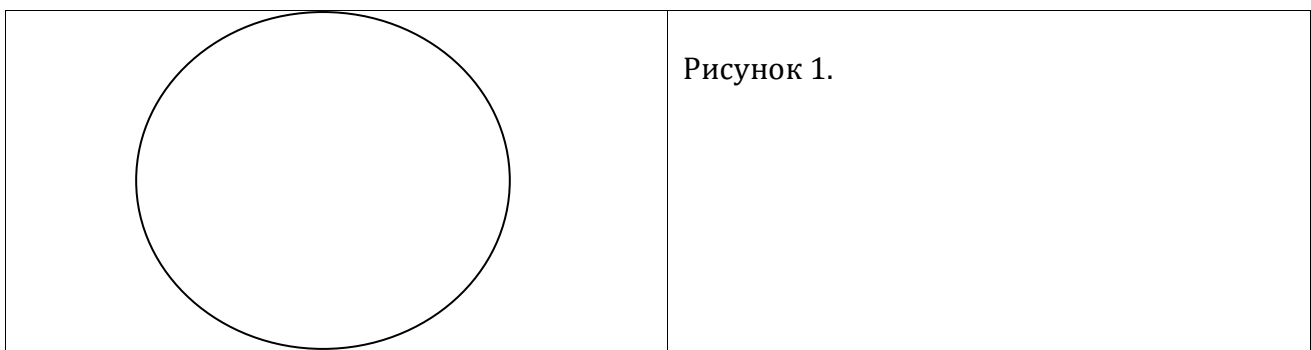
Мікрококи	Тетракоки	Стрептобактерії	Спірили
Диплококи	Сарцини	Монобацили	Трепоніми
Стрептококи	Монобактерії	Стрептобацили	Борелії

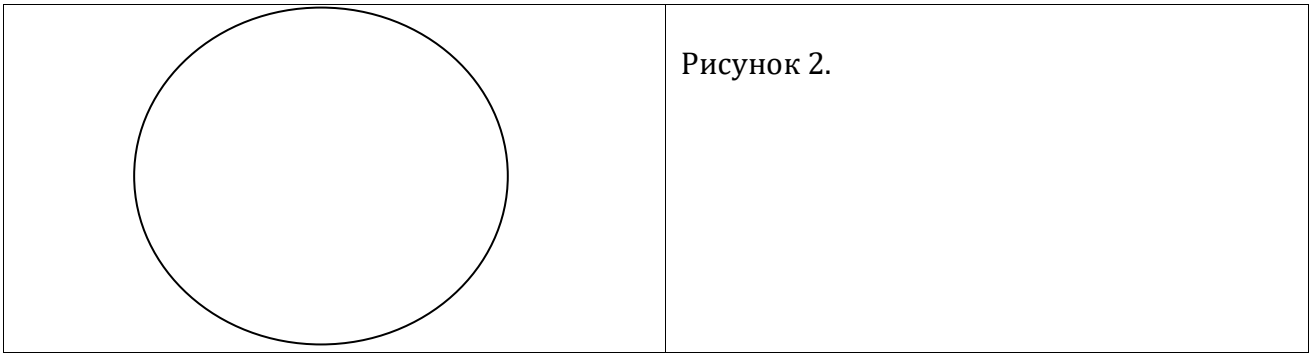
Стафілококи	Диплобактерії	Вібріони	Лептоспіри
-------------	---------------	----------	------------

Робота 2. Приготуйте мазок із суміші бактерій та зафарбуйте його за методом Грама.

- Візьміть чисте знежирене предметне скло. Необхідно позначити місце мазку на предметному склі за допомогою склографа зі зворотної сторони.
- Простерилізуйте предметне скло у полум'ї спиртівки.
- Простерилізуйте петлю.
- Простерилізуйте краї пробірки, уведіть петлю та охолодіть її об стінки пробірки.
- Візьміть культуру петлею та нанесіть на предметне скло. Розтираючи отриману краплю зробіть рівномірний мазок овальної форми діаметром до 1.5 см. Закриваючи пробірку знову простерилізуйте краї пробірки та пробку.
- Після приготування мазку не забудьте простерилізувати петлю та поставити її до штативу.
- Висушіть мазок на повітрі за кімнатної температури.
- Для фіксації – проведіть три рази предметне скло над полум'ям спиртівки.
- Покладіть папір (просочений генціанвіолетом) на мазок та змочіть його 2-3 краплями води (2-3 хв).
- Зніміть папір.
- Протягом 1 хвилини обробіть розчином Люголя.
- Для знебарвлювання нанесіть на мазок спирт на 1 хв.
- Промийте водою.
- Налийте на препарат фуксин на 1 хв.
- Промийте водою та висушіть фільтрувальним папером.

