

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА
УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

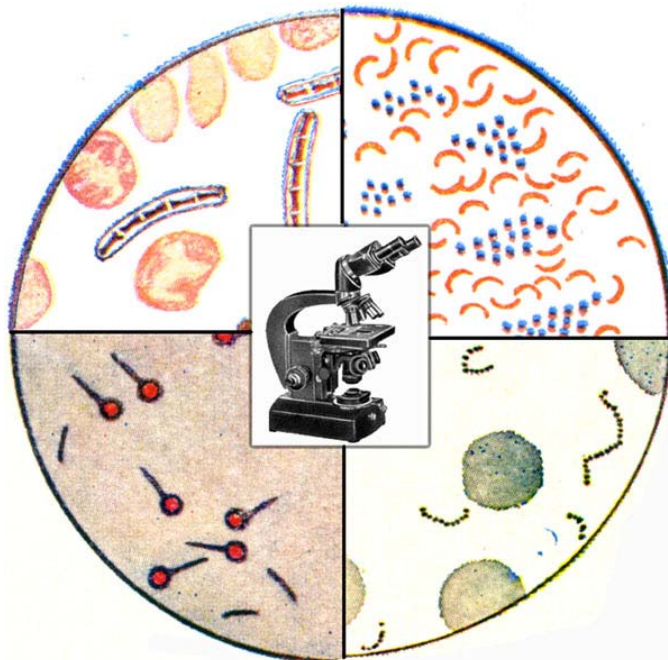
**Факультет технології виробництва і переробки продукції
тваринництва, стандартизації та біотехнології**

Кафедра зоогігієни та ветеринарії

**ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ і
ВІРУСОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

для виконання лабораторних занять та самостійної роботи студентами
напряму підготовки 6.051401 – «Біотехнологія»



**Миколаїв
2014**

УДК 579.2
ББК 28.4
3 14

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВШПТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 25.11.2014 р., протокол № 4.

Укладачі:

С. П. Кот – канд. біол. наук, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

В. А. Кириченко – канд. с.-г. наук, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

С. С. Крамаренко – канд. біол. наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Г. І. Калиниченко – канд. с.-г. наук, доцент кафедри технології виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет.

Відповідальний за випуск:

С. П. Кот – канд. біол. наук, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

Зміст

Вступ		4
Заняття 1.	Ветеринарна лабораторія. Мікроскопи та правила роботи з ними	4
Заняття 2	Морфологія бактерій. Простий метод фарбування	8
Заняття 3.	Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування	11
Заняття 4.	Фарбування спор, капсул, включень. Вивчення рухливості бактерій	14
Заняття 5.	Морфологія грибів і актиноміцетів	17
Заняття 6.	Лабораторна апаратура і методи стерилізації	19
Заняття 7.	Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур	26
Заняття 8.	Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів	32
Заняття 9.	Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу	39
Заняття 10	Визначення активності антибіотиків і антибіотикорезистентності мікроорганізмів	41
Заняття 11.	Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту	43
Заняття 12.	Імунітет. Серологічні реакції	48
Заняття 13.	Дослідження мікрофлори кормів	56
Заняття 14.	Збудники молочнокислого бродіння	61
Заняття 15.	Облік мікроорганізмів у молоці	68
Заняття 16.	Виділення чистих культур молочнокислих мікробів. Пропіоновокислі бактерії	73
Заняття 17.	Мікрофлора м'яса і яєць	76
Заняття 18.	Організація вірусологічних лабораторій	80
Заняття 19	Курячі ембріони та їх використання у вірусології	87
Заняття 20.	Методи діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів. Серологічні методи досліджень	96
	Рекомендована література	109

Вступ

Сучасні економічні процеси, що відбуваються в нашому суспільстві зобов'язують вищу школу підняти якість підготовки технологів, які будуть здатні направлено регулювати мікробіологічні процеси з метою підвищення якості кормів, молока, молочних продуктів, м'яса, яєць, профілактики і лікування хвороб тварин.

Лабораторні заняття дають можливість студентам набути навички роботи в мікробіологічній лабораторії і більш детально вивчити деякі питання теоретичного курсу.

Об'єкти вивчення – мікроорганізми невидимі неозброєним оком, тому студенти можуть ознайомитися з ними тільки з допомогою мікроскопа. Це відрізняє роботу в лабораторії з мікробіології від деяких інших біологічних дисциплін. В процесі вивчення у студентів формуються певні уявлення про мікроорганізми, про їх роль в природі і в тій галузі господарства, де буде працювати майбутній фахівець. Опанування мікробіологічними навичками, знайомство з властивостями мікробів допоможуть технологу правильно осмислено підійти до використання багатьох позитивних властивостей цих істот на практиці.

Усі лабораторні роботи виконуються студентами самостійно, результати роботи фіксуються в зошиті.

Методичні вказівки покликані допомогти студентам при підготовці до занять і у проведенні практичної роботи. Теоретична підготовка за усіма темами повинна проводитися за підручником та лекційним матеріалом.

Засвоєння навчального матеріалу систематично контролюється питаннями для самоперевірки, які наведені в кінці кожної теми та за допомогою тестових завдань.

Заняття 1

Тема: Ветеринарна лабораторія Мікроскопи та правила роботи з ними

Мета заняття: ознайомити студентів з обладнанням та структурою ветеринарної лабораторії, технікою безпеки в лабораторії. Вивчити особливості роботи з імерсійною системою.

Матеріальне забезпечення: мікроскопи і освітлювачі, зафарбовані мазки, мікробіологічні петлі, пастерівські піпетки, зливні

чашки, предметні скельця, барвники, кедрова олія, вода дистильована, таблиці.

Зміст заняття

Студенти знайомляться з будовою та обладнанням мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній. Опановують техніку мікроскопії у імерсійній системі.

Ветеринарна лабораторія – це самостійна державна структурна одиниця в системі ветеринарної служби району, області, країни. Основна задача лабораторії – діагностика хвороб свійських тварин та птиці, хутрових тварин, риб, бджіл, а також проведення експертизи молока, м'яса і інших продуктів та кормів.

Матеріалом для мікробіологічних досліджень служать кров, сироватка крові, молоко, сеча, фекалії, трупи загиблих тварин, шматочки паренхіматозних органів, проби води, повітря, ґрунту, кормів, рослин.

Нормативні документи, у яких викладені обов'язкові норми з лабораторної діагностики містяться у Ветеринарному законодавстві (том 3).

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає того, щоб приміщення лабораторії було ізольоване від житлових будинків, харчових складів, проїжджих доріг. У лабораторії передбачають такі окремі ізольовані приміщення (кімнати): для бактеріологічних, вірусологічних, серологічних, паразитологічних, хімічних і хіміко – токсикологічних, радіологічних, мікологічних, гематологічних, біохімічних, гістологічних досліджень, досліджень шкіряної сировини на сибірку, прийому патологічного та інших матеріалів, розтину трупів та обробки матеріалу, який поступив на дослідження, утримання здорових лабораторних тварин, зараження тварин та їх утримання, миття та автоклавування посуду, приготування живильних середовищ, розчинів тощо.

Основне обладнання лабораторії: мікроскопи різних типів, термостати, сушильні шафи, автоклави, водяні бані, центрифуги, апарати Коха, дистильатори, бактерицидні лампи і ін.

Правила роботи і поведінки у лабораторії

Знати і виконувати правила і техніку безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії необхідно для створення безпечних умов праці, покращення санітарно-гігієнічних умов у приміщеннях, а також запобігання нещасним випадкам. Тому співробітники і студенти повинні дотримуватись таких правил:

- Заходити і працювати в мікробіологічній лабораторії тільки в халаті.
- Не вносити у лабораторію сторонні речі.
- Працювати на одому й тому ж місці і користуватися закріпленим обладнанням.
- Дотримуватись чистоти і акуратності при роботі.
- Під час перерви у лабораторії забороняється палити і приймати їжу.
- На столі повинно бути тільки необхідне для виконання завдання.
- Весь матеріал, який потрапляє у лабораторію, повинен розглядатися як інфікований.
- При розпаковуванні заразного матеріалу необхідно дотримуватись обережності: банки, які містять матеріал для дослідження, обтирають зверху дезинфікуючим розчином і ставлять не безпосередньо на робочий стіл, а в спеціально призначений для цього посуд – підноси, кювети.
- При дослідженні зараженого матеріалу і роботі з патогенними культурами необхідно суворо дотримуватись загальноприйнятих у бактеріологічній практиці технічних прийомів, що виключають контакт рук із заразним матеріалом.
- Уражений матеріал та непотрібні культури підлягають обов'язковому знищенню в той же день.
- Після закінчення заняття робоче місце і обладнання приводять в порядок.
- Щоб попередити вибух не запалювати одну спиртівку від іншої, використовувати для цієї мети сірники, запальничку.
- Без дозволу викладача або лаборанта не включати електроприлади і апаратуру.
- Дотримуватись правил поводження з хімічними реактивами.
- Виходячи з лабораторії, вимити руки.

Мікроскопи і мікроскопія

Мікроскоп – оптичний прилад, який використовується для вивчення мікрооб’єктів. При вивченні мікробіологічних об’єктів застосовують мікроскопи різних моделей. Загалом, всі мікроскопи мають ідентичну будову. Серед світлових мікроскопів найбільш поширені моделі МБД (*мікроскоп біологічний дослідницький*), МБР (*мікроскоп біологічний робочий*) та “Біолам” – серії “Біолам - Р” – *робочий*, “Біолам - Д” – *дорожній*. Оптичне обладнання мікроскопів дозволяє отримати максимально корисне збільшення об’єктів у 1350 разів.

Робота з імерсійною системою

Мікроскоп ставлять навпроти джерела світла, конденсор піднімають у верхнє положення, діафрагму максимально відкривають. Об’єктив малого збільшення $\times 8$ підводять на 1,5 – 2 см від предметного столика наводять світло і визначають на препараті ділянку мікроскопії. Ліпше користуватись освітлювачем. Потім на вибране місце наносять краплю кедрової олії (коефіцієнт заломлення якої 1,51) і об’єктив переводять на імерсійний ($\times 90$). За допомогою макрогвинта занурюють фронтальну лінзу об’єктива у краплю олії до слабкого дотику її до предметного скла (під контролем ока збоку). Імерсійні об’єктиви мають коротку фокусну віддаль (до 1,3 мм), тому наводять на різкість шляхом піднімання тубуса макрогвинтом до появи зображення в полі зору мікроскопа. Після грубої наводки, більш точне фокусування досягають за допомогою мікрометричного гвинта, який дозволяється крутити не більше, ніж півоберта в той чи інший бік.

При дослідженні препарат рухають по горизонтальній площині, при цьому крапля імерсійної олії “повзе” і забезпечує оптичне гомогенне середовище у необхідному місці.

Після закінчення роботи об’єктив піднімають, знімають препарат і протирають фронтальну лінзу об’єктива серветкою, а потім її зволожують спиртом і знову протирають. Чистити об’єктив від імерсійної олії ксилолом або бензином не рекомендується, вони можуть розчиняти речовини, що склеюють лінзи об’єктиву.

Мікроскоп зберігають у спеціальному футлярі або під скляним ковпаком, щоб захистити його від пилу, а оптичну систему – від попадання променів сонця. Револьвер після роботи треба перевести на

мале збільшення, на предметний столик під об'єктив покласти чисту суху марлю, конденсор необхідно трохи опустити.

Контрольні питання

1. Задачі ветеринарної лабораторії.
2. Основні правила техніки безпеки у лабораторії.
3. Що таке імерсійний об'єктив, імерсійна система мікроскопа, імерсійна рідина?
4. Як за зовнішнім видом визначити імерсійний об'єктив?
5. Який коефіцієнт заломлення імерсійної олії?

Заняття 2

Тема: Морфологія бактерій Простий метод фарбування

Мета заняття: вивчити різні форми бактерій по таблицях, діапозитивах, мазках–препаратах. Приготувати, зафарбувати, провести мікроскопію і замалювати препарати із різних культур.

Матеріальне забезпечення: штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному і рідкому живильному середовищі, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарбників, змивні чашки, предметні скельця, олівці або чорнила по склу, анатомічні пінцети, спиртівки, мікроскопи, кедрова олія.

Таблиці: *кокові форми мікробів.*

Зміст заняття: студенти готують мазки з культур на щільному і рідкому середовищі, проводять фарбування фіксованих мазків простими методами. Усі препарати замальовуються.

Приготування фарбованих препаратів

1. Підготовка предметних скелець. Препарати готують на предметних скельцях, які повинні мати товщину не більше 1,2 – 1,4 мм. Застосування товстіших скелець не дозволяє одержати різке зображення країв діафрагми освітлювача в площині препарата, так як воно попадає в товщу скла, що порушує фокусування конденсора і різко знижує чіткість зображення.

Для бактеріологічних досліджень необхідно використовувати чисті, добре знежирені скельця. Нові скельця промивають водою, витирають насухо і зберігають у склянках із спиртом або спиртом-ефіром (порівну). Скельця, що використовувалися, витримують 1 – 2 години в концентрованій сірчаній кислоті або хромовій суміші а потім промивають водою, кип'ятять в мильній воді, промивають водою, ополіскують дистильованою водою, висушують в сушильній шафі. Скельця із рідин дістають пінцетом. Перед використанням їх, проводять через полум'я вогню. При роботі скельця беруть тільки з боків.

2. Приготування мазків. Мазок готують на предметному склі із допомогою бактеріологічної петлі або пастерівської піпетки.

Бактеріологічну петлю виготовляють із платиного дроту завдовжки 50 – 90 мм, вставляють у спеціальний тримач з рукояткою.

Вищезгадані інструменти в роботі тримають трьома пальцями – як олівець. Робочі частини – петлю або голку – перед взяттям матеріалу обпалюють у полум'ї вогню у вертикальному положенні. Мазки виготовляють із культур мікробів, тканин, крові, і т.д.

При виготовленні мазків із мікробних культур беруть у ліву руку пробірку з культурами так, щоб дно її було назовні, а корок, що її закриває, був усередині. Пробірку фіксують у долоні під кутом 45° , притискаючи її великим пальцем. В праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і фламбують її в полум'ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають ватний корок до долоні, виймають його з пробірки і тримають так під час послідуєчих маніпуляцій. Відкритий край пробірки обпалюють над полум'ям вогню і після цього вводять в пробірку стерильну петлю, охолоджують і набирають невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату. Горлишко пробірки після взяття матеріалу знову обпалюють в полум'ї спиртівки, потім обпалюють ватний корок і закривають ним пробірку. Взятий таким чином матеріал наносять на предметне скельце і рівномірно розподіляють по поверхні тонким шаром у вигляді мазка, а петлю знову розжарюють. Щоб отримати мазок менш густий, спочатку готують суспензію культури на запасному склі, а з неї готують мазок.

Якщо мазок готується із культур, що виростили, на щільних живильних середовищах, то попередньо на центр предметного скельця наносять краплю води або фізрозчину, петлею вносять дослідний матеріал і розподіляють його на предметному склі так, щоб отримати

рівномірний мазок площею 1-1,5 см². Якщо дослідний матеріал рідина, то попередньо краплю води або фізрозчину не наносять. Мазок висушують на повітрі або ж в струмені теплого повітря над полум'ям спиртівки і фіксують. Мазки повинні бути тонкими, висушеними на повітрі і зафіксованими.

При приготуванні мазків із дуже дрібних колоній, їх беруть нікельованою голкою злегка зігнутою на кінці. Кінчиком голки обережно забирають з центра колонії бактерійну масу і суспендують у фізрозчині, а потім з неї петлею роблять мазок.

Для фіксації бактерійних клітин на поверхні предметного скла останнє протягом 3-5 сек. декілька разів проводять крізь полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале нагрівання скла недопустимо, так як при цьому настає деформація бактерій.

Фіксація мазків хімічним способом.

1. Етиловий спирт 96⁰. Термін фіксації 15-20 хв.
2. Спирт – ефір. Термін фіксації 15-20 хв.
3. Метиловий спирт. Термін фіксації 1-5 хв.

Хімічний метод фіксації має переваги перед нагріванням тим, що при цьому морфологія бактерій не змінюється і застосовується переважно для фіксації мазків крові, мазків із молочних продуктів і т.д.

Простий метод фарбування мазків.

Розрізняють прості і складні методи фарбування. Фарбування простим методом полягає в тому, що препарат фарбують однією фарбою: водним фуксином (1-2 хв.), метиленою синькою (3-5 хв.) та інші.

В основі фарбування лежить фізико-хімічний процес, при якому проходить адсорбція фарби мікробною клітиною. Комплекс із мікроба і фарб є досить стійким і не піддається вимиванню водою. Чим вище концентрація фарби, тим вище швидкість адсорбції.

Після фарбування залишки фарби змивають і висушують фільтрувальним папером. При неповному висушуванні залишки вологи з імерсійною олією утворюють непрозору емульсію, яка погіршує зображення. Простим методом бактерії фарбуються в один колір

рівномірно, і інколи появляється зернистість, а також метахромазія (розчеплення тону кольору).

Контрольні питання

1. Як обробляють предметні і покривні скельця?
2. Техніка виготовлення мазка для фарбування.
3. Як підготувати бактеріологічну петлю?
4. Із яких етапів складається процес виготовлення мазка.
5. З якою метою і як фіксують мазки?
6. Техніка простого метода фарбування мазків.

Заняття 3

Тема: Паличкоподібні бактерії Складні методи фарбування

Мета заняття: ознайомитися з приготуванням фарбуючих розчинів. Оволодіти методикою фарбування за Грамом.

Матеріальне забезпечення: пробірки з культурами *Bac. megaterium* і *E. coli* або суміш мікроорганізмів, колба з прокислим пивом, мікробіологічні петлі, предметні скельця, спиртівки, набір фарб для фарбування за Грамом, фільтрувальний папір, мікроскопи, імерсійна олія. Таблиці зафарбованих бактерій та фарбування за Грамом.

Зміст заняття: студенти готують мазки з культур на щільному середовищі або прокислого пива, проводять фарбування фіксованих мазків за Грамом.

Фарби. При фарбування мазка фарба проникає в мікробну клітину. Це дає можливість розглядати не тільки її зовнішні ознаки, але й деякі особливості внутрішньої структури - спори. У мікробіологічній практиці використовують основні і кислі фарби. Мікроби, як і ядра клітин, фарбуються основними фарбами, рідше нейтральними. Кислі фарби служать для створення фону, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Із основних фарб частіше застосовують фуксин основний феноловий, сафронін, нейтральрот, (червоні фарби); метиловий голубий, азур II (сині фарби); малахітовий зелений (зелена фарба);

везувін, хризоїдин (жовтокоричневі фарби); пікринову кислоту (жовта фарба); нігрозин (чорна фарба) і т.д.

Розчини фарб можуть бути як спиртові, так і водні. Спиртові розчини фарб більш стійкі. Заздалегідь готують насичені спиртові розчини. До спирту додають стільки фарби, щоб на дні залишався нерозчинений осад. Із цих насичених розчинів готують розбавлені водно-спиртові розчини фарб для фарбування мікробів. Для підсилення дії фарби до неї додають протравлюючу речовину, яка підвищує стійкість водоспиртових розчинів, сприяє розрихленню оболонки і кращому фарбуванню мікробів. Для цього використовують спирт, формалін, фенол, луги, нагрівання фарби.

Рецепти виготовлення фарб та фарбуючих розчинів

1) Карболовий фуксин Ціля. Беруть 10 мл етилового спирту, додають 1 г основного фуксину. Залишають на одну добу додають 100 мл 5 % розчину карболової кислоти на дистильованій воді. Через добу розчин фільтрують і розливають по флаконам. Такий розчин фарби зберігається довго. В чистому вигляді його використовують для фарбування спор, збудника туберкульозу, лепри та інших.

Для фарбування багатьох видів мікроорганізмів застосовують розбавлені розчини. Беруть одну частину основного розчину і розбавляють у 10 мл дистильованої води.

2) Карболовий генціанвіолет – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, далі додають 100 мл 2% розчину фенолу. Фільтрують, розливають по флаконам. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

3) Метиленова синька – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, додають 30 мл 0,01% КОН. Через добу фільтрують. Ця фарба використовується для простого фарбування бактерій. Експозиція 1-2 хвилини.

4) Водний розчин сафраніну – 1 г фарби розчиняють у 50 мл гарячої дистильованої води, гарячим фільтрують, розливають по флаконам. Ця фарба добре фарбує капсулу антракси.

5) Водний розчин метилвіолету – 1 г фарби розчиняють у 100 мл гарячої дистильованої води, фільтрують. Фарба нестійка. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

б) Фарба Романовського–Гімзи – це суміш азуру – 0,8 г, еозину – 3,0 г, гліцерину х.ч. – 250 мл, метилового спирту – 250 мл. Фарби дуже ретельно розтирають у невеликій кількості гліцерину і спирту, далі додають решту кількість гліцерину та спирту. Розчин 4-6 діб витримують у термостаті при температурі 37⁰С, фільтрують.

Розчин Люголя – 2 г КJ розчиняють у 25 мл дистильованої води, додають 1 г кристалічного йоду, додають 275 мл дистильованої води, фільтрують.

Складні (диференціюючі) методи фарбування.

Складні методи фарбування застосовують з метою ідентифікації та диференціації мікробів. Хімічний склад і будова клітинної стінки мікробів різні і тому вони фарбуються одними і тими ж фарбами по різному і не однаково віддають їх при послідуєчому обезбарвленні етиловим спиртом, кислотами і іншими реактивами.

Фарбування за Грамом. Відношення бактерій до фарбування за Грамом визначається їх здатністю утримувати комплекс фарби з йодом. У грампозитивних бактерій клітинна стінка містить 90% пептидоглікану, тоді як у грамнегативних бактерій – 10% пептидоглікану, який представлений тонким шаром у глибині стінки клітини. В оболонці грамнегативних бактерій значно більше, ніж у грампозитивних міститься білків та ліпідів, які разом з полісахаридами утворюють поверхневі шари у вигляді мозаїки. Їх цитоплазма містить РНК та ДНК у співвідношенні 1:1, а у грампозитивних – 8:1. Проникність стінки у грампозитивних бактерій менша, ніж у грамнегативних. Це пов'язано з тим, що у грампозитивних бактерій міститься більше пептидоглікану та діаметр пор у них менший, ніж у грамнегативних бактерій.

Суть цього методу полягає в тому, що грампозитивні мікроорганізми містять магнієву сіль РНК, яка утворює з генціанвіолетом і йодом стійкий комплекс, який не знебарвлюється спиртом і зберігають початкове фіолетове забарвлення. Грамнегативні мікроби не здатні утримувати фіолетову фарбу і при проведенні через спирт знебарвлюються. Використання водного фуксину на завершальному етапі сприяє фарбуванню таких мікробів у рожево-червоний колір.

Техніка фарбування за Грамом

1. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають.

2. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

3. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.

4. Мазок ретельно промивають водою.

5. На 1-2 хвилини наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, а грамнегативні у червоний.

Для фарбування за Грамом студенти готують мазок із суміші мікробів (*Vac. megaterium* і *E. coli*) або прокислого пива (плівка на поверхні пива – оцтовокислі бактерії, внизу розміщуються дріжджі). На склі культуру змішують, мазок висушують, фіксують і фарбують за Грамом. Кишечна паличка і оцтовокислі бактерії – грамнегативні; капуста бацила і дріжджі – грампозитивні.

Контрольні питання

1. Які фарби використовуються в мікробіологічній практиці?
2. Структура, хімічний склад та функції клітинної стінки бактерій. Відмінності в будові клітинної стінки у грампозитивних та грамнегативних бактерій.
3. Яке значення в мікробіології має метод фарбування мікробів за Грамом?
4. Методика фарбування мікробів за Грамом.

Заняття 4

Тема: Фарбування спор, капсул, включень Вивчення рухливості бактерій

Мета заняття: оволодіти методикою фарбування спор, капсул та включень. Навчити визначення рухливості бактерій методами "роздавлена" та "висяча" крапля.

Матеріальне забезпечення: пробірки з добовою культурою *Vac. mesentericus* (картопляна бацила) і ізотонічним

розчином натрію хлориду, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарб, 3% - ний розчин H_2SO_4 , дистильована вода, піпетки, предметні і покривні скельця, зливні чашки, пінцети, спиртівки, мікроскопи, імерсійна олія.

Зміст заняття. студенти вивчають техніку фарбування спор, капсул, включень. Досліджують мікроби в живому стані і визначають характер їх руху.

Фарбування спор. Деякі мікроорганізми (бацили) в несприятливих для них умовах утворюють спори. При цьому процесі у протоплазмі формується зневоднене тіло. Воно вкривається п'ятишаровою оболонкою. В одній бактеріальній клітині утворюється завжди одна спора. Ендоспори бацил локалізуються у центрі і не перевищують діаметр материнської клітини. У кластридій вони розташовуються ексцентрично, термінально та субтермінально, завжди при цьому перевищуючи діаметр вегетативної клітини. Тому бацили різних видів, які містять спори, морфологічно між собою практично відрізнити важко, тоді як кластридії мають форму веретена, ложки, ракетки або барабанної палички. Спора може мати форму кулі, циліндра тощо. Поверхня спор може бути гладкою або мати вирости у вигляді шипів, кутів зірки тощо. Всі ці особливості характерні для виду і мають таксономічне значення. Зрілі спори погано фарбуються. Для виявлення спор та вивчення їх особливостей застосовуються спеціальні методи фарбування: Златогорова, Меллера, Ожежки.

Фарбування за Златогоровим. Висушений мазок 10 раз (замість 5-ти) проводять над полум'ям спиртівки для того, щоб вбити спори та розрихлити їхню оболонку. Далі на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля і підігрівають до появи пари. Знімають папір, зливають залишки фарби, наносять на 10 секунд 3% розчин сірчаної кислоти, промивають водою. На 1 хвилину наносять розчин метиленової синьки. Промивають водою і висушують мазок фільтрувальним папером. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативна клітина – у синій.

Спосіб Меллера відрізняється від фарбування за Златогоровим тим, що на фіксований мазок наливають 5% розчин хромової кислоти, витримують хвилину, зливають кислоту водою – далі фарбують у тій же послідовності, що і за Златогоровим.

Метод Ожежки. На нефіксований мазок наливають 0,5% розчин соляної кислоти, 2-3 хвилини підігрівають над полум'ям спиртівки. Кислоту зливають, препарат промивають водою,

просушують і фіксують над полум'ям. Далі фарбують за Ціль-Нільсеном: на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля, підігрівають до появи пари. Знімають папір, після охолодження скла мазок промивають водою, знебарвлюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти або 3% розчином солянокислого спирту. Промивають водою і дофарбовують 3-5 хвилин метиленовою синькою.

Дослідження мікробів в живому стані

Багато мікроорганізмів в живому стані здатні пересуватися. Швидкість і характер руху залежать від віку культури, оточуючого середовища і виду мікроба. Добре виражена рухливість у молодих культур, у старих вона сповільнена або зовсім відсутня. Рухливість припиняється із нагромадженням продуктів життєдіяльності. Наявність або відсутність руху – одна із ознак при визначенні виду мікробів.

Органами руху є джгутики, які здійснюють кругові рухи і по-різному розміщуються на тілі мікробної клітини. Для визначення рухливості у мікробів беруть молоді (12-24-годинні) культури. Дослідження проводять шляхом приготування висячої або притиснутої краплі.

Приготування висячої краплі. Висячу краплю готують на предметному склі з виїмкою. Край виїмки змазують тонким шаром вазеліну. В центр покривного скла наносять краплю рідкої бактерійної культури. Якщо мікроби вирощені на щільному середовищі, то спочатку на покривне скло наносять краплю ізотонічного розчину NaCl, а потім в неї – культуру мікробів. Предметне скло, виїмкою донизу, акуратно притискають до покривного так, щоб крапля знаходилась в центрі виїмки. Перевертають препарат покривним скельцем доверху. Крапля рідини повинна вільно звисати у центрі виїмки не торкаючись дна або стінок. Під малим збільшенням об'єктиву знаходять край краплі, ставлять його в центр, револьвер мікроскопу переводять на об'єктив "40" і дивляться в злегка затемненому полі конденсора, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Приготування притиснутої краплі. На поверхню предметного скла наносять краплю дослідного матеріалу або суспензію бактерій, накривають покривним склом. При притискуванні покривного скла рідина не повинна виходити за його край. Мікроскопують об'єктивом "40" в темному полі конденсора.

При вивченні рухливості необхідно відрізнити справжній рух від броунівського, при якому мікроби залишаються на місці, роблять

коливальні рухи під впливом молекул оточуючого середовища або пересуваються за током рідини.

Контрольні питання

1. Роль капсули у життєдіяльності бактерій. Її хімічний склад.
2. Процес спороутворення у мікроорганізмів. Структура та хімічний склад спори.
3. Методи фарбування спор.
4. Методи фарбування капсул.
5. Чим обумовлені рухові реакції мікробів ?
6. Що таке позитивний і негативний таксис?
7. Методи визначення рухливості мікробів.

Заняття 5

Тема: Морфологія грибів і актиноміцетів

Мета заняття: ознайомити з морфологічними особливостями плісневих грибів, дріжджів і актиноміцетів, замалювати деяких представників.

Матеріальне забезпечення: чашки з культурами грибів роду *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, дріжджів, препарати актиноміцетів, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, препарувальні голки, пастерки, розчин гліцерину, спирту та води порівну, пінцети, спиртівки, мікроскопи. Таблиці: схеми будови мукора, пеніцила і аспергіла.

Зміст заняття. Студенти вивчають особливості будови грибів, дріжджів, актиноміцетів. Виявляють подібність та відмінність актиноміцетів з бактеріями та нижчими грибами. Готують препарати з культур грибів родів *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Препарати замальовують в зошити.

Морфологія грибів

Гриби – безхлорофільні мікроорганізми, живуть на поверхні різних субстратів. Клітини грибів мають диференційоване ядро, тому їх відносять до еукаріотів. Плісневі гриби не вимогливі до поживних середовищ, але більшість з них потребують кисень повітря. Легко

переносять низькі температури, можуть жити і розмножуватись в холодильних камерах, серед грибів зустрічаються як сапрофіти, так і паразити.

Всі гриби ділять на вищі і нижчі і поділяють на 6 класів. Хітридієві, ооміцети, зигоміцети відносять до нижчих грибів; аскоміцети, базидіоміцети і дейтероміцети, недосконалі гриби – до вищих.

Всі гриби (рис 1), окрім примітивних нижчих і деяких вищих

(дріжджів), мають вегетативне тіло – міцелій, або грибницю, яка складається із тонких розгалужених гіф. Міцелій може бути занурений (субстрактний), який розвивається всередині середовища, і поверхневий (повітряний), який розвивається на поверхні середовища. У нижчих грибів гіфи не мають поперечних перетинок (несептований), у вищих – гіфи багатоклітинні. Інколи міцелій грибів утворює ризоїди – коренеподібні вирости, при допомозі яких прикріплюється до субстрату і одержує поживні речовини.

Склероції – це сплетіння гіф округлої або продовгуватої форми. Вони мають великі розміри, ущільнені, стійкі до несприятливого впливу середовища, містять мало води і багато поживних речовин.

Від міцелію відходять плодоносячі тіла спорангієносці у мукорових і конідієносці у монілієвих. Спорангієносці закінчуються розширенням – спорангієм з ендоспорами. На конідієносцях утворюються конідії, або екзоспори.

Мікроскопічне дослідження грибів. Звичайно гриби досліджують в незафарбованому стані. На предметне скло наносять краплю рідини (вода, спирт, гліцерин порівну). Препарувальною голкою беруть частину міцелію і розміщують його у краплі рідини. Міцелій обережно розправляють голкою і накривають покривним скельцем. Препарат вивчають спочатку під малим, а потім під середнім збільшенням в затемненому полі зору (звужена діафрагма). Препарат треба готувати поблизу предметного скла, не допускаючи розсіювання

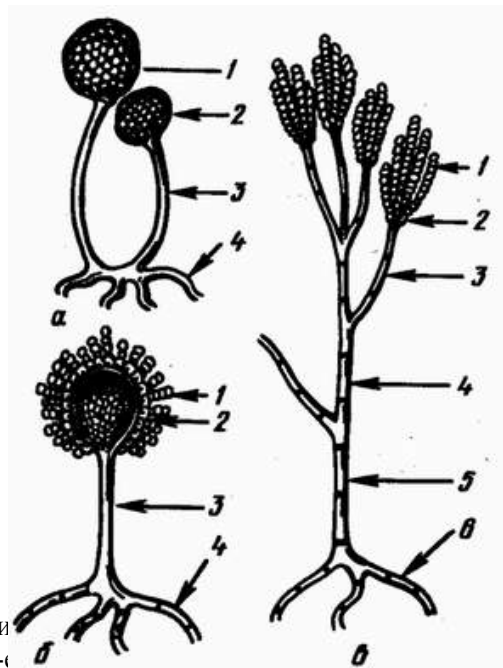


Рис. 1-а) аспергилалеєчна плісень (клас дейтероміцети): 1-конідії (екзоспори); 2-стерігми; 3-конідієносць; 4-міцелій; б) пеніцил (кістевик)-клас дейтероміцети: 1-конідії; 2-фіаліди; 3-метула; 4-гілка; 5-конідієносць; 6-міцелій

спор. Препарувальні голки після закінчення роботи ретельно фламбують над полум'ям спиртівки.

Дріжджі мікроскопують аналогічним методом, або готують з них мазки і фарбують за Грамом, а потім розглядають препарат під імерсійною системою мікроскопа.

Контрольні питання

1. Підготовка матеріалу і особливості мікроскопії грибів.
2. Особливості будови плісневих грибів.
3. Народного господарського значення грибів.
4. Морфологія, біологічні особливості головчатої плісені, чорного аспергіла, зеленого кістьовика.
5. За якими ознаками актиноміцети розрізняються і подібні до грибів і бактерій?
6. Будова дріжджів.

Заняття 6

Тема: Лабораторна апаратура і методи стерилізації

Мета заняття: ознайомитися з обладнанням і апаратурою бактеріологічної лабораторії ; основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням; правилами миття, обробки та підготовки до стерилізації лабораторного посуду, інструментів тощо; знезараження відпрацьованого патматеріалу.

Матеріальне забезпечення: стерилізатори, термостат, автоклав, водяна баня, мікроанаеростат, ексикатор, апарат Коха, піч Пастера, бактерицидна лампа, бактеріологічні фільтри, лабораторний посуд, інструменти, чашки Петрі, пробірки з культурами бактерій, таблиці.

Зміст заняття. Студенти знайомляться з будовою і роботою автоклава, сушильними шафами, вивчаються різні методи стерилізації, підготовка посуду і інструментів до стерилізації. Вивчають засоби дезінфекції в баклабораторії.

Стерилізація - процес, який передбачає знищення у об'єкті усіх вегетативних і спорових, патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

Підготовка до стерилізації: посуд миють і висушують. Пробірки,

колби, флакони закривають ватно-марлевым корком. Зверху на корки одягають паперові ковпачки (окрім пробірок). Чашки Петрі стерилізують загорнутими в папір по 1-5 штук, пастерівські піпетки по 3-15 штук. В верхню частину піпетки вкладають трохи вати для того, щоб попередити потрапляння матеріалу до рота. Під час роботи піпетки потрібно брати за верхній кінець. Градуйовані піпетки з ватним корком зверху, загортають кожну окремо у смужку паперу, для чого його нарізують смужками розміром (2-2,5) X (50-70) см. Лівий кінець загинають, накручують на піпетку, а верхній - закручують, або приклеюють. Посуд стерилізують сухим жаром при температурі 150 або 160, 190°C відповідно 2, 1 і 0,5 годин або у автоклаві при тиску 1 атм. протягом 20-30 хвилин.

Стерилізація шприців. Окремо циліндр і поршень опускають у 2% розчин соди на 30 хвилин. При роботі з споровим матеріалом поміщають в автоклав, стерилізують 15 хвилин при 2 атмосферах (132°C) або 30 хвилин при тиску 1,5 атм. (126°C). Шприци збирають після охолодження простерилізованими пінцетами.

Стерилізація металічних інструментів. Ножиці, скальпелі, пінцети тощо стерилізують у 2% розчині соди. Гострі частини інструментів необхідно загортати в марлю або вату.

Стерилізація бакпетель проводиться полум'ям: петлю у горизонтальному положенні спочатку вносять в нижню частину полум'я, щоб не відбувалося розбризкування патматеріалу. Коли все згорить, петлю переносять в верхню частину полум'я і переводять петлю у вертикальне положення. Вслід за петлею фламбують нижню частину тримача.

Стерилізацію паперу, марлі, вати проводять у сушильній шафі при температурі 160° протягом 1 години, або у автоклаві при 1 атм протягом 30 хвилин.

Стерилізацію гумових рукавичок, які забруднені вегетативними формами збудників хвороб, проводять кип'ятінням у 2% розчині соди або текучою парою протягом 30 хвилин. При спорових формах - автоклавуванням 20-30 хвилин при 1,5-2 атмосферах. Рукавички перед стерилізацією пересипають тальком. Кожну пару окремо обгортають марлею.

Стерилізація патогенних культур. Пробірки і чашки Петрі з непотрібними культурами складають в металевий бак, пломбують кришку і здають в стерилізацію, де проводять автоклавування протягом 30 хвилин при 1 атмосфері. Вегетативні

форми можна кип'ятити. Матеріал, що стерилізують заливають 2-5% розчином луку і ставлять на вогонь. Кип'ятять 1,5-2 години. Кришка бака повинна мати отвори для виходу пари.

Види стерилізації

Фізичні методи включають: 1)стерилізацію сухим жаром (фламбування, сухим нагрітим повітрям), 2)стерилізацію вологим жаром (кип'ятіння, текучою парою при 100⁰С, дробну стерилізацію при температурі нижче, ніж 100⁰С, стерилізація паром під тиском з температурою вище 100⁰С, пастеризація), 3) стерилізацію фільтруванням (бактеріологічні фільтри), ультрафіолетовими променями, ультразвуком.

Засоби стерилізації сухим жаром. Фламбуванням або пропалюванням, стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети і інші металеві предмети.

Стерилізація *сухим нагрітим повітрям* здійснюється в спеціальних сушильних шафах (печі Пастера) з подвійними стінками. Зовні шафа облицьована теплоізоляційним матеріалом, всередині – стінки металеві. У верхній частині шафи знаходиться термометр. Між теплоізоляційною обшивкою і внутрішнім металом шафи на дні є автоматичний електронагрівальний елемент. В печі Пастера стерилізують чистий скляний посуд. Колби закривають ватними корками, накривають паперовими ковпачками і зав'язують. Чашки Петрі і пастерівські піпетки загортають пачками в пергаментний папір. При включенні сушильної шафи в електромережу повітря всередині шафи нагрівається. При досягненні заданої температури відзначають час початку стерилізації. Режим стерилізації – при температурі 155-160⁰С, експозиція 2 год, при 165 - 170⁰С - 1-1,5 год, при 180⁰С – 1 год. По закінченні часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45⁰С, шафу відкривають. Речовини, що запалюються, живильні середовища, гумові та пластмасові предмети стерилізувати сухим жаром не можна.

Засоби стерилізації вологим жаром. Кип'ятіння - засіб стерилізації інструментів (шприци, голки, пінцети, ножиці, скальпелі та ін.) і деяких гумових та скляних предметів в стерилізаторах, які мають решітку. На решітку кладуть два-три шари марлі або тонкий шар гігроскопічної вати. Шприци стерилізують у розібраному вигляді, в голки вставляють мандрени. Лежа скальпелів і ножиці рекомендується обгортати марлею або ватою. В стерилізатор наливають воду (краще

дистильовану) так, щоб вона повністю вкривала інструменти. Стерилізатор закривають кришкою. Кип'ятять 20-30 хвилин. Після стерилізації воду обережно зливають, а інструментами користуються тільки після їхнього охолодження.

Стерилізація текучою парюю. В основу цього способу покладений засіб дробної стерилізації (розроблений Тиндалем, 1877) при різних температурних режимах не вище 100°C . Здійснюють стерилізацію в апараті Коха при 100°C 30-40 хв. Апарат являє собою металевий котел циліндричної форми з подвійним дном, що закривається кришкою з отвором для термометру і виходу пари. Всередині котла є спеціальна підставка з отвором для матеріалу, що стерилізують і нагрівальні елементи. На дно апарату наливають воду до рівня, про який судять за показами водомірної трубки.

Початком стерилізації вважають момент закипання води. Пара, що утворюється при цьому підіймається доверху безперервно до матеріалу, який стерилізується. Стерилізацію проводять 3 дні підряд. Однократне прогрівання вбиває тільки вегетативні форми мікроорганізмів. Спори, які залишалися життєздатними в періоди між стерилізацією проростають у вегетативні форми. Стерилізація на наступний день викликає їхню загибель. На третій день прогрівання гарантує повну стерильність матеріалу. Ефективність дробної стерилізації залежить від проростання спор, а тому в проміжках між нагріванням матеріали витримують при кімнатній температурі (25°C). Дробну стерилізацію при 100°C можна проводити і в автоклаві, закритому не герметично, у тих же режимах. Текучою парюю стерилізують живильні середовища і інші матеріали, що руйнуються при нагріванні їх вище 100°C (желатина, вуглеводи).

Тиндалізація – дробна стерилізація при температурах нижче 100°C . Стерилізацію здійснюють у водяній бані. Принцип цього способу той же, що і при стерилізації текучою парюю. Кратність нагріву залежить від температур, що застосовуються: при $70-80^{\circ}\text{C}$ протягом 3 діб, $60-65^{\circ}\text{C}$ – 5 діб, $56-58^{\circ}\text{C}$ – 6-7 діб. В перший день матеріали стерилізують 2 год., в наступні дні – по одній годині. В проміжках між прогріванням матеріал, що стерилізується витримують при кімнатній температурі для проростання спор. За допомогою тиндалізації при $56-58^{\circ}\text{C}$ стерилізують матеріали, що руйнуються при більш високій температурі (колоїдні розчини, сироватка крові і ін.).

Автоклавування – стерилізацію парюю під тиском з високою температурю, здійснюють в спеціальному апараті – автоклаві. В основі

цього способу лежить нагрівання матеріалу, поміщеного в автоклав з герметично закритою кришкою, чистою насиченою парою під тиском вище атмосферного. При зустрічі насиченої пари з більш холодним об'єктом пара конденсується перетворюючись на воду, в результаті чого виділяється велика кількість тепла, і температура об'єкту стерилізації швидко підвищується. Крім того, при конденсації пари відбувається зменшення його обсягу, що сприяє проникненню пари у внутрішні частини матеріалу. Обов'язковою умовою є надходження справді насиченої пари, щоб її торкання з холодним предметом вело до негайної конденсації і нагрівання та не призводило до вилучення води з матеріалу, який стерилізується. Сучасні автоклави електричні. Промисловість випускає автоклави вертикальні і горизонтальні.