Використовуючи імерсійну олію дослідіть препарат під мікроскопом та зарисуйте побачене:





Робота 3. Механізми фарбування за Грамом.

Поясніть, яким чином різні інгредієнти барвника зв'язуються з клітинною стінкою бактерії. Зробіть висновок про призначення кожного з компонентів.

Компонент	Призначення
Генціанвіолет	
Розчин Люголя	
Спирт	
Фуксин	

Висновки: _____

Заняття № 4.
Морфологія, структура бактерій. Складні методи фарбування

Мета: оволодіти методами візуалізації оболонки, капсул, цитоплазматичних включень, органів руху, спор бактерій.

Питання для підготовки

1. Методика фарбування методом Ціль-Нільсена
2. Структура бактерії
3. Спороутворення у бактерій та методи виявлення спор
4. Будова джгутиків бактерій та методи їх виявлення
5. Різні види фімбрій та їхнє значення

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Складні методи фарбування застосовують для т.зв. кислотостійких мікробів. Особливість зафарбовування цих бактерій полягає в тому, що зафарбовані карболовим фуксином вони не знебарвлюються під впливом концентрованих кислот. Особливістю мікроорганізмів цієї групи є те, що вони погано сприймають барвники. Для того, щоб зафарбувати кислотостійкі мікроорганізми, доводиться використовувати концентровані розчини барвника у нагрітому стані з протравами та подовженим часом фарбування. До кислотостійких патогенних мікроорганізмів належать збудники туберкульозу та лепри.

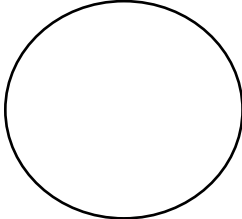
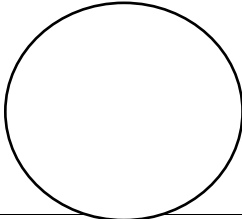
ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

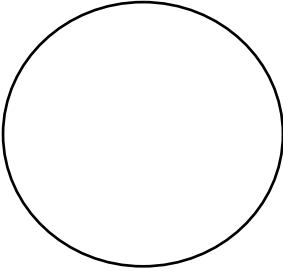
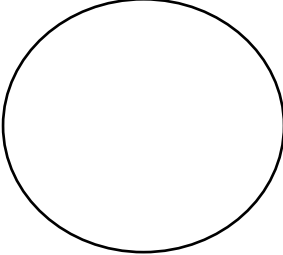
Робота 1. Розглянути та замалювати різні види розміщення спор і джгутиків бактерій.

Зарисуйте відповідні види розміщення спор та запишіть приклади назв бактерій:

Центральне	Субтермінальне	Центральне
_____	_____	_____

Зарисуйте різні види розміщення джгутиків у бактерій.

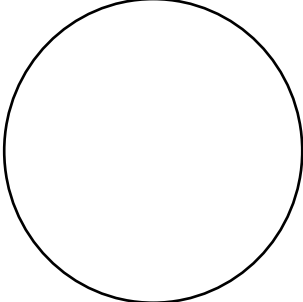
Монотрихи		Вид
Перитрихи		Вид

Амфітрихи		Вид
Лофотрихи		Вид

Робота 2. Фарбування фіксованого препарату за Цілем-Нільсеном та його мікроскопія.

Проведіть фарбування фіксованих препаратів за наступною схемою:

1. На фіксований препарат покласти суху смужку фільтрувального паперу;
2. Нанести 3-4 краплі карболового фуксину Циля. Тримаючи предметне скло за допомогою пінцета тричі нагрійте препарат над полум'ям спиртівки до появи пари. Час фарбування – 5 хвилин;
3. Після охолодження скла необхідно зняти фільтрувальний папір та промити його водою;
4. Для знебарвлення на препарат нанести розчин сірчаної кислоти (w = 5 %) на 30 секунд;
5. Ретельно промити препарат водою;
6. Нанести на мазок декілька крапель водного розчину метиленового синього (3-4 хв);
7. Промити водою та просушити фільтрувальним папером;
8. За допомогою імерсійної олії дослідити препарат під мікроскопом та зарисувати побачене до зошита.

	Назва препарату _____ Характеристика морфологічних та тинкторіальних властивостей _____
---	--