Вертикальний автоклав являє собою двостінний металевий котел циліндричної форми, що закривається герметично кришкою. Через спеціальний кран з лійкою між стінками заливають воду до певного рівня. Внутрішня стінка котла у верхній частині має отвір, в нижній частині — кран, через який при нагріванні води пара витісняє повітря з котла. Автоклав нагрівають включенням в електромережу. Автоклав завантажують матеріалом, кришку закривають герметично, закривають кран, через який заливають воду, нижній кран тимчасово залишається відкритим. При закипанні води між стінками автоклаву пара, що утворюється піднімається доверху і через верхній отвір внутрішньої стінки потрапляє всередину котла, витісняючи повітря через нижній відкритий кран. Коли повітря все витиснеться і пара починає виходити рівним струменем, нижній кран закривають. В результаті тиск пари всередині автоклаву підвищується. Початком стерилізації вважають момент досягнення показань манометра заданої величини. Нагрівання регулюють протягом усієї стерилізації, підтримуючи тиск пари на одному рівні. При надмірному підвищенні тиску всередині автоклаву передбачений запобіжний клапан, через який автоматично надлишок пари виходить назовні:

При підвищенні тиску пари, відповідно підвищується і температура в автоклаві:

$0,505 \cdot 10^5$ Па (0,5 атм)	температура	110-112°C
$1,01 \cdot 10^6$ Па (1 атм)	»	120-121°C
$1,515 \cdot 10^6$ Па (1,5 атм)	»	124-126°C
$2,02 \cdot 10^6$ Па (2 атм)	»	132-133°C

Манометр показує тиск пари без врахування навколишнього атмосферного тиску (760 мм рт. ст.). По закінченні часу стерилізації

автоклав відключають. Після охолодження при нульовій позначці манометру відкривають кран для того, щоб випустити пару. Кришку відкривають обережно на себе, не заглядаючи в котел, уберігаючи очі від можливої залишкової пари. До повного виходу пари відкривати кришку не можна, бо при швидкому падінні тиску всередині автоклаву простерилізовані рідкі середовища закипають, корки з пробірок виштовхуються разом з рідиною.

В автоклаві стерилізують живильні середовища, що витримують нагрівання вище 100°C (МПА, МПБ, фізрозчин), скляний посуд, загорнутий в папір, перев'язочний матеріал, халати. Крім того, в автоклаві знезаражують використані бактеріальні культури, посуд. В цих випадках тиск пари і експозиція стерилізації повинні бути тривалішими (1,5 атм - 1 год.), ніж при стерилізації чистого матеріалу (0,5 атм. – 30-40 хв.). Для перевірки якості роботи автоклаву, відповідність показів манометра і температури пари використовують різноманітні хімічні речовини (бензонафтол, сірка), які мають певну температуру плавлення.

Горизонтальний автоклав відрізняється від вертикального конструкцією, але принцип роботи той же. **Пастеризація** – спосіб запропонований Пастером з метою збереження біологічної цінності харчового продукту (молоко, м'ясні, рибні і овочеві консерви), що знижується при кип'ятінні (руйнуються вітаміни і інші нестійкі до високої температури речовини). При пастеризації продукт нагрівають до 80°C 30 хв., після цього різко охолоджують (до $4-8^{\circ}\text{C}$). Пастеризацією досягається часткова стерилізація – гинуть вегетативні форми бактерій, а спори зберігаються. Різке охолодження і наступне зберігання при низькій температурі ($4-5^{\circ}\text{C}$) перешкоджають проростанню спор і наступному розмноженню бактерій.

Стерилізація фільтруванням полягає в пропусканні рідкого матеріалу через бактеріологічні фільтри шляхом створення на фільтрі перепаду тиску, або шляхом створення вакууму в приймальникові фільтрату. Дія фільтру полягає в механічній затримці і в адсорбції мікроорганізмів стінками пор фільтру. Розміри мікробів часто бувають менші середнього діаметру пор фільтрів. Фільтрують звичайно рідини, які не витримують нагрівання (сироватки крові, розчини антибіотиків і ін.). Фільтри бувають тверді – керамічні, азбестові і мембранні.

Частіше в роботі використовують фільтри Зейтца і мембранні фільтри, які вмонтовані в спеціальному утримувачі-лійці, вставленому

в корок, що закриває колбу Бунзена (товстостінна колба з тубусом). Змонтований фільтр загортають папером і стерилізують в автоклаві. Рідину, яка фільтрується наливають у лійку над фільтром, на тубус колби надягають гумову трубку, приєднану до ручного або електричного насоса, викачуванням повітря з колби створюють понижений тиск, і рідина фільтрується, бактерії залишаються на фільтрі. Стерильність отриманих фільтратів перевіряють посівом на живильні середовища з наступним інкубуванням в термостаті протягом декількох діб.

Стерилізація ультрафіолетовим промінням. В лабораторії джерелом УФ-опромінення служать спеціальні бактерицидні лампи. Ці промені використовують для знезараження повітря в приміщеннях (боксах, операційних). Бактерицидні лампи знайшли також своє застосування в харчовій промисловості при зберіганні різноманітних продуктів (температура вище 0°C).

Ультразвук, як фізичний стерилізуючий чинник, може бути використаний, наприклад, для знезараження води, молока, деяких продуктів. Стерилізуюча дія ультразвуку пов'язана з виникненням в цитоплазмі бактерій кавітаційних міхурців, заповнених паром з тиском біля 10 тис. атм., внаслідок чого руйнуються внутрішні структури бактеріальної клітини.

Стерилізація за допомогою хімічних речовин в лабораторній практиці має обмежене застосування і зводиться до консервування, з метою попередження бактеріального забруднення живильних середовищ, вакцин, а також лікувальних і діагностичних сироваток різноманітними хімічними сполуками (солі металів, луги, антибіотики і ін.). Живильні середовища консервують хлороформом, толуолом, інколи ефіром (для звільнення від консерванту середовище нагрівають до 56°C). Вакцини і лікувальні сироватки консервують фенолом (0,25-0,5%-ним), хлороформом (0,5%), формаліном (0,5%).

Хімічні речовини застосовують в лабораторіях і для дезінфекції.

Дезінфекція - це знищення патогенних мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища. Навіть у фіксованих і зафарбованих мазках іноді зберігаються збудники деяких хвороб. Тому дезінфекція в баклабораторії - це обов'язковий повсякденний захід. Дезінфекції не підлягає лише той посуд, де культивувались мікроорганізми; його складають в бікси, пломбують і здають в стерилізацію.

Контрольні питання

1. Поняття "стерилізація", "дезінфекція", їх застосування у практиці.
2. Методи стерилізації.
3. Автоклав, його будова і призначення.
4. Методи дробної стерилізації.
5. Стерилізація сухим жаром.

Заняття 7

Тема: Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур

Мета заняття: вивчити види і призначення живильних середовищ, навчитися готувати звичайні, спеціальні, диференціально-діагностичні і синтетичні середовища. Ознайомитися з будовою термостата, анаеростата і їх призначенням; засвоїти техніку посівів бактерій на живильні середовища. Засвоїти діагностичне значення виділення чистої культури і оволодіти методами, які застосовуються для отримання чистої культури.

Матеріальне забезпечення. Пробірки з МПБ, МПА скошений та стовпчиком, МПЖ, агар Ендо, Левіна, ЖС Кітта-Тароцці, пробірки з вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синькою, агар Ейкмана, кров'яний агар, зразки сухих живильних середовищ фабричного виробництва, компоненти живильних середовищ - агар-агар, желатина, пептон, сіль. Пробірки з лимонно-жовтим стафілококом, сінною паличкою, кишковою паличкою, бактеріологічні петлі, ексікатор, прилад Міхаеліса.

Зміст заняття. Студенти знайомляться з рецептурою приготування живильних середовищ. Проводять посіви мікроорганізмів на живильні середовища (МПБ, МПА, МПЖ, Ендо). Знайомляться з будовою термостата, ексікаторів. Засвоюють техніку виділення чистої культури методом Дригальського.

Для постановки діагнозу часто необхідно виділити збудника хвороби в чистій культурі. Для розмноження мікробів в лабораторії їх вирощують на живильних середовищах у термостатах. Живильні середовища за консистенцією бувають щільні та рідкі. За складом: білкові, безбілкові та мінеральні (розчини). За походженням: природні - тваринного походження (молоко, яйця, жовч, кров, кров'яна сироватка)

та рослинного походження (овочі, плоди, соки, зерно гороху тощо) . Широке застосування знайшли штучні середовища тваринного походження (МПА, МПБ, МПЖ) та рослинного (настої і відвари сіна, соломи, дріжджів, пивне сусло).

Любе живильне середовище повинно відповідати таким вимогам:

1. Містити поживні речовини необхідні для росту даного мікроорганізму в певних пропорціях.

2. Бути вологим, так як мікроорганізми засвоюють речовини з розчинів (голозойним шляхом).

3. Бути стерильним.

4. Бути прозорим - ця вимога тільки для тих середовищ, на яких вивчаються культуральні і біохімічні властивості (МПА, МПБ, МПЖ, вуглеводні середовища) .

5. Повинно мати слабо лужну реакцію (рН 7,2-7,4), крім тих, які призначені для вирощування молочнокислих бактерій та грибів.

Живильні середовища за своїм призначенням поділяють на звичайні (прості), кольорові і спеціальні. До простих відносять молоко, картоплю, МПБ, МПЖ, МПА. Кольорові - це середовища з індикаторами, які змінюють свій колір при виділенні продуктів життєдіяльності мікробів - кислот, ферментів. Спеціальні середовища готують для тих мікроорганізмів, які не ростуть на звичайних середовищах.

Агар-агар - це речовина, яку отримують з морських водоростей. Сорти: одеський, архангельський та інші. Складається з пектинових азотистих речовин і вуглеводів. Агар, як поживну речовину, більшість патогенних мікробів не використовують. Желатина – білкова речовина, яка отримується при виварюванні кісток, хрящів тварин. В гарячих розчинах агар і желатина розбухають і перетворюються на драглисту масу.

Для вирощування майже всіх збудників хвороб в заводських умовах виготовляють сухі живильні середовища. На етикетках вказано скільки необхідно взяти порошку на літр дистильованої води. Приготовані середовища нагрівають до розчинення порошку, визначають рН, фільтрують і стерилізують.

Кольорові живильні середовища (Гісса) використовують для визначення цукролітичних властивостей бактерій.

Середовища для визначення ферментації вуглеводів: агар Ендо - бактерії, які розкладають лактозу, фарбують середовище в червоний колір, а негідролізуючі - утворюють безбарвні колонії. Середовище

Левіна - має фіолетовий колір; бактерії, що розщепляють лактозу утворюють сині або чорні колонії, а що не розщепляють - безбарвні.

Живильні середовища для вирощування анаеробів: Кітта-Тароцці, кров'яний цукровий агар, мозкове середовище. Середовища для вирощування грибів: Сабуро, агар Чапека.



Рис. 2 Техніка посіву мікроорганізмів

Техніка посіву мікробів. Посіви для вирощування аеробів здійснюють як з нативного матеріалу, що надсилається в лабораторію, так і з вже наявних бактеріальних культур. Живильні середовища повинні бути стерильними. Посіви з проб матеріалу, що надійшов в лабораторію, проводять пастерівською піпеткою, з бактерійної маси — бактеріологічною петлею (рис. 4). Бактеріологічну петлю перед взяттям клітин мікроорганізмів стерилізують (рис. 2). Для цього дріт нагрівають до червона в полум'ї спиртівки і одночасно обпалюють частину тримача, що ближче до петлі, яка буде вводитися в пробірку з мікроорганізмами. Петлю рекомендується тримати в полум'ї спиртівки майже вертикально, щоб дріт був рівномірно розпечений на всю довжину. При фламбуванні необхідно пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній і периферичній частинах полум'я

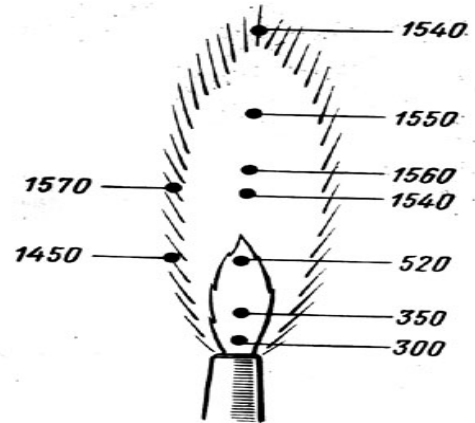


Рис.3. Значення температури ($^{\circ}\text{C}$) в різних ділянках полум'я

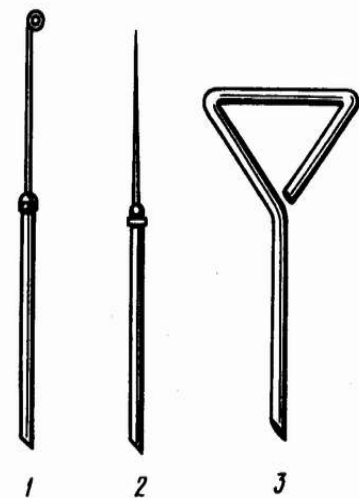


Рис.4. Інструменти для посіву і розсіву культур мікроорганізмів:
1-мікробіологічна петля;
2-мікробіологічна голка; 3-шпатель

(рис. 3), тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки. Зразу ж після стерилізації петлю вводять в пробірку з мікроорганізмами. Щоб не пошкодити клітин мікроорганізмів, петлю спочатку охолоджують, доторкаючись нею до внутрішньої поверхні пробірки або до живильного середовища, вільного від клітин мікроорганізмів, і тільки після цього захоплюють невеличку кількість мікробної маси. Посів обов'язково потрібно робити над полум'ям спиртівки. При посіві в рідкі середовища (МПБ, молоко) пробірку з матеріалом, що досліджується і пробірку з живильним середовищем тримають в лівій руці, в правій розташована петля або піпетка для переносу матеріалу в середовище і корки від пробірок. Біля полум'я спиртівки петлю (або піпетку) вносять в пробірку з матеріалом, беруть одну краплю, після цього обережно переносять в пробірку з стерильним середовищем, злегка занурюючи в нього, після цього обережно виймають, закривають корками пробірки, петлю фламбують над полум'ям спиртівки (пастерівську піпетку занурюють в банку з дезрозчином - фенолом, формаліном). Стежать, щоб не змокрили корки.

При посіві на щільне середовище пробірки з мікробною культурою і стерильним живильним середовищем (МПА) беруть в ліву руку, тримають скошеною поверхнею МПА доверху, корками в бік полум'я спиртівки. У відкриту над полум'ям пробірку з мікробною культурою, яку засіваємо (або іншим матеріалом) обережно опускають петлю, злегка торкаючись до поверхні вмісту пробірки, і, взявши одну краплю, переносять її в іншу пробірку зі стерильним середовищем. Петлю опускають до дна пробірки, занурюють в конденсаційну рідину і роблять посів штрихом — зигзагоподібними рухами проводять петлею вверх вздовж поверхні середовища. Пробірки закривають, петлю фламбують. Всі засіяні пробірки ставлять в термостат для вирощування. Через 16-18 або 24-48 год враховують результат.

Культивування мікроорганізмів відбувається в термостатах при певних температурах. Збудників хвороб теплокровних тварин культивують при 37-38°C, людини – 36-37°C, бджіл – 34-35°C, грибів – 28-30°C. Крім забезпечення температурного режиму, необхідно враховувати тип дихання мікроорганізмів: при аеробному типі дихання ніяких додаткових умов створювати не потрібно. Для анаеробів необхідно вилучити доступ вільного кисню повітря. З цією метою використовують ексикатор. З ексикатора фізичним, хімічним або біологічним методом видаляють повітря і ставлять його в термостат. Фізичний - за допомогою насоса викачують повітря, хімічний - на дно

ставлять чашку Петрі з хімічними речовинами, які активно зв'язують кисень повітря (пірогалол + їдкий натр), біологічний - на одну половину поживного середовища засівають аеробний мікроб, а на другу - анаеробний.

Виділення чистих культур. *Вид* – це сукупність мікроорганізмів, які мають однакове походження і генотип, подібну будову та функціональні ознаки. Ріст мікробних клітин одного виду на щільному або рідкому живильному середовищі називають **чистою культурою**. Культури мікробів одного виду, які вилучені з різних джерел, або з одного й того ж джерела, але в різні часи називають **штамом**. Види складаються з індивідуумів, які відрізняються між собою за якоюсь ознакою або групою ознак - це **варіанти**. Розрізняють культуральні, біохімічні, серологічні варіанти або варієтети за визначником Берджі. Культура, отримана внаслідок розмноження однієї клітини називається *клоном*. Клони широко використовують в науково-дослідних закладах. Бактерії одного виду, які виростили на щільному середовищі складають *колонію*.

Чисті культури необхідні для ідентифікації виду, приготування діагностичних, лікувальних і профілактичних препаратів, отримання в промислових умовах антибіотиків, ферментів, вітамінів, біогенних стимуляторів, виготовлення певних сортів молочних продуктів, вин, пива тощо. Належність мікробної культури до певної систематичної групи (класу, родини, роду, виду, варієтету) встановлюють шляхом вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних ознак. Велике значення в визначенні видів має пігментоутворення. Червоний пігмент утворює *Serratia marcescens*, білий – *Staph. albus*, золотистий - *Staph. aureus*, синьо-зелений - *Pseudomonas aeruginosa*, чорний - *Aspergillus niger*.

Виділення чистої культури. Один з перших методів був запропонований Пастером – **метод розведення** - полягає в тому, що матеріал, який досліджується послідовно розводять в рідкому живильному середовищі: беруть ряд пробірок зі стерильним МПБ (по 9-10 мл), матеріал, що досліджується піпеткою вносять в першу пробірку, перемішують, після цього з неї невелику кількість (0,1 мл) переносять в другу, після перемішування — в третю т. і д. (інколи до 10 пробірок) . Пастер вважав, що в останній пробірці можливе зростання одного виду мікроба. Цей метод використовують тільки як допоміжний при інших засобах.

Метод Дригальського – метод пластинчатого посіву. Беруть 4–5 стерильних чашок Петрі. Агарове середовище в колбі розплавляють на водяній бані, після цього, вийнявши пробку, злегка прогрівають краї колби і агар розливають в чашки Петрі рівномірним шаром. Закриті кришкою чашки Петрі залишають на столі. Після ущільнення середовища чашки ставлять в термостат для підсушування вверх дном на 3-4 години при 37-38°C. Краплю матеріалу, що досліджується бактеріологічною петлею вносять на поверхню агару, шпателем Дригальського розтирають рівномірно по поверхні середовища. Цим же шпателем, не опалюючи його, розтирають (засівають) по поверхні середовища другої чашки, після цього послідовно в третій, четвертій чашках. Після посіву їх розміщують у термостаті вверх дном. Зростання ізольованих колоній досягається в останніх чашках. Далі потрібну колонію відзначають, відвивають в МПБ і МПА, ставлять в термостат для вирощування.

Для отримання чистих культур користуються і іншими методами: нагріванням, додаванням до живильних середовищ (або до матеріалу, що досліджується) хімічних речовин, біологічним методом (зараження лабораторних тваринних). В випадках необхідності відділення *спорових форм від видів, які не утворюють спори*, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогрівають її в водяній бані при 80°C 30-40 хв. – вегетативні форми мікроорганізмів гинуть, спори зберігаються життєздатними. Далі прогріту суспензію висівають методом Дригальського.

Хімічний метод полягає в тому, що хімічні речовини в певній концентрації додають до живильних середовищ. Дія цих речовин на різні види мікробів неоднакова: одні види гинуть (бактерицидна дія), інші — затримуються в своєму рості (бактеріостатична дія), а на треті ці речовини не виявляють згубного впливу. На цьому принципі засноване застосування вибіркового і елективного середовищ.

Біологічний метод дозволяє виділити чисту культуру тільки патогенних хвороботворних мікроорганізмів: матеріал, що досліджується (суспензія тканини, суспензія бактерій) вводять чутливій тварині (біла миша, морська свинка, голуб, кріль). Тварини гинуть, їх розтинають, і посіви з внутрішніх органів дозволяють виділити чисту культуру.

Отримання чистої культури анаеробів. Принцип зберігається той же, що і при роботі з аеробами, тільки використовують спеціальні середовища: застосовуючи метод Дригальського, посів проводять на

глюкозо-кров'яний агар в чашках Петрі, які після цього поміщають в умови анаеробіозу (в ексікатор, мікроанаеростат). Користуються також засобом посіву на середовище Вільсона–Блера. Коли зростають окремі чорні колонії, їх пересівають в середовище Кітта–Тароцці, одержуючи таким чином чисту культуру. Для цієї ж мети може служити біологічна проба: матеріалом що досліджується (або змішаною культурою) заражають чутливу лабораторну тварину. Після її загибелі і розтину – проводять посіви в середовище Кітта – Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на глюкозо-кров'яний агар, як згадано вище.

Контрольні питання

1. Призначення живильних середовищ і вимоги до них.
2. Класифікація живильних середовищ.
3. Живильні середовища для культивування грибів.
4. Культивування аеробів.
5. Культивування анаеробів.
6. Виділення чистої культури методом Пастера, Дригальського.
7. Що таке вид, клон, штам, варіант, чиста культура ?

Заняття 8

Тема: Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів

Мета заняття: вивчити культуральні, цукролітичні, протеолітичні, редукційні властивості мікроорганізмів отриманих на попередніх заняттях і визначити їх видову належність за визначником.

Матеріальне забезпечення. Предметні та покривні скельця, культури стафілокока, кишкової палички в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ, середовища з різними вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленою синькою, агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева, МПБ з додаванням 2% азотнокислого калію, кров'яний агар, фільтрувальний папір, просочений 12% водним розчином щавлевої кислоти і 10% розчином оцтово-кислого свинцю, пробірки і чашки Петрі з посівами попереднього заняття, набори для фарбування за Грамом, Ціль-Нільсоном, таблиці.

Зміст заняття. Студенти враховують результати посівів на попередньому занятті - при консультації викладача відмічають характер росту на рідкому і щільному живильних середовищах. Культури розглядають макроскопічно (візуально) і мікроскопічно (під лупою). Потрібну колонію пересівають в пробірки з середовищами для визначення цукролітичних, протеолітичних і редуційних властивостей мікроорганізмів, ставлять у термостат. Викладач знайомить студентів з існуючими визначниками мікробів і технікою визначення виду. З колоній, які вирости на МПА студенти роблять мазки і фарбують їх за Грамом і Ціль-Нільсоном. Використовуючи основні ознаки, визначається вид мікроорганізмів.

Культуральні властивості. Колонії, які вирости, характеризують за розміром, формою, кольором, консистенцією, контуром краю, структурою та характером поверхні.

Зростання *мікроорганізмів в рідких живильних середовищах* не характеризується великою різноманітністю. При макроскопічному дослідженні (неозброєним оком) відзначають характер і ступінь помутніння середовища: рівномірне (дифузне), інтенсивне, помірне, слабе і у вигляді опалесценції. Зростання культури в рідкому середовищі може бути поверхневим у вигляді плівки на всій поверхні середовища, підійматися (загинатися) на стінки пробірки або займати тільки частину поверхні середовища, не доходячи до стінки пробірки. Враховують колір плівки (блакитний, жовтуватий, сірий, білий), товщину (тонка, товста, ніжна, груба), характер поверхні плівки (складчаста, зморшкувата, гладка, сітчаста, пухнаста), консистенцію (крихка, ослизла,). Культури мікробів деяких видів в рідкому середовищі утворюють осад – він може бути численний і незначний, щільний (компактний), пухкий, зернистий, у вигляді шматочків вати, пластівців, ослизлий. За кольором – білий, жовтий, матовий, зеленуватий, сіруватий та ін. При струшуванні осад або розбивається, створюючи рівномірне помутніння середовища, або утворюються великі або ж дрібні пластівці, грудки; ослизлий осад може підійматися вверх в вигляді «коси» з помутнінням середовища, або воно при цьому залишається прозорим.

Зростання культури в рідкому середовищі може бути пристінним. Воно супроводжується прикріпленням та розмноженням мікробів на склі (на стінках пробірок) з утворенням характерного матового нальоту, дрібних пластівців, зерен.

Зростання мікробів в напіврідкому *середовищі*, що не володіють рухливістю, відбувається за уколом у вигляді білуватого стрижня. Навколишнє середовище при цьому залишається прозорим. Рухомі

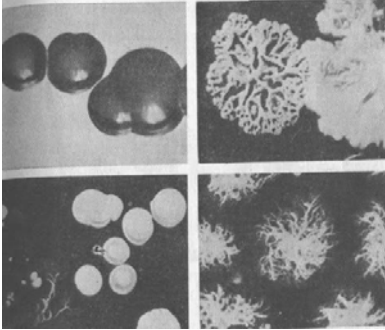


Рис. 5. Колонії різних мікроорганізмів на МПА

мікроорганізми викликають помутнення напіврідкого агару різної інтенсивності, що розповсюджується у вигляді «хмарок».

Посів мікробів в МПА, МПЖ (стовпчиком) роблять

уколом суворо по центру в глибину середовища або в безпосередній близькості до стінки пробірки.

Зростання мікробів на щільних *живильних середовищах* (МПА) супроводжується утворенням колоній – скупчень мікробів (рис 5), що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини. Колонії характеризуються великою різноманітністю, можуть бути ізольованими і злитими. Вивчення їх проводять неозброєним оком і з допомогою мікроскопа або лупи. Звичайно заздалегідь відзначають характер зростання – численний, помірний, незначний; після цього враховують наступні ознаки:

А) форма – правильна (овальна, округла), неправильна (зіркоподібна, гілляста та ін.);

Б) розмір (вимірюють з допомогою лінійки або окуляра-мікромметра мікроскопа) – великі (діаметр понад 4 мм), середні (діаметр 2-4 мм), дрібні (діаметр 1-2 мм) і дрібні – росяні (діаметр менше 1 мм);

В) край колонії (рис 6) – рівний (S-форма), шорсткий (R-форма), хвилястий, бахромчастий, зубчастий, локоноподібний;

Г) прозорість і блиск – прозора, напівпрозора, мутна колонія;

Д) колір – сірувато-білий, безбарвний, білий, кремовий, оранжевий, блакитний, зелений, золотистий, жовтий, червоний, синій, чорний та ін. Колір колоній культури бактерій залежить від кольору пігменту, який вони виробляють;

Е) профіль (рельєф) (визначають у відбитому світлі) – опуклий,

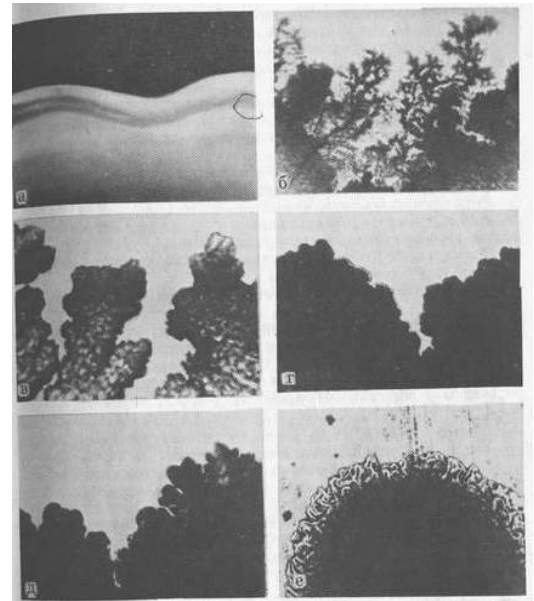


Рис.6. Край колоній мікробів:
1-хвилястий; 2-гіллястий;
3-розірваний; 4-ізірзаний;
5-лопасний; 6-локоноподібний

плоский, конусоподібний, кратероподібний, з валиком по колу;

Ж) поверхня (рис. 7) - гладка, горбкувата, зморшкувата, складчаста, з концентричними колами;

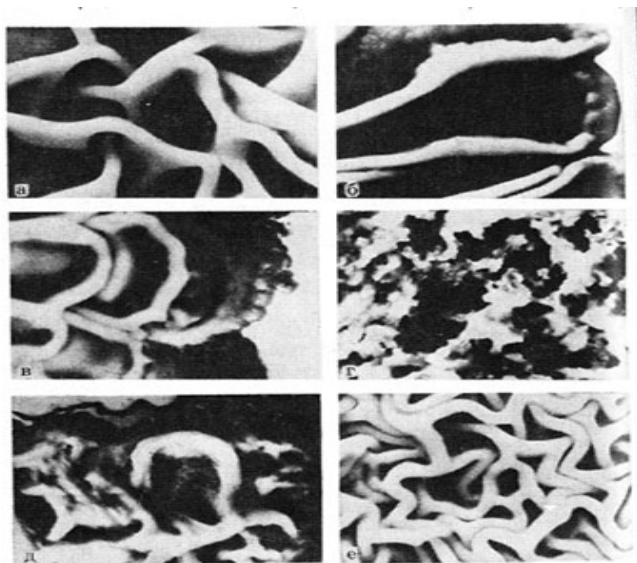


Рис.7. Поверхня колоній мікробів:
1-складчаста; 2-радіально складчаста; 3-поперечно складчаста; 4-ніздrevата; 5-з кратероподібним центром; 6-мозковидна

З) консистенція (визначають дотиком до поверхні колонії бактеріологічною петлею) – щільна (легко знімається з агару або вростає в товщу середовища), крихка, ослизла (тягуча, прилипає до петлі), тістоподібна, олієподібна;

Г) структура - однорідна, волокнувата, плівчаста, зерниста.

При перегляді колоній під мікроскопом чашки Петрі розміщують на предметний столик дном уверх, а пробірки з агаровою культурою – скошеною поверхнею агару

донизу. На поверхні агару при посіві штрихом бактерії ростуть у вигляді ізольованих колоній або утворюють суцільний наліт з рівними, хвилястими, краями. Інколи цей наліт буває дифузним, перистим або ризоїдним (деревоподібним). При цьому відзначають колір, характер поверхні, консистенцію, прозорість штриху.

Колонії *вивчають* у віці однієї доби!

Культуральні властивості анаеробів вивчають на середовищі Цейслера. Вони утворюють десять видів колоній. Для ветлікаря мають значення шість з них:

1. Гудзикоподібні підвищення. Колонії оточені великою коричнево-болотистою непрозорою зоною - *Cl. perfringens*.

2. Округлі, коренеподібні, безбарвні або ніжно сірі колонії - *Cl. botulinus*, *Cl. oedematiens*.

3. Вуалеподібні із зрізаними краями колонії, часто з ніжними відростками, безбарвні. Легкий гемоліз - *Cl. tetani*, *Vibrio septique*.

4. Колонії мають вигляд перламутрового гудзика і форму виноградного листа. Плоскі з підвищеннями в центрі, ніжно синьо-фіолетового відтінку. Незначний гемоліз - *Cl. chauvoei*.

5. В'язкі, іноді у вигляді твердих бородавок колонії, білі або непрозорі. Часто вузька інтенсивна зона гемолізу - *СІ. sporogenes*.

6. Білі, ніжно блакитні або безбарвні майже круглі, дуже дрібні колонії. Оточені ніжним гемолізом - *СІ. histolyticum*, а іноді *СІ. tetani*.

Біохімічна активність мікроорганізмів дуже різноманітна і зумовлена наявністю у них специфічних ферментних систем, а також умовами навколишнього середовища. Ферменти відіграють велику роль у життєдіяльності мікробів. Вони беруть участь у різноманітних біохімічних реакціях, що лежать в основі живлення, дихання, росту і розмноження мікроорганізмів. В лабораторній мікробіологічній практиці вивчення біохімічних властивостей бактерій є одним з найважливіших диференціально-діагностичних засобів точного розпізнавання збудника інфекційної хвороби.

Цукролітичні властивості виявляють при посіві бактерій на диференціально-діагностичні середовища з різними вуглеводами і індикатором. Частіше застосовують середовище Гісса (з індикатором Андреде). Набір середовищ з різними вуглеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, цукроза, манніт, дульцит, і ін.), стерильне знежирене просте молоко, молоко з лакмусом, молоко з метиленовим синім — називають *строкатим рядом*. Посіви культур здійснюють за звичайною методикою бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Після інкубування в термостаті враховують результат ферментації вуглеводів: зміна кольору живильного середовища (в червоний колір з індикатором Андреде) означає розщеплення вуглеводу і утворення в середовищі кислих продуктів розпаду. Якщо при розщепленні даного вуглеводу утворюється не тільки кислота, але й газоподібні речовини, останні виштовхують частину рідини з поплавця, і міхурці газу збираються у його верхній частині. Для визначення цукролітичних властивостей часто застосовують напівщільні середовища з вуглеводами і індикатором ВР (суміш водного блакитного з розоловою кислотою), а також щільні середовища з вуглеводами і індикатором (агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева).

Для виявлення протеолітичної спроможності мікроорганізмів культуру, що досліджується засівають в МПЖ, просте молоко. Посів мікробів в МПЖ стовпчиком проводять уколом, зануривши голку (або петлю) з культурою, що досліджується, вглиб живильного середовища до дна пробірки. В тих пробірках, де під дією ферментів бактерій відбудеться протеоліз желатини, середовище розріджується. Мікроби різноманітних видів розріджують МПЖ неоднаково. Одні з них у

вигляді лійки (збудник сибірки), інші – у вигляді «панчохи» (стафілококи) . Буває розрідження пошарове (синьогнійна паличка та ін.).

Спроможність мікроорганізмів гідролізувати казеїн визначають на молочному агарі Ейкмана. Посів здійснюють петлею і шпателем по всій поверхні середовища, щоб одержати ізольовані колонії. Витримують в термостаті 24-48 год. Протеоліз виявляється пептонізацією казеїну – навколо колоній утворюється чітка зона просвітлення молочного агару. При посіві в молоко протеоліз виявляється просвітленням стовпчика молока, появою пухкого або ослизлого відстою на дні пробірки.

Ступінь протеолізу і глибину розщеплення білка у різних видів бактерій визначають шляхом утворення кінцевих продуктів розпаду (індол, сірководень, аміак та ін.)

Індол встановлюють різноманітними способами. Найбільш доступним і зручним вважається спосіб з використанням індикатора, що виготовлений за рецептом:

- фільтрувальний папір просочують гарячим насиченим водним 12%-вим розчином щавлевої кислоти, висушують на повітрі, розрізають на смужки (10*0,5 см) і зберігають в скляній банці з притертою кришкою. Щоб виявити утворення індолу, культуру, що досліджується засівають у пробірку з МПБ або бульйоном Хоттінгера, куди вставляють індикаторний папір, притискаючи його кінець ватним корком (нижній край паперу не повинен торкатися живильного середовища). Витримують в термостаті при 37°C 1-3 доби. За наявності індолоутворення нижня частина індикаторного паперу фарбується в рожевий колір.

Визначення сірководню проводять на щільному середовищі МПА, яке містить сірчаноокисле залізо, гіпосульфід натрію, глюкозу, індикатор фенолрот водний. Посів роблять на скошений агар, а після цього уколом в нижню частину стовпчика середовища. За наявності сірководню під впливом бактеріальної культури стовпчик середовища рожевіє, нижня частина фарбується в чорний колір.

Інший спосіб визначення сірководню в рідкому середовищі заснований на почорнінні фільтрувального паперу з 10%-вим розчином оцтовокислого свинцю (утворюється сірчистий свинець чорного кольору).

Визначення аміаку. В пробірці з засіяною бактеріальною культурою закріплюють між стінкою пробірки і пробкою рожевий

лакмусовий папір, що в присутності аміаку синіє. Аміак в середовищі можна також виявити з допомогою реактива Несслера. Для цього у фарфорову чашку піпеткою вносять краплю культури амоніфікаторів, вирощених на МПБ, і стільки ж реактива Несслера.

При наявності аміака суміш забарвлюється в жовтий або коричневий колір, в залежності від його кількості. Коричнєве забарвлення вказує на великий вміст продукту гнилісного розкладу.

Редукуючі властивості мікробів визначають на підставі зміни кольору органічної фарби (метиленової синьки, малахітової зелені, нейтрального червоного та ін.), що внесені в живильні середовища (часто в молоко). Петлю культури, що досліджується, висівають в середовище з фарбою, інкубують в термостаті 24 год. Під впливом мікробних ферментів барвник відновлюється, відбувається його знебарвлення або зміна вихідного кольору.

Визначення каталази можна здійснювати різними способами.

1. На поверхню добової агарової культури рівномірно тонким шаром наливають 1 мл 1%-ного розчину перекису водню. За наявності каталази відзначають виділення міхурців кисню.

2. На предметне скло наносять краплю 3-10%-вого розчину перекису водню та вносять в нього петлю з бактеріальною агаровою культурою. Виділення міхурців газу(кисню) свідчить про наявність у мікробів каталази.

Визначення гемолітичних властивостей. Бактерії деяких видів в процесі життєдіяльності продукують особливі речовини, які володіють лізуючою дією на еритроцити – гемотоксини (білкової природи), що руйнують оболонку еритроцитів. Для визначення гемолітичної активності бактеріальні культури висівають на живильні середовища, що містять 5% дефібринованої крові (частіше кров'яний МПА). При зростанні мікроорганізмів, що володіють гемолітичними властивостями, навколо колонії в результаті лізису еритроцитів утворюється прозора зона (безбарвна або пофарбована). В рідких середовищах при гемолізі середовище стає прозорим (червона лакова кров).

Контрольні питання

1. Характер росту мікроорганізмів на МПБ.
2. Характер росту мікроорганізмів на щільному живильному середовищі.
3. Методи визначення цукролітичних властивостей.

4. Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.
5. Методи визначення індолу, аміаку, сірководню.
6. Техніка визначення видів мікроорганізмів.

Заняття 9

Тема: Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу

Мета заняття: ознайомити студентів з методами зараження лабораторних тварин, правилами відбору і пересилки патматеріалу для бактеріологічного дослідження. Вивчити схему дослідження патологічного матеріалу.

Матеріальне забезпечення: білі миші, морські свинки, кролі для демонстрації різних методів зараження.

Стерильні шприци і голки, фізіологічний розчин, 5% спиртовий розчин йоду, ватні тампони, 70% спирт, металеві шпателі, спиртівки, ножиці. Патматеріал (шматочки тканин). Труп білої мишки, парафінований папір, банки з кришкою, 5% розчин фенолу, 30% розчин гліцерину, 10% розчин хлорного вапна, МПБ, МПА, набір для фарбування за Грамом.

Зміст заняття. Студенти знайомляться з методами зараження лабораторних тварин з метою визначення патогенності мікроорганізмів та виділення чистих культур.

Самостійно фіксують лабораторних тварин і заражають підшкірним, внутрішкірним, внутрім'язовим інтраперитоніальним, оральним, інтраназальним методами. Далі розтинають труп білої миші. Беруть патматеріал, консервують, пакують і пишуть супровідну в ветлабораторію. Знайомляться з порядком проведення бактеріологічного дослідження патматеріалу і постановкою діагнозу. Роблять мазки-відбитки з паренхіматозних органів, посіви на МПА. Фарбують мазки за Грамом.

При дослідженні того або іншого матеріалу, щоб виділити чисту культуру патогенного мікроба, або виявити його вірулентність проводять зараження лабораторних тварин. Застосовують такі способи зараження:

- 1) через шлунково-кишковий тракт – культура мікробів дається з

кормом;

2) підшкірно - матеріал, що досліджується, шприцом вводиться безпосередньо під шкіру (морським свинкам в ділянці черева, або стегна, мишам - ближче до основи хвоста, кролям - в ділянці черева);

3) внутрішньошкірно - безпосередньо в шкіру (0,1-0,2 мл);

4) внутрішньом'язево - в товщу м'язів (в області стегна);

5) в черевну порожнину - при цьому тварину тримають головою донизу, для того, щоб не травмувати кишечник;

6) інтравенозно - шляхом ін'єкції в вену, кролям - в зовнішню вушну краєву, мишам - хвостову;

7) субдурально - під тверду мозкову оболонку;

8) скарифікація - скальпелем роблять насічки на шкірі і в них втирають дослідний матеріал, або бактеріологічну культуру.

Місце введення в організм дослідного матеріалу необхідно обробити: вистригти шерсть, протерти шкіру спиртом, змастити йодом. При зараженні тварин необхідно забезпечити їх фіксацію.

Бактеріологічне дослідження необхідно проводити одразу ж після загибелі тварини. Тіло тварини фіксують у спинному положенні в кюветі з парафіном. Місце розрізу дезінфікують 5% розчином фенолу. Розтинають шкіру по білій лінії живота, далі шкіру відпрепаровують від м'язів, роблять поперечні надрізи і шкіряні клапті відводять в сторону. Розтинають грудну порожнину. Враховують патологічну картину, записують дані до журналу експертизи. Поверхню серця, легенів, лімфатичних вузлів запікають нагрітим скальпелем, пастерівською петлею пропалюють в цьому місці орган, беруть невелику кількість крові і висівають її на живильні середовища. Далі розтинають черевну порожнину. Пінцетом відтягують доверху черевну стінку і ножицями розрізають її від діафрагми до анального отвору. Оглядають органи черевної порожнини, беручи до уваги розміри, колір та консистенцію паренхіматозних органів, стан кишечника, наявність ексудату в черевній порожнині та його характер. Опісля припікання поверхні роблять посіви з печінки, селезінки, лімфатичних вузлів та при необхідності - із вмісту кишечника. Паралельно з тканин та органів роблять мазки-відбитки.

Усю роботу з трупами тварин проводять, дотримуючись заходів безпеки, які попереджують розповсюдження збудника інфекції. Після закінчення дослідження трупа кювети і робочий стіл дезінфікують.

Інструменти стерилізують. Труп тварин і окремі органи знезаражують автоклавуванням.

Патологічний матеріал, який отримали після розтину трупа зараженої лабораторної тварини, або надісланої до лабораторії досліджують в такій послідовності:

1. Виготовляють мазок, фарбують простим методом, або за Грамом з метою виявлення мікробів (мазки зберігають як документ).

2. Проводять посів на щільні живильні середовища і ставлять в термостат.

3. Вивчають колонії (через добу).

4. Відсівають колонії на щільні середовища і ставлять в термостат.

5. Виготовляють з колоній мазки, фарбують за Грамом і проглядають під мікроскопом.

6. Вивчають характер росту мікробів на живильних середовищах (розмір, форму, колір колоній і зміни в живильних середовищах).

7. Виготовляють, фарбують і продивляють мазки з культури із якого-небудь живильного середовища.

8. Досліджують мікроби на рухливість і спороутворення.

9. Відбирають і заражають тварин відповідно з передбачуваними в матеріалі мікробами.

10. Вивчають і співвідносять усі одержані дані та на підставі усіх ознак визначають вид мікроба.

Контрольні питання

1. Яких тварин використовують для біопроби?
2. Методи фіксації лабораторних тварин.
3. Методи зараження лабораторних тварин.
4. Порядок розтину і бактеріологічне дослідження трупів.

Заняття 10

Тема: Визначення активності антибіотиків і антибіотикорезистентності мікроорганізмів

Мета заняття: навчити студентів визначати активність антибіотиків і антибіотикорезистентність мікроорганізмів.

Матеріальне забезпечення: банка з дезрозчином. Серія послідовних розведень пеніциліну в пробірках на фізіологічному

розчині (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Дві чашки Петрі з МПА, бульйонна культура золотистого стафілококу, стерильні паперові диски, культура мікроорганізмів, виділена з патматеріалу. Стерильні пробірки, стерильний фізрозчин у пробірках. Паперові диски, просочені різними антибіотиками, очні піпетки, пінцет, спиртівка.

Зміст заняття: студенти готують ряд розведень антибіотику, що досліджується (1:10, 1:100, 1:1000, т.д.). В чашки Петрі з стерильним МПА вносять культуру тест-мікроба і рівномірно розподіляють по всій поверхні, надлишок зливають в банку з фізрозчином. Чашку залишають на 30 хвилин при кімнатній температурі. Далі паперові диски просочують відповідними розведеннями антибіотика і розташовують на МПА на однаковій відстані одне від одного. У центрі чашки Петрі розміщують паперові диски просочені різними антибіотиками: пеніциліном, стрептоміцином, байтрілом та іншими. Антибіотик, яким просочений диск, дифундує в агар і чим більша його активність, тим більша зона відсутності росту тест-мікроба.

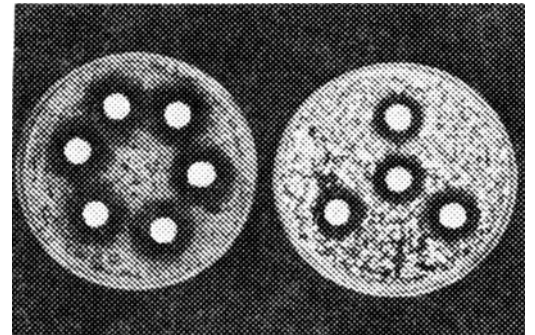


Рис.8 Визначення активності антибіотиків методом дифузії в агар з допомогою паперових дисків.

Антибіотикорезистентність збудників хвороб перевіряють по відношенню до декількох антибіотиків.

Агарову культуру збудника хвороби, що досліджується змивають фізіологічним розчином і готують одномільярдну суспензію. 1 мл суспензії засівають суцільним шаром в чашку з МПА, надлишок рідини відсмоктують піпеткою. Засіяні чашки підсушують в термостаті при 37°C 15-30 хвилин. Диски просочені антибіотиками стерильним пінцетом розкладають на відстані 2 см від краю (рис. 8). У одній чашці одночасно розміщують 4-5 різних антибіотиків. Чашки з дисками витримують при кімнатній температурі 2-3 години і далі - у термостаті 14-15 годин при температурі 37°C. За величиною затримки росту збудника судять про його чутливість до відповідного антибіотика. Мікроорганізм вважається чутливим до антибіотика, якщо зона затримки росту дорівнює 15-25 мм, малочутливим - до 15 мм, резистентним при відсутності зони затримки росту.

Контрольні питання

1. Походження антибіотиків. Мікробний антагонізм.
2. Одиниці дії антибіотиків.
3. Методи визначення активності антибіотиків.
4. Визначення резистентності мікробів до антибіотиків .

Заняття 11

Тема: Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту

Мета заняття: ознайомитися з правилами відбору ґрунту та води для бактеріологічного дослідження, вивчити методи бактеріологічного дослідження води, повітря та ґрунту.

Матеріальне забезпечення.

Для дослідження води: батометр, водопровідна вода у колбі, стерильні пробірки, стерильні градуйовані піпетки, стерильні чашки Петрі, МПА, агар Ендо, таблиці.

Для дослідження ґрунту: наважка ґрунту 10 грам, стерильна вода у колбі, марлева салфетка, стерильні колби для приготування суспензії, мірні циліндри, піпетки на 1 мл, чашки Петрі, пробірки з середовищем Кеслера, МПА, агар Ендо, Левіна.

Для дослідження повітря: чашки Петрі з МПА.

Санітарно-бактеріологічне дослідження води. З відкритих водосховищ проби води відбирають з глибини 10-15 см від поверхні і на відстані 10 — 15 см від дна. Із водопроводу воду беруть в стерильні флакони з притертим корком ємністю 0.5 л, а з глибини водосховища – прив'язаним до жердини батометром або скляною посудиною з притертим корком, до якого прикріплений шнур. Водопровідну воду наливають після попереднього пропалювання крана і витікання перших порцій води з нього протягом 10-15 хв. Воду з колодязя необхідно брати до початку користування ним або через 10-12 год. після припинення користування. Проміжок часу з моменту взяття проби до бактеріологічного дослідження не повинен перевищувати 2 год. (при температурі 1-5°C можна зберігати до 6 год.).

Визначення загальної кількості бактерій у воді. Загальна кількість бактерій у воді показує кількість бактерій у 1 мл води. Воду перед

посівом розводять стерильною водопровідною водою 1:10, 1:100 і далі в залежності від забруднення. З кожної проби беруть для посіву не менше двох різних розведень. Воду з артезіанських свердловин та водопроводів можна засівати не розводячи, в кількості 0,5-1 мл. Воду що досліджують добре перемішують і проводять посів у чашки Петрі: 1 мл води градуйованою піпеткою переносять в стерильну чашку, злегка піднявши її кришку. Після цього в чашку наливають 10-12 мл розплавленого та охолодженого до 45°C МПА, чашку закривають і коловими рухами ретельно перемішують МПА з водою.

Чашки ставлять в термостат на добу. По кількості колоній, що вирости судять про кількість мікробів у воді. Загальна кількість бактерій в 1 мл водопровідної води не повинна перевищувати 100 (від 100 до 1000 колоній - вода сумнівна, від 1000 і більше - не придатною до споживання), а відкритих водосховищ – не більш 1000.

Визначення колі-титру води. Наявність у воді кишкової палички є наслідком фекального забруднення і вказує на можливість обсіменіння води патогенними мікроорганізмами. Ступінь забрудненості води кишковою паличкою характеризують колі-титром, що є найменшою кількістю води, в якій виявляють кишкову паличку, або колі-індексом (кількістю кишкової палички, що міститься в 1000 мл води). Для визначення колі-титру використовують бродильну пробу і засіб мембранних фільтрів.

Суть бродильної проби полягає в тому, що воду, яка досліджується в певній кількості висівають на середовище накопичення, після цього за наявності зростання, характерного для кишкової палички, пересівають на диференціально-діагностичні середовища. Беруть три обсяги водопровідної води по 100 мл, три – по 10 мл і три – по 1 мл. Воду в цій кількості висівають в колби і пробірки з глюкозо-пептонним або лактозо-пептонним середовищем з індикатором і "поплавком". Усі посіви ставлять в термостат на 24 год. За відсутності зростання мікробів, утворення кислоти і газу – результат негативний (вода доброякісна). З пробірок, в яких є зростання бактерій (помутніння і зміна кольору середовища), проводять посів штрихом на поверхню середовища Ендо або Левіна і ставлять в термостат на 16-18 год. З колоній, характерних для бактерій групи кишкової палички, готують мазки, фарбують, мікроскопують. Культуру вивчають за оксидазним тестом – фільтрувальний папір змочують розчином нафтол-диетил-п-фенілендіаміна. Після цього 2-3 ізольовані колонії кожного типу з агару Ендо знімають петлею і переносять штрихом на змочений

реактивом папір. Відсутність зміни в забарвленні паперу (негативний результат оксидазної проби) а наявність грамнегативних паличок в препараті (мазку) свідчать про зростання кишкової палички.

Титр кишкової палички для водопровідної води допускається не менше 333 мл, для води відкритих водосховищ – орієнтовно не менше 111 мл.

Спосіб мембранних фільтрів частіше застосовують в лабораторній практиці. Полягає він у тому, що певний обсяг води пропускають під тиском через фільтри, виготовлені з нітроцелюлози, з наступним накладанням їх матовою стороною на поверхню агару Ендо. Їх витримують у термостаті 18-24 год. Після цього підраховують кількість колоній, визначають колі-титр і колі-індекс.

Санітарне-бактеріологічне дослідження повітря.

Повітря не є сприятливим середовищем для існування мікроорганізмів. Мікроби потрапляють у повітря з ґрунту, з поверхні рослин, з води. Кількість та склад мікрофлори у повітрі не постійні. Для санітарної оцінки повітря враховують кількість мікробів у 1 м^3 .

Визначення забрудненості повітря седиментаційним методом. Седиментаційний - спосіб Коха полягає у тому, що чашки Петрі з МПА залишають відкритими на 5-10 хв. в приміщенні. Для визначення цим способом санітарно-показових мікроорганізмів (гемолітичних, стафілококів, стрептококів) чашки Петрі з кров'яним агаром залишають відкритими протягом 40 хв. Після цього чашки закривають, ставлять у термостат на 24 год, підраховують колонії мікробів.

Щоб визначити мікробне число у повітрі (кількість бактерій, що містяться в 1 м^3), його підраховують за формулою Омелянського. Правилком Омелянського передбачається, що на поверхні агару у чашці Петрі з площею 100 см^2 за 5хв. з повітря осідає така кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря.

При санітарно-бактеріологічній оцінці повітря по наявності патогенних мікроорганізмів (мікобактерій туберкульозу, збудників пастерельозу, бруцельозу та ін.) використовують спеціальні (елективні) середовища. Після інкубації в термостаті проглядають колонії, що вирости, виділяють характерну для цього виду мікроба колонію і вивчають її; з неї готують мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують. Колонію пересівають для одержання чистої культури з наступною її ідентифікацією.

Санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту.

Медицино-ветеринарну службу цікавить виявлення патогенних мікроорганізмів, що потрапляють в ґрунт з трупами тварин, які загинули від інфекційних хвороб з виділеннями хворих тварин, з незараженими стічними водами. В таких випадках ґрунт може виявитися чинником інфікування (сибірка, правець, злоякісний набряк та ін.) людей та виникнення інфекційних хвороб.

Бактеріологічний аналіз ґрунту потрібний при виборі території під пасовище, господарські будівлі – гідростанції, дитячі, спортивні майданчики, сади, лікарні. Дослідження зводяться до визначення: мікробного числа (кількість бактерій, що містяться в 1 г ґрунту), колі-титру, перфрінгенс-титру, та в окремих випадках проби ґрунту досліджують на наявність певних патогенних мікробів.

Відбір проб ґрунту. На території що обстежується площею до 1000 м², виділяють дві ділянки по 25 м² (одну – поблизу джерела забруднення, іншу у віддаленні від нього) . На кожній з двох ділянок (з дотриманням стерильності) беруть проби з 5 місць (4 – по кутах ділянки, одну — по центру на глибині 10-20 см стерильним совком. Відбирають по 200-300 г ґрунту в стерильні банки з ватними корками (можна усі проби з однієї ділянки перемішати і на дослідження направити 1 кг). На банки наклеюють етикетки, відправляють з супровідним листом. Проби ґрунту потрібно досліджувати одразу ж або протягом 6-18 год., зберігаючи їх при температурі не вище 1-5°C. В лабораторії пробу ґрунту подрібнюють, відокремлюють від каменів, коренів рослин, просівають через сито, ретельно перемішують і відважують 30 г.

В колбу ємністю 500 мл наливають 270 мл стерильної водопровідної води і вносять в неї відважену пробу ґрунту, усе інтенсивно струшують 10 хв. і, не даючи відстоятися часткам суспензії, готують серію десятиразових послідовних розведень. Для відносно чистих ґрунтів достатньо 4 міри розведення, для забруднених – 6-9 розведень. З цією метою в штатив ставлять пробірки з 9 мл стерильної води, нумерують. В першу вносять 1 мл суспензії проби ґрунту, змішують, після цього 1 мл з першої пробірки переносять в другу, змішують, з неї 1мл – в третю і т. і. У результаті в пробірці №1 одержують розведення ґрунту 1: 100, № 2 – 1: 1000 і т. і. Підготовлені таким чином проби ґрунту досліджують.

Визначення загального мікробного числа. З останніх 3-4 пробірок з розведеною суспензією окремими стерильними піпетками вносять по 1 мл в стерильні чашки Петрі (кожне розведення окремо). В кожену чашку додають ще по 15-20 мл розплавленого (і охолодженого) до 45°C МПА. Рівномірними обережними обертливими рухами вміст чашок перемішують, залишають на столі для ущільнення агару. Далі чашки перевертають і ставлять у термостат на 24 години. Підраховують колонії що вирости в кожній чашці, множать на ступінь розведення, отримані числа складають і обчислюють середньоарифметичне число, що складе кількість мікробів, які містяться в 1 г ґрунту.

Визначення колі-титру ґрунту. Різноманітні розведення суспензії проби ґрунту окремою стерильною піпеткою засівають у пробірки із середовищем Кеслера. Посіви витримують в термостаті при 43°C протягом 48 годин. Після цього пробірки з посівами продивляються. З тих пробірок, де є газоутворення, висівають штрихом на агар Ендо в чашки Петрі, культивують при 37°C 24 год. Червоні колонії, що вирости на агарі, типові для бактерій роду ешеріхія, досліджують: мазки фарбують за Грамом, мікроскопують. При наявності у мазках поліморфних коротких грамнегативних паличок червоні колонії знов пересівають у середовище Кеслера для підтвердження газоутворення в чистій культурі *E. coli*. Найбільше розведення ґрунтової суспензії, в якій відзначена ферментація лактози (з газоутворенням), відповідає колі-титру ґрунту,

Визначення перфрінгенс - титру в ґрунті. Різноманітні розведення проби ґрунту засівають в пробірки з розплавленим та охолодженим середовищем Вільсона-Блера, інкубують в термостаті 24 – 48 год. при 43°C. *S. perfringens* росте в глибині середовища, утворюючи чорні колонії, внаслідок відновлення сульфату натрію до сульфіту натрію, що реагує з хлористим залізом, і утворює сірчисте залізо (чорного кольору). Гази, що накопичуються в середовищі в результаті ферментації глюкози, розривають агар, де розміщені колонії *S. perfringens*. Найбільше розведення ґрунту або найменша її кількість, яка викликала почорніння і розривання щільного середовища Вільсона-Блера в перші 12 год. зростання, відповідає (або прийнято вважати) її перфрінгенс-титру.

Виявлення інших патогенних видів мікробів здійснюють посівом суспензії проби ґрунту на спеціальні елективні живильні середовища з

наступною ідентифікацією виділених чистих культур збудників хвороб, включаючи біопробу і інші засоби.

Показники санітарно-бактеріологічної оцінки ґрунту

Оцінка ґрунту	Загальне число бактерій в 1г ґрунту	Колі-титр	Перфрінгенс-титр
Чиста	10000	Вище 1	Вище 0,1
Слабо забруднена	Не більше 10000	1-0,01	0,01-0,001
Помірно забруднена	100000-900000	0,01-0,001	0,001-0,0001
Сильно забруднена	1000000 і вище	Нижче 0,001	Нижче 0,0001

Контрольні питання

1. Як визначити загальну кількість мікробів у 1 грамі ґрунту?
2. Порядок визначення колі-титру ґрунту.
3. Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря.
4. Відбір проб води для бактеріологічного дослідження.
5. Визначення загальної кількості мікробів у воді.
6. Живильні середовища для визначення мікробного числа та колі-тиру води, ґрунту.
7. Визначення загальної кількості бактерій у молоці .

Заняття 12

Тема: Імунітет, серологічні реакції

Мета заняття: Розібрати сутність і продемонструвати постановку реакції аглютинації (РА), реакції зв'язування комплементу (РЗК), роза-бенгал проби (РБП) і реакції преципітації (РП). Ознайомитися з виготовленням вакцин і імунологічних сироваток.

Матеріальне забезпечення. У штативі: пробірочний метод реакції аглютинації сироваток у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400; сироватки: бруцельозна на + + + + , + + + , ++ і — (негативна). Для крапельної реакції аглютинації: предметні скельця, випробувана (розведена 1:10) сироватка (позитивна), антиген бруцельозний, ізотонічний розчин натрію хлориду, піпетки, скляні палички для

змішування.

Для реакції преципітації: сибірковий антиген, сибіркова преципітуюча сироватка (профільтрована), екстракт зі шкіри. Лійка з азбестовою ватою, поставлена у флакон (колбочку) з невеликою кількістю фільтрату. Шматочки шкіри, що направляється для дослідження. Штатив, пробірки Уленгута, пастеровські піпетки. Компоненти й устаткування для демонстрації РБП. Вакцини, сироватки.

Реакція аглютинації (РА). Реакцію ставлять з метою виявлення в досліджуваній сироватці специфічних антитіл (аглютинінів) по відомому антигену чи визначення мікробів по відомій аглютинуючій сироватці. Реакція аглютинації має специфічний характер і проходить у двох фазах. Спочатку відбувається взаємодія антитіл з антигенами, їх детермінантами, розташованими на поверхні мікробних клітин. Притягання антигену й антитіла обумовлено електростатичними (вони володіють протилежними електричними зарядами) і міжмолекулярними силами. Це специфічна і невидима фаза. Друга фаза протікає в присутності електроліту (ізотонічного розчину натрію хлориду), відбувається адгезія (склеювання) і осідання на дно пробірки імунних комплексів (антиген – антитіло), що видно неозброєним оком. Утворені комплекси можуть дисоціювати. При цьому обидва компоненти зберігають свої вихідні властивості.

Мікроби (антиген) вирощують на щільному живильному середовищі (агарі), змивають ізотонічним розчином натрію хлориду, а потім розводять до визначеної концентрації (кількість клітин у 1 мл середовища). Антитіла (аглютиніни) утворюються в організмі і містяться в сироватці крові хворих чи перехворілих тварин. Аглютинація — специфічна реакція, що протікає в ізотонічному розчині натрію хлориду. У неелектролітних розчинах цукру й у дистильованій воді адгезія антигену й антитіла не відбувається. Взаємодія між мікробами (збудниками) і антитілами використовується для діагностики багатьох інфекційних хвороб.

Для постановки реакції аглютинації необхідно мати: сироватку крові досліджуваної тварини, антиген, ізотонічний розчин натрію хлориду, штативи для пробірок, градуйовані піпетки з різними поділками, склянки, ванночки, колби, негативну (нормальну) і позитивну сироватки. Сироватки, що використовуються повинні бути свіжими чи консервованими борною кислотою в порошок, по 0,5–0,7 г на одну пробірку.

Найбільш широке застосування реакція аглютинації одержала при

діагностиці бруцельозу. Її ставлять на ізотонічному розчині натрію хлориду в чотирьох розведеннях: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (для овець, кіз, свиней і собак); у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 (для великої рогатої худоби, коней і верблюдів) у кількості 1 мл кожного розведення. Як контроль використовують негативну (нормальну) сироватку в тих же розведеннях, що і досліджувану; позитивну сироватку до граничного титру й антиген у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

Техніка розливу сироваток. На кожну сироватку беруть чотири пробірки. У першу вносять 2,4 мл, а в наступні по 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. До ізотонічного розчину в першій пробірці додають 0,1 мл досліджуваної сироватки, ретельно перемішують, виходить основне розведення 1:25. З основного розведення 1 мл переносять у другу пробірку і перемішують, із другої – у третю, із третьої – у четверту. Після перемішування з четвертої пробірки видаляють піпеткою 1 мл розведення, з першої – 0,5 мл. У результаті в кожній пробірці залишається по 1 мл розведеної сироватки, тобто той об'єм, у якому йде реакція аглютинації. Після розливу сироваток в усі пробірки додають по 0,05 мл антигену.

Сироватку можна розливати і мікропіпеткою в дозах 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 мл, що відповідає розведенням 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Фабричний антиген (10 млрд. мікробних клітин у 1 мл) розводять у 20 разів до 500 млн мікробних клітин у 1 мл і додають у кожну пробірку по 1 мл. Кожну сироватку розливають окремою піпеткою ретельно промивають її до 6 разів у двох-трьох склянках з ізотонічним розчином натрію хлориду. Для прискорення постановки реакції аглютинації застосовують апаратуру Флоринського, що дає можливість розливати кожен компонент одночасно в десять пробірок.

Пробірки струшують, ставлять у термостат на 4 год., потім витримують при кімнатній температурі до 18 год., після чого реакцію читають. Спочатку переглядають пробірки з контрольними сироватками, а потім з досліджуваною. Для більш об'єктивної оцінки реакції аглютинації одночасно готують стандарт мутності з антигену.

При позитивній реакції аглютинації на дно пробірки випадає осад зі склеєного комплексу антиген – антитіло, утворюючи “парасольку”, а рідина (розчин) просвітлюється, тобто стає прозорою. При струшуванні осад розбивається на пластівці чи крупинки. При негативній реакції аглютинації рідина залишається мутною, у центрі дна пробірки мікроби (антиген) осідають у вигляді крапки.

+ + + + Повне просвітління рідини при наявності різко вираженої “парасольки”, при струшуванні розбивається на пластівці, грудочки.

+ + + Те ж, але рідина злегка опалесцирує.

+ + Слабке просвітління рідини, “парасолька” розбивається при струшуванні на пластівці, грудочки, крупинки.

+ Просвітління відсутнє, “парасолька” виражена слабо.

- Каламуть, “парасолька” відсутня.

Позитивною сироватка вважається при наявності мікроскопічної аглютинації (+ +) у розведенні 1:50 для свиней, овець, кіз, собак і 1:100 для великої рогатої худоби, коней і верблюдів.

Пластинчаста (краплинна) реакція аглютинації. Мікропіпеткою на чисте рівне скло наносять 0,04; 0,02; 0,01 мл одержаної сироватки. До кожної дози сироватки додають по одній краплі антигену, який у кожній пробі, починаючи з 0,01 мл, змішують із сироваткою чистою скляною паличкою. Перше розведення відповідає 1:50, друге—1:100, третє – 1:200. Якщо сироватка містить специфічні аглютиніни, то через кілька хвилин після змішування її з антигеном у краплі з'являються крупинки або пластівці, а рідина стає прозорою. Якщо в сироватці аглютинінів немає, то крапля залишається рівномірно мутною.

Прискорена реакція аглютинації. Прискорену реакцію аглютинації ставлять шляхом нанесення на один кінець предметного скла розбавленої досліджуваної сироватки, на іншій — краплі ізотонічного розчину натрію хлориду (контроль). Потім до обох крапель піпеткою додають таку ж кількість суспензії мікробів і розмішують до одержання однорідної суміші. При наявності у досліджуваній сироватці специфічних антитіл відбувається адгезія мікробів. У контролі рівномірна каламуть, аглютинації немає; у досліді – склеювання мікробів і антитіл, утворення крупинок і пластівців.

Реакція зв'язування комплементу (РЗК). За своєю чутливістю реакція зв'язування комплементу (РЗК) займає перше місце, що дозволяє виявити більшу кількість реагуючих. Сутність реакції полягає в тому, що комплемент, будучи доданий до специфічного комплексу (антиген–антитіло), зв'язується останнім. Це можна установити після додавання гемолітичної системи (гемолітична сироватка + еритроцити барана). Якщо комплекс зв'язаний у бактеріальній системі, то гемоліз еритроцитів не відбудеться – реакція позитивна. При наявності вільного комплементу, а це буває в тому випадку, якщо в досліджуваній сироватці немає специфічних антитіл, він переходить у гемолітичну систему і викликає гемоліз еритроцитів – реакція негативна. Для

постановки реакції необхідні найменші кількості кожного з компонентів, що визначають титруванням. При цьому треба мати: досліджувану сироватку (інактивовану), антиген (сапний, бруцельозний і т.д.), комплемент – свіжа чи консервована сироватка морської свинки, гемолітичну сироватку (сироватка кролика, імунізованого еритроцитами барана), еритроцити барана, ізотонічний розчин натрію хлориду (середовище, у якому йде реакція). Антиген і гемолітичну сироватку готують біофабрики, інші компоненти одержують у лабораторії.

У ветеринарній практиці РЗК ставлять при діагностиці сапу, бруцельозу, лістеріозу і ін. Реакція йде в двох системах: бактеріальній і гемолітичній. Бактеріальна система містить у собі розведені: досліджувану сироватку, антиген і комплемент, по 0,5 мл кожного компонента. Досліджувана сироватка попередньо інактивується у водяній бані при температурі 58–60° С. При з'єднанні всіх компонентів пробірки ставлять у водяну баню на 20 хв при температурі 37–38°С. Потім вносять гемолітичну систему (гемолітичну сироватку в робочому титрі і 2,5%-ну суспензію еритроцитів барана, по 0,5 мл кожного компонента) і знову витримують у водяній бані при 37–38°С протягом 20 хв. Загальний об'єм компонентів, що беруть участь у реакції, становить 2,5 мл. При масових дослідженнях об'єм компонентів зменшують наполовину.

Облік реакції проводять двічі: після закінчення досліду і після 14-годинної витримки при кімнатній температурі.

Позитивна реакція характеризується повним просвітлінням середовища, еритроцити осідають на дно.

Сумнівна – середовище злегка забарвлене, відбулося часткове руйнування еритроцитів.

Негативна – середовище інтенсивно забарвлене в червоний колір – повний гемоліз еритроцитів.

Поряд із РЗК ставлять РТЗК – реакцію тривалого зв'язування комплементу, що відбувається на холоді.

Роз бенгал проба (РБП) – пластинчаста реакція аглютинації з роз бенгал антигеном (бруцельозним антигеном, який забарвлений бенгальським рожевим). РБП застосовують при дослідженні сироватки крові для діагностики бруцельозу у великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, верблюдів і північних оленів.

Для постановки реакції необхідні: роз бенгал антиген (бруцельозний); позитивна аглютинуюча і негативна сироватки великої

рогатої худоби; 0,5%-ний фенолізований ізотонічний розчин натрію хлориду. Сироватки крові повинні бути прозорі, без домішки еритроцитів, і досліджуються не пізніше ніж через 4 дні зберігання при температурі 4–8°C. Сироватки, консервовані сухою борною кислотою (2% борної кислоти до об'єму сироватки), придатні для дослідження протягом 14 днів.

Техніка постановки РБП. Досліджувані сироватки крові в дозі 0,03 мл за допомогою шприца–напівавтомата або піпетки-крапельниці вносять на дно виймки чистих сухих металевих емальованих пластинок. Шприц або піпетку після внесення сироватки тричі промивають фенолізованим ізотонічним розчином натрію хлориду і висушують. Поруч із сироваткою за допомогою піпетки-крапельниці вносять 0,03 мл (дві краплі) антигену (при дослідженні сироваток великої рогатої худоби, коней, верблюдів і свиней) і 0,015 мл (одну краплю) при дослідженні сироваток крові овець, кіз і північних оленів. Потім краплю ретельно змішують і погойдують протягом 4 хв. Якщо в розчині з'являються пластівці рожевого кольору, то реакція вважається позитивною. При наявності гомогенної рівномірно пофарбованої суміші, відсутності аглютинації реакція вважається негативною. Сироватки, визначені в РБП як позитивні, потім досліджують у РА і РЗК (РТЗК), за допомогою яких установлюють титр аглютининів і наявність комплементзв'язуючих антитіл.

Остаточний результат визначають з обліком даних усіх реакцій.

Сироватка вважається позитивною при такій оцінці реакцій: РБП + , РА + + + , РЗК+ + ; сумнівною – при РБП + , РА – , РЗК – . Сумнівну сироватку через 15–30 днів досліджують повторно. Якщо вона дає таку ж реакцію, то її вважають позитивною. Негативна РБП вважається кінцевим результатом, подальше дослідження сироватки крові в РА і РЗК не проводиться.

Реакція преципітації. При реакції преципітації, як і інших імунологічних реакціях, відбувається специфічне з'єднання антигену й антитіла. На місці з'єднання преципітуючої сироватки й екстракту (антигену) з'являється преципітат (сіро-біле кільце). Перевага цієї реакції в тому, що з її допомогою можна досліджувати матеріал, що розклався, шкіряно-хутрянну сировину. Реакцію преципітації ставлять при дослідженні шкіряно-хутряної сировини на сибірку. Антигеном тут буде соматичний полісахарид (гаптен), що міститься в стінці бацили антракса. Він термостабільний. Перед постановкою реакції сировину стерилізують у паровому стерилізаторі, щоб забезпечити подальшу

роботу з ним.

Антиген готують у такий спосіб: беруть 1–2 г здрібненої шкіри, заливають 10 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, кип'ятять 30–40 хв (гарячий спосіб) чи витримують при кімнатній температурі 16–18 год. (холодний спосіб), після чого фільтрують через лійку із азбестовою ватою. Фільтрат повинний бути абсолютно прозорим. Преципітуючу сироватку готують на біологічних фабриках шляхом гіперімунізації коней вбитими і живими ослабленими бацилами сибірки. Перед постановкою реакції преципітації сироватку фільтрують.

Постановка реакції преципітації. У спеціальні, чисто вимиті, прозорі і сухі пробірки Уленгута наливають по 0,3 мл преципітуючої сироватки (сибіркової). Потім пастерівською піпеткою нашаровують екстракт у тій же кількості. Можна підшаровувати сироватку (питома вага сироватки вища, ніж в екстракта).

У лабораторіях при масових дослідженнях шкіряно-хутряної сировини на сибірку застосовують апаратуру Флоринського.

Реакція вважається позитивною, якщо на границі обох рідин з'являється преципітат – сіро-біле кільце. Прісно-суху, парну, морожену шкіряно-хутряну сировину читають через 15 хв, мокросолену – через годину. Перед початком роботи ставлять такі контролі: сибірковий антиген і преципітуюча сироватка – реакція позитивна; сибірковий антиген і нормальна сироватка – реакція негативна; ізотонічний розчин натрію хлориду і преципітуюча сироватка – реакція негативна.

Реакція преципітації в агаровому гелі. Реакція преципітації строго специфічна і дозволяє знайти в матеріалі незначні кількості антигену (до 10^{-6} білка). Дифузійну реакцію преципітації ставлять у чашках Петрі з агаром, у якому на однаковій відстані один від одного за допомогою порожньої металевої трубки, з'єднаної з вакуумом, вирізують кілька вижок округлої форми. У центральну вижку вносять сироватку, що містить антитіла, в інші – досліджувані антигени або один антиген у різних розведеннях. Внесені речовини в шарі агарового гелю дифундують назустріч один одному. На місці зустрічі антитіла й антигену утворюються зони преципітації (мутні смуги у вигляді дуг). Є різні модифікації цієї реакції.

У лабораторній практиці застосовують також імуноелектрофорез, імунофлюоресцентний і інші методи.

Вакцини. Вакцини застосовують із запобіжною метою, вводять здоровим тваринам, після чого в них через 10–14–20 днів виробляється

імунітет. Вакцини готують з ослаблених (атенуйованих) живих культур або оброблених формаліном, фенолом і іншими хімічними речовинами (інактивовані вакцини). Прикладом живих атенуйованих і інактивованих можуть служити такі вакцини.

Живі атенуйовані вакцини. Сибіркова вакцина СТІ – суспензія спор безкапсульного слабо вірулентного штаму збудника сибірки в 30%-ному розчині гліцерину або дистильованій воді.

Гідроокисалюмінієва вакцина ДНКІ проти сибірки. Суспензія живих слабовірулентних спор штаму Ш-15 у гідроокисі алюмінію. Такі вакцини з 1961р. випускаються в сухому вигляді (без гліцерину і гідроокисі алюмінію). Їх одержують методом ліофілізації (висушування із замороженого стану під вакуумом).

Суха вакцина проти бруцельозу зі штаму 19. Слабовірулентна культура живих бруцелл Вг. abortus у захисному сахарозно-желатиновому середовищі.

Депонована вакцина проти бешихи свиней. Культура бешихи свиней з матрикса Конєва, адсорбована на фосфатно-буферному розчині гідрату окису алюмінію й ін.

Інактивовані вакцини. *Концентрована гідроокисалюмінієва формолвакцина проти емфізематозного карбункула великої рогатої худоби.* Формалінізована бульйонна культура збудника емкару, осаджена гідратом окису алюмінію.

Імунні сироватки. Їх одержують при гіперімунізації тварин — введенні збудників в дозах, що збільшуються, проти якого хочуть виробити сироватку. Для цієї мети на біофабриках використовують тварин-продуцентів: коней, велику рогату худобу, свиней, овець і ін. У результаті гіперімунізації тварин (до трьох місяців) у них виробляються антитіла.

Сироватка здатна захистити тварину від захворювання або запобігти подальшому розвитку інфекції, якщо вона з'явилася. Сироваткою протягом декількох годин створюється пасивний імунітет, що триває 10–14 днів. Сироватки являють собою злегка опалесцюючі рідини жовтого кольору. При тривалому зберіганні на дно ємкості випадає осад, при струшуванні він розбивається в рівномірну каламуть. Відомі імунні сироватки проти багатьох хвороб: сибірки, бешихи свиней, сальмонельозу і колібактеріозу телят (бівалентна антитоксична сироватка), диплококової інфекції молодняку, а також проти правця (антитоксична) і ін.

Заняття 13

Тема: Дослідження мікрофлори кормів

Мета заняття. Ознайомитися з правилами взяття проб силосу для дослідження. Визначити мікрофлору силосу № 1 і № 2: приготування і мікроскопія мазків; ознайомлення з мікробіологічним дослідженням силосу (посіви й облік основних фізіологічних груп мікроорганізмів на різних середовищах). Оцінити якість силосу № 1 і 2 за А. Н. Міхіним.

Матеріальне забезпечення. Порцелянові ступки з товчачиками (стерильні). Предметні скельця. Барвник еритрозин. Пальники. Мікроскопи. Кедрова олія. Силос № 1 і 2 у чашках. Витяжки із силосів. Універсальний індикатор, піпетки. Порцелянові чашки для визначення рН. Стандарт (кольорова шкала для визначення рН). Терези і наважки до них. Чашки для зважування силосу. Пінцети, Апарат для збовтування (шутель-апарат). Дві банки з притертими корками. Банка з розведеним силосом 1:10 (40 г силосу+360 мл стерильної води). Шість колб зі стерильною водою по 90 мл у кожній. Піпетки для приготування розведень (на 10 мл). Штатив з живильними середовищами: МПА -5 пробірок, СА-4, САК (сусло-агар із крейдою) - 6, молоко - 6, сусло пивне - 6, лактоза - 5, картопляне середовище Рушмана – 5 пробірок. В другому штативі середовища з висіяними в них розведеннями силосу; ріст мікроорганізмів, що зустрічаються в силосі, на щільних середовищах у чашках Петрі з МПА, СА, САК.

Таблиці: схема визначення якості силосу за А. Н. Міхіним; динаміка мікробіологічних процесів при дозріванні силосу.

Мікрофлора кормів багато в чому обумовлена температурою, вологістю середовища і видовим складом рослин. Вона міняється під час заготівлі і наступного зберігання кормів. Після скошування порушуються захисні функції рослини, мікроби проникають в середину, використовують живильні речовини і руйнують тканини. У цей час особливо бурхливо розвивається гнильна мікрофлора, викликаючи псування кормів. Скошені рослини можна зберегти шляхом висушування чи силосування, коли недостатньо вільної води чи створюються такі умови, при яких припиняється діяльність амоніфікаторів. Поряд із заготівлею сіна і сінажу в кормовиробництві багатьох господарств одне з перших місць займає силосування.

У кормах можуть бути виявлені цвілеві гриби, гнильні, маслянокислі і інші мікроорганізми. Такі корми часто викликають

отруєння, розлад органів травлення і інших систем. В результаті дослідження можна виявити причину псування корму, усунути її і тим самим попередити захворювання тварин.

Визначення мікрофлори силосу. Взяття проб силосу. Проби силосу необхідно брати в три терміни: а) під час закладки силосу для визначення епіфітної мікрофлори; б) через 10–15 днів після закладки для визначення мікрофлори дозрілого силосу; в) при розкритті силосу.

У загальній масі силосу не у всіх її ділянках однаково проходять мікробіологічні процеси, тому у вежі беруть три проби силосу: першу і другу – на відстані одного метра від верху і низу, третю – між ними. У траншеях, у залежності від довжини, беруть дві чи три проби на глибині одного метра від поверхні. У круглих ямах пробу беруть у центрі після зняття верхнього шару, також на глибині одного метра. Проби силосу поміщають у стерильні банки з притертими корками.

Мікроскопічне дослідження силосу. У порцеляновій ступці (з невеликою кількістю стерильної дистильованої води) розтирають шматочок силосу. З розтертої маси на предметному склі товкачиком роблять мазок, потім його фіксують і фарбують еритрозином. Мазок розглядають під імерсійною системою і замальовують. У якісному силосі зустрічаються одиничні палички і коки, у поганому – виявляється велике число коків і паличок.

Мікробіологічне дослідження силосу. Проводять для виявлення різних фізіологічних груп мікроорганізмів; молочнокислих, маслянокислих, гнильних, газоутворюючих, дріжджів і плісені.

Перед посівом готують розведення. З цією метою на технічних вагах відважують 40 г силосної маси. Наважку з дотриманням правил стерильності переносять у стерильну банку з притертим корком, у яку налито 360 мл стерильної води. Щоб “відмити” мікроорганізми, що містяться на поверхні рослин, силос у банці збовтують протягом 10 хв на шутель-апараті чи руками. У банці виходить розведення 1:10. До цього часу повинні бути готові колби зі стерильною водою по 90 мл у кожній і зроблені написи: II, III, IV, V, VI, VII. Наступні розведення готують шляхом внесення 10 мл розведення 1:10 у другу колбу з 90 мл стерильної води, у результаті чого виходить розведення 1:100. З другої колби 10 мл розведення 1:100 переносять у третю колбу, виходить розведення 1:1000 і т.д. Вміст колби перед взяттям розведення силосу збовтують протягом 3 хв. Після приготування розведень готують посуд (чашки Петрі, пробірки), роблять написи.

Фізіологічні групи мікроорганізмів визначають на таких

живильних середовищах:

МПА – гнильну мікрофлору,

СА – плісені і дріжджі,

САК (із крейдою) – молочнокислі бактерії,

молоці – молочнокислі бактерії, лактози – газоутворюючі (кишко-ві) бактерії, картопляному середовищі Рушмана – маслянокислі бацили.

У приготовлений посуд і середовища, починаючи з останньої колби, вносять по 1 мл розведень: на МПА з I, II, III, IV, V розведеннями; на СА з I, II, III, IV; на САМ з II, III, IV, V, VI, VII; на молоко з II, III, IV, V, VI, VII; на сусло пивне з II, III, IV, V, VI, VII; на лактозу з I, II, III, IV, V; на картопляне середовище Рушмана з I, II, III, IV, V розведеннями.

Після охолодження живильних середовищ до 50–45°C (а САК і після ретельного збовтування) їх вносять у чашки. Легкими обертальними рухами чашок змішують розведення силосу із середовищем і залишають на рівній поверхні для остуження. Чашки, перевернені догори дном, витримують у термостаті при температурі 30–35°C протягом трьох діб. На четверту добу проводять облік фізіологічних груп мікроорганізмів. Чисельність різних фізіологічних груп мікроорганізмів на щільних живильних середовищах визначають шляхом підрахунку колоній, на рідких живильних середовищах шляхом виявлення росту мікробів з різних розведень, а на молоці – по згортанню його. Те із середовищ, у яке було внесено найбільше розведення, і буде визначати кількість молочнокислих мікроорганізмів у силосі. На щільних середовищах у чашках Петрі підрахунок ведуть із трьох розведень, у кожному з яких виросло не менше десяти колоній.

Оцінка якості силосу. Органолептична оцінка силосу. *Колір* повинний бути ближче до кольору рослин, з яких приготовлений силос. У доброякісного силосу можуть зустрічатися відтінки: жовтий, жовто-зелений, коричнево-зелений, світло-коричневий. У зіпсованого силосу переважає коричневий колір; звичайно він буває темно-коричневий, брудний.

Запах доброякісного силосу повинний бути приємним, що нагадує запах плодів, хлібного квасу, мочених яблук. При псуванні силосу з'являється запах оцту. Зіпсований силос має запах редьки, прогірклої олії, оселедця, що довго не зникає при розтиранні шматочка силосу між пальцями. При наявності в силосі масляної кислоти розтертий між пальцями силос має неприємний запах гною.

Смак доброякісного силосу слабокислий, приємний. У зіпсованого

силосу смак різко кислий з гіркуватим присмаком.

Консистенція в доброякісного силосу повинна бути такою, яку мали вихідні рослини. У зіпсованого силосу рослинна маса робиться ослизлою, масткою, листочки не відокремлюються один від одного.

Хімічна оцінка силосу. Приготування витяжки із силосу. У літрову банку (колбу) поміщають 100 г дрібно нарізаного силосу. У банку приблизно до 3/4 об'єму наливають дистильовану воду, ретельно збовтують і доливають до літра. Вміст протягом 4–5 год. періодично збовтують. Потім фільтрують і фільтрат використовують для різних цілей (наприклад, для визначення рН).

Визначення рН силосу. Для визначення рН силосу готують дві витяжки: одну з доброго силосу, іншу – із завідомо недоброякісного. Піпеткою в порцелянову чашечку вносять 1 мл витяжки і краплю універсального індикатора. При змішуванні рідин відбувається зміна забарвлення витяжки. Реакцію (рН силосу) визначають по стандартній шкалі, що нанесена на папері з захисним покриттям.

По А. Н. Міхіну, як індикатор використовують суміш бромтимолового синього і метилового червоного. У порцелянову чашку вносять 2 мл витяжки і 2–3 краплі суміші індикаторів. У залежності від величини рН витяжка набуває різне забарвлення, яке знаходять по таблиці.

Таблиця 1

Оцінка якості силосу в балах (по А. Н. Міхіну)

Забарвлення рідини (витяжки) після додавання індикатора	Величина рН	Бал
Визначення рН силосу		
Червоне	4,2 і нижче	5
Червоно-жовтогаряче	4,2—4,6	4
Жовтогаряче	4,6—5,1	3
Жовте	5,1 – 6,1	2
Жовто-зелене	6,1 – 6,4	1
Зелене	6,4 – 7,2	0
Зелено-синє	7,2 – 7,6	0
Запах		
Ароматно-фруктовий, слабокислий, хлібний		4
Слабоароматний, оцтовокислий, огуречний		3
Різко оцтовокислий, запах масляної кислоти		2–1
Затхлий, гнійний, сильний запах масляної кислоти		0
Колір силосу		
Зелений		3
Коричневий або жовто-зелений		2
Чорно-зелений		1
Чорний		0

Дані бальної оцінки при визначенні рН, запаху, кольору підсумовують, одержують загальний *бал*, за яким і визначають якість силосу, балів:

дуже добрий	11 – 12 .
добрий	9–10
середньої якості	7–8 .
поганий	4–6.

На практиці рН силосу визначають також колориметричним, електрометричним і іншими методами.

Силос, що має оцінку *3 бали* і нижче, вважається дуже поганим і до згодовування тваринам непридатний.

Дослідження силосу на присутність у ньому токсину ботулінуса. Силос часто забруднюється ґрунтом, у якому поряд з іншими мікроорганізмами можуть бути бацили ботулінуса (*Cl. botulinum*). Такі мікроби в силосній масі розподіляються нерівномірно, локально, тобто там, де є ґрунт. З підозрілих ділянок беруть 1–2 кг силосу і поміщають його в стерильні широкогорлі колби. Проби заливають подвійною кількістю стерильної води і залишають для екстрагування. Потім частину води і корму переносять у стерильну порцелянову ступку і розтирають. Витримують 1–2 год. і після цього фільтрують до одержання прозорої рідини.

Наявність токсину ботулінуса в силосі визначають на морських свинках чи білих мишах. Фільтрат поділяють на дві частини: одну з них нагрівають до 80–100°C для руйнування токсину, іншу залишають без зміни. Дослід ставлять на чотирьох свинках. Матеріал випоюють за допомогою шприца з канюлею або шприца без голки. Двом тваринам дають по 2 мл прогрітого фільтрату, іншим – таку ж кількість фільтрату, що не піддавався термічній обробці.

При вмісті в непрогрітому фільтраті токсину у тварин з'являються паралічі задніх кінцівок, черевних м'язів і інші ознаки, характерні для отруєння. Морські свинки звичайно протягом 2–3 діб гинуть. Це дає підставу (при відсутності клініки хвороби у контрольних тварин, яким випоювали прогрітий фільтрат) вважати, що в досліджуваному матеріалі є токсин.

Визначення наявності токсину в силосі можна проводити і на білих мишах, при цьому дозу фільтрату зменшують до 0,5–1 мл. Відсутність характерної клініки хвороби не виключає наявність токсину ботулінуса в кормі, тому дослідження повторюють.

Розвиток мікробіологічних процесів у силосі. Перша фаза.

Переважають бактерії з групи ентеробактерій, є також і інші амоніфікатори, цвілеві гриби і дріжджі. При дотриманні всіх правил силосування така мікрофлора через 1–2 доби починає пригнічуватися продуктами життєдіяльності молочнокислих бактерій. **Друга фаза.** Протікає при домінуванні молочнокислих бактерій, спочатку молочнокислих стрептококів, а потім молочнокислих паличок.

Третя фаза. Характеризується перевагою молочнокислих паличок, чисельність кокових форм невелика. Вони менш стійкі до більш високої концентрації молочної кислоти і інших продуктів життєдіяльності мікробів. Кінцева величина рН у цій фазі досягає 4,0–4,2. Кількість молочної кислоти в доброякісному силосі складає 1,5–2% від маси корму, а рН у ньому не повинний бути вище 4,0–4,2.

Концентрація водневих іонів (рН), при якій можуть розвиватися мікроорганізми, що знаходяться в силосі, така:

молочнокислі стрептококи	4,0–8,0
молочнокислі палички	3,0–7,0
маслянокислі бацили	4,7–8,5
гнильні (амоніфікатори)	5,0–9,0
дріжджі	4,0–6,8
цвілеві гриби	1,5–9,0

Заняття 14

Тема: Збудники молочнокислого бродіння

Мета заняття. Приготувати препарати з кисломолочних продуктів, провести мікроскопію і замалювати збудників процесу (молочнокислий стрептокок, болгарська і ацидофільна палички, мікрофлора кефіру). Вивчити морфологічні, культуральні і біохімічні властивості молочнокислих бактерій. Приготувати звичайний кисляк і ацидофілін.

Матеріальне забезпечення. Чисті культури (у пробірках) молочнокислого і змішаного бродіння: молочнокислого стрептокока, болгарської і ацидофільної паличок, кефірних грибків.

Для приготування і фарбування мазків. Предметні скельця. Мікробіологічні петлі. Чашки зливальні, містки. Барвник – метиленовий голубий. Вода в колбах для змивання барвника. Олівці або чорнило по склу. Пальники, сірники. Мікроскопи. Кедрова олія.

Пастеризоване молоко в колбах ємністю 250 мл по 100 мл у кожній. Закваски: молочнокислого стрептокока і ацидофільної палички. Піпетки стерильні об'ємом до 5 мл. Термостати.

Таблиці: збудники молочнокислого бродіння (морфологія); ріст збудників молочнокислого бродіння на живильних середовищах (форма колоній).

Молочнокислі мікроорганізми розділяють на типові і нетипові. До типових (гомоферментативних) молочнокислих мікроорганізмів відносять ті з них, що при зброджуванні цукрів утворюють в основному молочну кислоту (85–95 %) і незначну кількість легких кислот. Нетипові (гетероферментативні) мікроби є слабкими кислотоутворювачами, поряд з молочною кислотою вони утворюють велику кількість побічних продуктів (оцтову кислоту, етиловий спирт, вуглецю діоксид). Молочнокислі мікроорганізми мають багато загальних ознак. Усі вони факультативні анаероби, грампозитивні, нерухомі, спор і капсул не утворюють. Серед молочнокислих мікроорганізмів розрізняють кулясті і палочкоподібні форми.

Кулясті (кокові) форми. Гомоферментативні молочнокислі стрептококи. Типовий представник цієї групи – молочнокислий стрептокок (*Streptococcus lactis*). Його клітини мають овальну форму, що у молодих культур розташовуються у вигляді коротких ланцюжків, а в старих – попарно (рис. 9). Молочнокислий стрептокок міститься у всіх кисломолочних продуктах і складає основу мікрофлори простокваш. Добре росте на агарі з гідролізованого молока і молочної сироватки. На щільних живильних середовищах утворює округлі і чечевицеподібні колонії. Округлі з'являються на поверхні, чечевицеподібні – у глибині (рис. 10). На сусло-агарі з крейдою (САК) навколо колоній утворюється зона просвітління – результат взаємодії кислоти і крейди. У процесі життєдіяльності молочнокислого стрептокока нагромаджується до 1% молочної кислоти, кислотність середовища підвищується до 120°Т.

При оптимальній температурі (30–35°С) *Str. lactis* сквашують молоко протягом 10–12 год. Продукт набуває приємного запаху і кислого смаку. *Str. lactis* має антимікробну дію, утворює поліпептидні антибіотики нізини. Вони стійкі до високої температури і затримують ріст багатьох грампозитивних мікробів, у тому числі і патогенних (*Mycobacterium tuberculosis*).

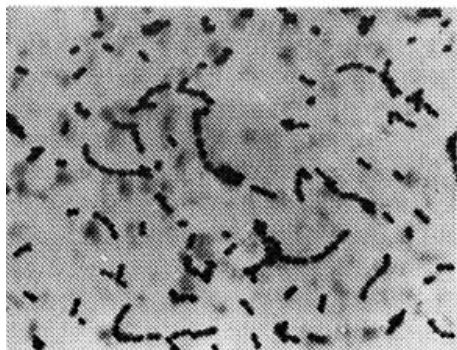


Рис.9. Молочнокислий стрептокок

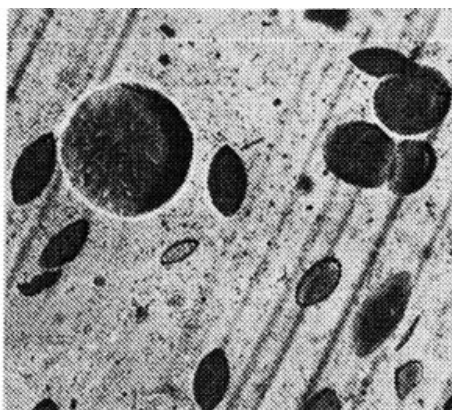


Рис.10. Колонії молочнокислого стрептокока

Вершковий стрептокок (*Str. cremoris*) утворює довгі ланцюжки (рис. 11). Росте так само, як і *Str. lactis*, але кислотність середовища нижче (110–115°Т). Оптимальна температура 25–30°C. При зброджуванні молока згусток набуває сметаноподібну консистенцію. Вершковий стрептокок входить до складу заквасок для приготування сметани, олії, сирів.

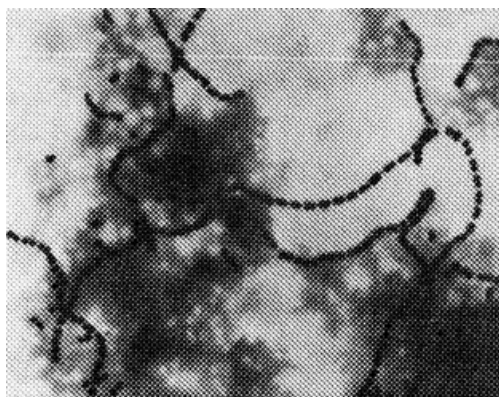


Рис. 11. Вершковий стрептокок

Гетероферментативні молочнокислі стрептококи, окрім молочної, утворюють легкі кислоти, ароматичні речовини, вуглецю діоксид. Деякі з них здатні зброджувати лимонну кислоту. Ароматоутворюючі стрептококи (*Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*, *Str. diacetylactis*) додають кисломолочним продуктам приємного смаку і аромату. За формою вони подібні на *Str. lactis*, але клітини в них дрібніші і розташовуються ланцюжком. Для приготування кисломолочних продуктів ароматоутворюючі стрептококи змішують з гомоферментативними: молочнокислим і вершковим. Вони мають майже однакову оптимальну температуру росту (30°C).

Серед гетероферментативних молочнокислих стрептококів є і термофіли (*Str. thermophilus*), що розвиваються при температурі близько 45°C. Це дозволяє використовувати їх разом з термофільними молочнокислими паличками при виготовленні південних простокваш, а також сирів (радянського, швейцарського). До гетероферментативних

молочнокислих стрептококів відносять також рід *Leiconostoc*. Представники цього роду — *Leiconostoc citrovorum*, *Leiconostoc dextranicum* – мають округлі клітини, що потім приймають витягнуту форму. Зброджуючи цукри, вони утворюють невелику кількість молочної кислоти, надають специфічний запах кисломолочним продуктам, тому їх включають до складу деяких заквасок.

Палочкоподібні молочнокислі бактерії розділяють на гомоферментативні (термофільні і мезофільні) і гетероферментативні.

Гомоферментативные молочнокислі бактерії. Термофільні бактерії розвиваються при 40–45°C; нижче 15°C їх ріст припиняється. При зброджуванні цукрів утворюють до 3,5% молочної кислоти, кислотність середовища досягає 300–400°Т. Молоко згортається протягом 6–12 год. Бактерії мають вигляд довгих паличок розміром 1,5–10X0,5–1 мкм, розташовуються вони поодинокі чи у вигляді ланцюжків. Грампозитивні, спор не утворюють.

У цитоплазмі клітин іноді видно зернистість. На щільному середовищі із сироваткою колонії утворюють розгалуження, що нагадують шматочки вати з нерівними краями чи розгалуження коренів (рис. 12).

Болгарську паличку (*Lactobact. bulgaricum*) (рис. 13) виділяють з південних простокваш, *ацидофільну* (*Lactobact. acidophilum*) – із вмістимого кишечника, *сирну* (*Lactobact. helveticum*) – із сирів. Ацидофільну паличку використовують для приготування ацидофіліну, який має лікувальну дію при шлунково-кишкових хворобах. Дія його більш тривала, ніж болгарського кисляку, тому що збудник знаходить більш сприятливі умови в тому середовищі, з якого він виділений.

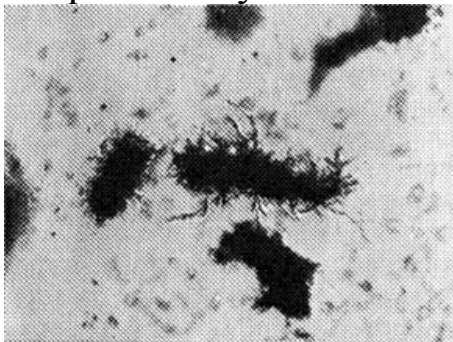


Рис. 12. Колонії ацидофільної палички



Рис. 13. Болгарська паличка

Мезофільні бактерії розвиваються при температурі 30°C і розташовуються ланцюжком, вони утворюють менше продуктів життєдіяльності, кислотність середовища, у якому вони живуть, не перевищує 180°Т.

Виділяють два види стрептобактрій: *Lactobact. casei*, що бере

участь у дозріванні сирів, і *Lactobact. plantarum*, що стимулює процеси силосування і квашення овочів. Молоко вони згортають повільно.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії. *Бета-бактерії* зустрічаються на рослинах, зброджують цукор з утворенням великої кількості етилового спирту і вуглецю діоксиду. Молоко не доводять до згортання, при цьому утворюється мало молочної, але багато летких кислот, що додають особливий аромат молочним продуктам (сирам, кефіру). Характерним представником бета-бактерій є вид *Lactobact. brevis*, штами якого зброджують гексози, деякі дисахариди, а також арабінозу і ксилозу.

Приготування препарату. Досліджуваній кисломолочний продукт (сироватку) мікробіологічною петлею наносять на предметне скло і розподіляють тонким шаром на його поверхні. Висушують і фіксують. Фіксувати краще спиртом-ефіром, при цьому розчиняються крапельки жиру, поліпшується фон. Але можна фіксувати і над полум'ям пальника. Мазок фарбують метиленовим голубим протягом 2–3 хв.

Мікроскопічна картина: на світло-блакитному тлі добре видно пофарбовані в синій колір ті форми мікробів, що містяться в досліджуваному продукті.

Кефірні грибки, чи кефірні зерна. Кефірні грибки являють собою зерна неправильної форми білого кольору, висушені – золотаво-жовтого кольору. Їх використовують для виготовлення кефіру. Висушені кефірні зерна попередньо оживляють у молоці. До складу кефірних зерен входять: молочнокислі стрептококи (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) і ароматизуючі коки, молочнокислі палички (стрептобактерії), молочнокислі дріжджі (рис. 14).



Рис. 14. Мікрофлора кефіру

Тіло кефірного грибка переплетене нитками паличкоподібного мікроба. Кефірні зерна служать материнською закваскою для одержання всіх наступних заквасок. Кефірні грибки одержують шляхом розмноження. Це продукт тривалого культивування молочнокислих

організмів, в результаті чого відбувся стійкий симбіоз.

У кефірі, кумисі і інших подібних продуктах одночасно розвиваються спиртове і молочнокисле бродіння. Для виготовлення кефіру в пастеризоване й охолоджене до 20°C молоко вносять 3–5% грибної закваски, перемішують і залишають при такій же температурі для зброджування. При температурі 20°C і вище переважає молочнокисле бродіння, нижче 15°C – спиртове. Кількість спирту в кефірі коливається від 0,2 до 0,6 %. Чим триваліша витримка кефіру, тим більше в ньому спирту і вище кислотність.

Приготування препарату. Шматочок кефірних грибків поміщають між предметними скельцями, придавлюють і розтягують уздовж. Таким чином, кефірна маса залишається на дотичних поверхнях скелець. Отримані мазки потім висушують, фіксують і фарбують метиленовим голубим протягом 2–3 хв. У полі зору мікроскопа видно переплетення палочкоподібних мікробів, на фоні яких розташовані молочнокислі стрептококи і молочнокислі палички, а також у невеликій кількості клітини дріжджів. Палочкоподібний мікроб, що переплітає тіло кефірного грибка, на звичайних середовищах не росте і у чистому виді поки не виділений.

Приготування кисломолочних продуктів. Кисломолочні продукти мають дієтичні і лікувальні властивості. У них містяться не тільки молочнокислі мікроорганізми, але також вітаміни, антибіотики і інші корисні речовини. Специфічна дія кисломолочних продуктів обумовлюється головним чином молочнокислими мікробами, що є антагоністами гнильних. У залежності від складу мікрофлори, кисломолочні продукти поділяють на продукти молочнокислого бродіння (кисляк, ацидофілін, ацидофільне молоко; напої “Південний”, “Сніжок”) і змішаного (кефір, кумис, айран), у яких поряд з молочнокислими бактеріями можуть бути молочнокислі дріжджі і оцтовокислі бактерії.

Кисломолочні продукти одержують шляхом сквашування пастеризованого молока чистими культурами молочнокислих бактерій. Такі мікроорганізми містяться в заквасках, вони можуть бути сухими і рідкими. Спочатку готують первинну (материнську) закваску. Для цього в охолоджене пастеризоване молоко вносять порцію заводської закваски і ретельно його перемішують. Продукт ставлять при оптимальній температурі на 12–15 год. За цей час повинний утворитися, рівний щільний згусток, без міхурців газу. Якщо згусток не формується, то значить культура втратила життєздатність і її варто

замінити.

У первинній заквасці культура буває малоактивною, тому для відновлення її активності готують вторинну закваску. У пастеризоване й охолоджене молоко вносять 5% первинної закваски і ставлять при оптимальній температурі на 8–10 год. Робочу закваску готують із вторинної.

Закваска для звичайного кисляку повинна містити тільки чисту культуру *Str. lactis*. Для приготування болгарського (мечніковського) кисляку використовують закваску, у яку входять *Str. lactis* (чотири частини) і *Lactobact. bulgaricum* (одна частина). Закваска для південного кисляку складається з *Lactobact. bulgaricum* (три-чотири частини), *Str. lactis* (одна-дві частини) і невеликої кількості молочних дріжджів. Для ацидофільного молока закваска повинна містити чисту культуру *Lactobact. acidophilum*. У закваску для ацидофіліну входять у рівних кількостях три культури: стрептококова, ацидофільна і кефірна. Для кефіру закваскою є кефірні грибки, що представляють симбіоз мікроорганізмів: молочнокислих, дріжджів, оцтовокислих і ін. Закваскою для кумису служить такий же продукт.

Для приготування кисломолочного продукту відразу ж після пастеризації й охолодження вносять 5% закваски і витримують при оптимальній температурі того мікроорганізму, що входить до складу закваски. Оптимальна температура для гомоферментативних ароматоутворюючих стрептококів – близько 30°C, для молочнокислих паличок і термофільного стрептокока – 40-45°C. При культивуванні продуктів змішаного бродіння варто враховувати те, що збудники молочнокислого бродіння розвиваються при більш високій температурі (25–40°C), дріжджі – при більш низькій (20°C і нижче).

У процесі сквашування накопичується молочна кислота, зв'язується вода, набухає казеїн і через 8–12 год. утворюється щільний згусток. Готовий продукт повинний мати приємний запах і смак. При мікроскопії в продукті повинна міститися чиста культура мікроорганізмів закваски.

Ацидофілін, ацидофільне молоко, кефір і інші кисломолочні продукти корисно згодовувати молодняку сільськогосподарських тварин, тому що вони профілактують шлунково-кишкові хвороби і сприяють більш швидкому росту і розвитку організму. З препаратів, до складу яких входять молочнокислі мікроби, у тваринництві застосовують: АБК, ПАБК і ін.

Ацидофільно-бульйонну культуру (АБК) готують у ветеринарних

лабораторіях. Її вирощують при 40°C в суліях на середовищі, у яке входять: молочна сироватка, кров від тварин, натрію хлорид, вода. Пропіоново-ацидофільну бульйонну культуру (ПАБК) також готують у лабораторіях. Крім ацидофільної палички, у цей продукт входять пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну В₁₂. Таким чином, ПАБК – комплексний препарат і найбільш ефективний при лікуванні хвороб молодняку і дорослих тварин. У 1 л ПАБК повинно міститися не менш 1000 мкг вітаміну В₁₂. Культуру застосовують при гіпоавітамінозах групи В, аліментарній анемії, шлунково-кишкових розладах, а також для кращого росту і розвитку молодняку сільськогосподарських тварин.

Заняття 15

Тема: Облік мікроорганізмів у молоці

Мета заняття. Визначити чисельність і груповий склад мікробів шляхом посіву молока на живильні середовища (МПА, СА, стерильне молоко і лактозу). Визначити мікробне забруднення молока непрямим методом. Поставити пробу на редуктазу. Провести підрахунок мікробів у молоці по методу Драйєра-Корольова.

Матеріальне забезпечення. Для 2–3 студентів: чашки Петрі – 6 шт. Стерильна вода в пробірках по 9 мл у кожній - 6 шт. Піпеток 2 мл – 8 шт.: для приготування розведень - 6 шт., для внесення розведень по 1 мл у чашки і пробірки зі стерильним молоком і лактозою – 2 шт. Середовища: МПА і СА стовпчиком – по 3 пробірки кожного; молоко і лактоза – по 6 пробірок.

Для постановки проби на редуктазу. Пробірки великі (на 20 мл молока). Метиленовий голубий (робочий розчин), резаурин (робочий розчин), по 100 мл кожного. Піпетки на 10 мл – 6 шт. Піпетки на 1 мл – 2 шт. Три проби різного молока в колбах і номери на них. Редуктазник. Електрична плитка. Водяна баня. Термометри.

Таблиці: поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого; визначення якості молока за його знебарвленням і фарбуванням (проба з резаурином).

Визначення чисельності і групового складу мікрофлори молока методом посіву. Взяття проб. Після ретельного перемішування молока його наливають в стерильну колбу 500 мл.

Проба молока повинна знаходитися в холодному місці, приблизно при температурі + 6°C. Посів молока на живильні середовища краще робити відразу ж і не пізніше ніж через 4 год.

Посіви. Чисельність мікробів у молоці встановлюють шляхом посіву його на щільні і рідкі живильні середовища. На щільних живильних середовищах чисельність мікробів визначають по кількості вирослих колоній; на рідких живильних – середовищах по найменшому розведенню, у якому з'явився ріст. Тому що універсального середовища, на якому могли б рости всі мікроорганізми немає, то посіви молока проводять: на МПА – для визначення гнильної мікрофлори; на СА – цвілевих грибів і дріжджів; у пробірки зі стерильним молоком – для визначення молочнокислих мікробів; На САК (сусло-агар із крейдою) висівають ті з молочнокислих продуктів, де припускають наявність головним чином молочнокислого стрептокока.

Перш ніж приступити до приготування розведень молока, необхідно знати приблизний вміст у ньому мікробів: у 1 мл свіжого молока від окремих корів містяться десятки тисяч мікробів, збірного молока – сотні тисяч мікробів, збірного заводського молока — сотні тисяч і мільйони мікробів. Чим вища чисельність мікробів у молоці, тим більше треба робити розведень, з таким розрахунком, щоб в останньому розведенні було від 1 до 10 живих мікробних клітин. Розведення готують у пробірках на стерильній воді чи ізотонічному розчині натрію хлориду.

Приготування розведень. Стерильною піпеткою вносять у першу пробірку з 9 мл стерильної води 1 мл досліджуваного молока. Виходить розведення 1:10. Новою стерильною піпеткою перемішують розведення 1:10 і 1 мл його переносять у другу пробірку з 9 мл стерильної води. Виходить розведення 1 : 100 і т.д. Звичайно роблять 6–7 розведень молока. З метою економії піпеток одночасно по 1 мл необхідного розведення можна вносити й у чашки Петрі. По 1 мл кожного розведення можна, вносити і однією піпеткою, але при цьому треба починати внесення молока з найбільшого розведення. Для того щоб знати, на які середовища і з яких розведень необхідно вносити по 1 мл, написи на чашках Петрі роблять заздалегідь.

Схема посіву. Приготувати вісім розведень досліджуваного молока (від 1:10 до 1:100 млн). Зробити посів: на чашки Петрі з МПА з розведень II, III, IV; на чашки Петрі із СА з розведень I, II, III; у пробірки зі стерильним молоком з розведень III, IV, V, VI, VII; на

лактозу з розведень I, II, III, IV, V, VI.

Після внесення розведеного молока (по 1 мл) розплавляють живильні середовища і при охолодженні їх до 45°C виливають у чашки Петрі. Круговими рухами чашок живильні середовища рівномірно розподіляють з досліджуваним матеріалом і залишають для охолодження. Потім усі чашки перевертають догори дном. Чашки з МПА ставлять у термостат при температурі 37°C, із сусло-агаром (СА) – при 25–28°C на 2–3 доби чи при кімнатній температурі на більш тривалий час. Пробірки з молоком (для обліку молочнокислих мікробів) і лактозою (для обліку газоутворюючих мікробів) поміщають у термостат при температурі 30–40°C. На чашках Петрі і пробірках роблять написи з указівкою дати, живильного середовища, розведення, прізвища студента і інше.

Визначення мікробного забруднення молока непрямим методом. Постановка проби на редуктазу. Проба з метиленовим голубим. Редуктаза (анаеробна дегідрогеназа) - фермент, що мікроорганізми виділяють у середовище. Він має редукуючі (відновлюючі) властивості. Чим більше мікроорганізмів у досліджуваному продукті (сирому молоці), тим більше повинно бути ферменту. На цій властивості засноване визначення забруднення молока мікробами і його класності непрямим методом. Як індикатор на редуктазу вперше (1912 р.) був використаний метиленовий голубий. Проба з індикатором дозволяє лише приблизно визначити кількість мікробів у молоці.

Приготування робочого розчину метиленового голубого. Спочатку готують насичений спиртовий розчин метиленового голубого: 10 г метиленового голубого змішують з 100 мл 96%-ного етилового спирту. Розчин ставлять на добу в термостат при температурі 37°C, а потім фільтрують. Робочий розчин готують з насиченого: до 5мл такого розчину додають 195 мл дистильованої води і перемішують.

Постановка досліду. У великі мікробіологічні пробірки наливають по 1 мл робочого розчину метиленового голубого і по 20 мл досліджуваного молока. Пробірки закривають гумовими корками, змішують шляхом повільного перевертання пробірок і ставлять у водяну лазню при температурі 38–40°C. Зміну кольору в молоці враховують через 20 хв, 2 год. і 5 год. 30 хв. У залежності від часу знебарвлення метиленового голубого молоко розділяють на чотири класи (табл. 2).

Таблиця 2

Поділ молока на класи за часом знебарвлення в ньому метиленового голубого (ДСТ 9225–59)

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість знебарвлення	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Понад 5 год. 30 хв.	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Понад 2 год. до 5 год. 30 хв.	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Понад 20 хв. до 2 год.	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	20 хв. і менше	20 млн. і вище

Верхній шар може бути пофарбованим, тому що молоко контактує з киснем повітря, але це в розрахунок не приймають.

Прискорена проба з метиленовим голубим. Для постановки прискореної проби на редуктазу робочий розчин метиленового голубого розводять у 10 разів, а кількість молока зменшують у 2 рази.

Постановка досліду. У чисті пробірки наливають по 1 мл розведеного метиленового голубого і з кожної партії вносять по 10 мл молока. Пробірки закривають гумовими корками, перемішують і ставлять у водяну лазню, температура якої 38–40°C. Облік знебарвлення метиленового голубого у молоці проводять через 5, 10, 15 хв. Молоко, знебарвлене протягом цього часу, містить десятки мільйонів мікроорганізмів у 1 мл, головним чином газоутворюючих.

Проба з резазурином запропонована пізніше (1929р.). За допомогою резазурину визначають не тільки чисельність мікробів, але і лейкоцитів у молоці. Окрім того, резазурин має деякі переваги перед метиленовим голубим — аналіз молока проводиться протягом 1 год, що дозволяє заощаджувати час і з більшою вірогідністю встановлювати його класність. Відновлення резазурину йде в двох стадіях.

Приготування робочого розчину. Спочатку готують основний розчин: 50 мг резазурину розчиняють у 100 мл прокип'яченої і охолодженої дистильованої води. Термін зберігання основного розчину при 3–5°C не більше 20 діб. Робочий розчин готують з основного шляхом розведення його прокип'яченою і охолодженою дистильованою водою у співвідношенні 1:10. Для приготування 100 мл робочого розчину до 10 мл основного розчину додають 90 мл води.

Постановка досліду. У стерильні пробірки наливають 10 мл досліджуваного молока і 1 мл робочого розчину резазурину. Пробірки

закривають чистими гумовими корками і 3 рази повільно перевертають, після чого їх поміщають у водяну лазню при температурі 38°C. Облік результатів проводять через 20 хв. і через 1 год. Через 20 хв. пробірки зі знебарвленим молоком видаляють, а інші один раз перевертають і знову ставлять у водяну лазню до кінця досліду. Якість молока визначають за його знебарвленням і кольором з урахуванням часу.

Таблиця 3

**Визначення якості молока за його знебарвленням і кольором
(проба з резазурином)**

Клас	Оцінка якості молока	Тривалість зміни кольору	Забарвлення молока	Кількість мікробів у 1 мл молока
I	Добре	Через 1 год.	Синьо-сталеве	Менш 500 тис.
II	Задовільне	Через 1 год.	Бузкове чи синьо-фіолетове	Від 500 тис. до 4 млн.
III	Погане	Через 1 год.	Рожеве чи біле	Від 4 млн. до 20 млн.
IV	Дуже погане	До 20 хв.	Біле	Більше 20 млн.

Безпосередній підрахунок мікробів під мікроскопом. Метод Драйєра – Корольова. Цей метод заснований на зіставленні клітин у стандартній суспензії з кількістю мікробів у досліджуваному молоці. Стандарт являє собою суміш убитих фіксованих клітин якого-небудь мікроба (наприклад, дріжджів), у 1 мл якого міститься 10 млн клітин. Після ретельного збовтування беруть 1 мл суспензії стандарту і досліджуваного молока і змішують їх. На знежирене предметне скло наносять краплю суміші і розподіляють на його поверхні. Після фіксації і фарбування проводять роздільно підрахунок клітин стандарту й іншої мікрофлори в полі зору мікроскопа. Підрахунок ведуть у 10–20 полях зору (чим більше полів, тим точніше результати). Після підрахунку визначають середнє число клітин мікробів у молоці в зіставленні із середнім числом клітин стандарту.

Приклад. У 20 полях зору виявлено 60 клітин стандарту і 80 клітин мікробів досліджуваного молока. При наявності в 1 мл стандарту 10 млн. клітин у 1 мл досліджуваного молока буде міститися приблизно 13 млн. клітин.

$$X = \frac{80 * 10^7}{60} \approx 13 * 10^6$$

Заняття 16

Тема: Виділення чистих культур молочнокислих мікробів. Пропіоновокислі бактерії

Мета заняття. Визначити результати посіву молока на живильні середовища. Оцінити молоко за вмістом загальної кількості мікробів у 1 мл і колі-титром. Провести мікроскопічний контроль приготовлених кисломолочних продуктів: звичайного кисляку й ацидофіліну. Ознайомитися з методикою виділення чистих культур: молочнокислого стрептокока, болгарської і ацидофільної паличок. Приготувати препарат, провести мікроскопію і замалювати пропіоновокислі бактерії. Охарактеризувати збудника пропіоновокислого бродіння.

Матеріальне забезпечення. Посіви попереднього заняття на МПА, СА, молоці, лактозі. Кисломолочні продукти: звичайний кисляк і ацидофілін. Культура збудника пропіоновокислого бродіння (у пробірках). Метиленовий голубий. Фільтрувальний папір, оброблений генціановим фіолетовим. Розчин Люголя. Фуксин Пфейфера. Мікробіологічні петлі. Чашки зливальні, містки. Вода дистильована в колбах для промивання мазків. Пальники, сірники. Мікроскопи, іммерсійна (кедрова) олія. Форма колоній молочнокислого стрептокока і ацидофільної палички на агарі в чашках Петрі.

Таблиця: мікробіологічна характеристика коров'ячого молока (ДСТ 13277–67).

Визначення загальної кількості мікробів у молоці. Кожна мікробна клітина на щільному живильному середовищі утворює колонію. Облік мікробів у досліджуваному молоці проводять методом підрахунку колоній, що виростили на щільному живильному середовищі у чашках Петрі.

Якщо колоній виростило багато, то для зручності підрахунку колоній дно чашки поділяють на кілька секторів. Колонії підраховують у чашках з висіяним молоком з різних розведень. Зіставляючи результати підрахунку, виводять середню кількість колоній. Кількість мікробів у 1 мл молока дорівнює числу колоній, що виростили на живильному середовищі помноженому на розведення продукту.

Вміст мікробів у 1 мл молока при посіві на стерильне незбиране чи знежирене молоко враховують по його згортанні.

Приклад. Якщо молоко згорнулося в перших п'ятьох пробірках, то в 1 мл міститься 100 тис. мікробів, якщо молоко згорнулося в перших шести, то в 1 мл – 1 млн. мікробів і т.д.

Визначення колі-титру молока. Колі-титр молока визначають на середовищі Кеслера, до складу якого входять речовини (жовч, барвник генціановий фіолетовий), що пригнічують ріст молочнокислих і інших грампозитивних мікробів.

Молоко чи молочні продукти спочатку розводять 1:10, 1:100 і т.д. Потім беруть шість пробірок із середовищем: у три з них вносять по 1 мл, в інші – по 0,1 мл кожного розведення. Засіяні пробірки ставлять на дві доби у термостат при температурі 43°C. Відсутність газоутворення у всіх шести пробірках указує на чистоту продукту, і його колі-титр вважають вище 3 мл; при газоутворенні в одній пробірці, засіяної 1 мл досліджуваного продукту, колі-титр дорівнює 3 мл; при утворенні газу більш ніж в одній пробірці з 0,1 мл колі-титр вважається рівним 0,3 мл; при утворенні газу в шести чи п'яти пробірках колі-титр менше 0,3 мл. Таке молоко непридатне до вживання.

Ідентифікацію кишкової палички проводять на середовищі Ендо, для чого роблять висів на таке середовище з газоутворюючих пробірок і ставлять на добу в термостат при температурі 37°C. Утворення на середовищі Ендо характерних колоній червоного кольору з металевим відтінком вказує на наявність кишкової палички.

Надалі мазки з таких колоній фарбують за Грамом, мікроскопіюють, а також висівають культуру на середовище Гісса з лактозою.

Таблиця 4

Мікробіологічна характеристика коров'ячого молока (ДСТ 13277–67)

Молоко	Загальна кількість мікробів у 1мл молока, не більше	Титр кишкової палички, мл
Пастеризоване в пляшках і пакетах:		
група А	75 000	3
група Б	150000	0,3
Пастеризоване у флягах і цистернах	300 000	0,3

По вмісту кількості мікробів і титру кишкової палички пастеризоване молоко поділяють на дві групи: А и Б (табл. 4).

Одночасно при підрахунку враховують фізіологічні групи мікроорганізмів на елективних середовищах і в такий спосіб визначають загальну кількість мікробів у 1 мл молока.

Методика виділення молочнокислих мікробів. Виділення чистої культури молочнокислого стрептокока проводять зі сметани чи доброї якості кисляку. Одну петлю сметани розводять у 10 мл

стерильної води і з цього розведення роблять посів на агар з додаванням гідролізованого молока. Чашки Петрі ставлять на 2–3 доби у термостат при температурі 25°C. Ріст переглядають під малим збільшенням мікроскопа (об'єктив 8). Типові колонії визначають і пересівають на стерильне знежирене молоко і культивують при температурі 25–30°C.

Після згортання (через 12–24 год.) знежиреного молока проводять мікроскопію. При наявності коротких ланцюжків визначають активність стрептокока шляхом пересівання на нові середовища. Якщо щільний згусток без міхурців газу утвориться через 10 – 12 год, а при мікроскопії виявлена типова культура молочнокислого стрептокока, то такий штам використовують для приготування заквасок.

Виділення чистої культури молочнокислих паличок.

Болгарську паличку виділяють шляхом посіву петлі кисляку в стерильне молоко, ацидофільну паличку – шляхом посіву вмісту шлунково-кишкового тракту людини або тварини на таке ж середовище. Культури вирощують у термостаті при температурі 40–45°C. Через дві доби із пробірок, у яких згорнулося молоко, роблять мазки і проводять мікроскопію. При характерній формі паличок культуру пересівають 4–5 разів і вирощують при тій же температурі.

Для остаточного виділення культури з пробірок з характерним згустком одну петлю продукту вносять у 10 мл сироваткового агару (до 7,5 г агар-агару, розплавленого в 100 мл води, додають 400 мл молочної сироватки і стерилізують при 112°C протягом 20 хв). Під малим збільшенням мікроскопа розглядають ріст, визначають характерні колонії, які потім пересівають на знежирене чи незбиране молоко. Якщо продукт зброджується через 12–14 год, то таку культуру залишають у лабораторії для приготування заквасок і кисломолочних продуктів. Лабораторні культури пересівають через тиждень.

Мікроби пропіоновокислого бродіння. Збудником пропіоновокислого бродіння є *Bact. acidi propionici*, або *Propionibacterium*. Такі мікроби широко розповсюджені в природі, їх багато зустрічається в гноєві. Це нерухомі неспоріві палички, краще розвиваються при відсутності кисню повітря. Деякі з них схожі на коків, грампозитивні. В молоці пропіоновокислі бактерії розвиваються повільно і згортають його на 7–10-у добу. Гранична кислотність, утворена в молоці пропіоновокислими бактеріями, значно перевищує ту, котра утвориться в цьому продукті деякими молочнокислими мікробами, вона доходить до 160–170°Т. Розвиваються пропіоновокис-

лі бактерії при температурі 30–35°C.

Пропіоновокисле бродіння може відбуватися за рахунок молочного цукру і молочної кислоти. При цьому утвориться пропіонова, оцтова кислоти і діоксид вуглецю. Таке бродіння найбільш характерне виявляється в сирах із тривалим терміном дозрівання (швейцарський, радянський). Пропіоновокислі бактерії поліпшують якість сиру. Оцтова і пропіонова кислоти додають сиру специфічний смак і аромат. Вуглецю діоксид утворить вічка.

Пропіоновокислі бактерії ростуть на тих же середовищах, що і молочнокислі, але їх ріст проявляється набагато повільніше, пізніше. За формою колоній пропіоновокислі бактерії нагадують молочнокислий стрептокок. Пропіоновокислі бактерії – продуценти вітаміну В₁₂. Вони входять до складу пропіоново-ацидофільної бульйонної культури, що застосовується у тваринництві і служить добрим профілактичним і лікувальним засобом при багатьох хворобах молодняку сільськогосподарських тварин.

Заняття 17

Тема: Мікрофлора м'яса і яєць

Мета заняття. Визначити загальне обсіменіння м'яса мікроорганізмами. Приготувати мазки-відбитки з поверхневого і глибинного шару м'яса № 1 і 2, зафарбувати за Грамом. Визначити рН колориметричним або іншим методом і аміаку реактивом Неслера у фільтраті-екстракті з проби м'яса № 1 і 2. Ознайомитися з мікрофлорою зіпсованих яєць. Провести овоскопію і пробу з зануренням у воду.

Матеріальне забезпечення. Проби м'яса № 1 (якісне) і 2 (зіпсоване). Ножиці Купера (вигнуті), пінцети, скальпелі. Генціановий фіолетовий, розчин Люголя, 96%-ний етиловий спирт. Фуксин Пфейффера. Чашки зливальні, містки. Мікробіологічні петлі. Предметні скельця. Пальники, сірники. Мікроскопи. Кедрова олія.

Екстракт із м'яса № 1 і 2. Апарат Михаеліса (макро чи мікро). Індикатор паранітрофенол. Вода дистильована. Піпетки. Реактив Неслера. Сухі чисті пробірки. Мілілітрові піпетки (для реактива Неслера, екстракту з проби м'яса № 1 і 2, дистильованої води). Три яйця різного ступеня зіпсованості і одне якісне. Овоскоп. Чашки з водою.

Таблиця: визначення якості м'яса за реакцією на аміак з реактивом Неслера (по В. Ю. Вольферцу).

Мікрофлора м'яса. Мікробіологічне дослідження м'яса проводять

для визначення мікробного забруднення, мікробів-збудників різних хвороб і придатності його в їжу. Поряд з мікробами в м'ясі можуть бути продукти їхньої життєдіяльності. Спочатку проводять органолептичне дослідження м'яса, потім, у залежності від ступеня свіжості, мікроскопіюють мазки-відбитки і роблять посіви на МПБ і МПА.

Мікроскопія мазків-відбитків із проби м'яса № 1 і 2. На предметному склі роблять два відбитки: один з поверхневого, інший із глибинного шару м'яса. Для приготування мазка-відбитка з поверхневого шару м'яса стерильними ножицями вирізують шматочок і зрізаною стороною прикладають до поверхні профламованого і охолодженого предметного скла. Для виготовлення мазка-відбитка з глибинних шарів поверхню м'яса припікають шпателем, роблять розріз, із глибини витягають шматочок м'яса, який і прикладають до поверхні скла. Препарати-відбитки висушують на повітрі, фіксують над полум'ям пальника, фарбують за Грамом і мікроскопіюють. Переглядають не менше п'яти полів зору, у кожному полі окремо підраховують кокові і паличкоподібні форми мікробів. Середню кількість мікробів визначають шляхом додавання всіх клітин і ділення їх на число полів.

Облік результатів дослідження. *М'ясо абсолютно свіже, охолоджене – відбитків тканин м'яса на склі майже немає, фарбування мазка непомітне. У препараті-відбитку з поверхневого шару можна бачити одиничні коки і палички. У препараті-відбитку з глибинних шарів м'яса — мікроби відсутні.*

М'ясо умовне придатне – мазки-відбитки пофарбовані задовільно, тому що тканевий сік містить більше щільних речовин (початок розпаду тканин). У полі зору можна бачити коки і невелике число паличок.

М'ясо несвіже – мазки сильно пофарбовані, тому що до скла прилипає велика кількість тканини, що розпалася. У полі зору багато паличок і коків. При сильному розкладанні коки майже відсутні, у полі зору паличкоподібні форми мікробів.

Визначення загальної кількості мікробів. З кожної проби за допомогою стерильних ножиців вирізують по 1 – 2 г м'яса і поміщають у стерильні бюкси. Після їх зважування вміст переносять у ступку із стерильним товкачиком і розтирають. Потім додають 10 мл стерильної води. Перемішують. У чашку Петрі вносять по 1 мл суспензії і 10–12 мл розплавленого й охолодженого до 45°C м'ясопептонного агару. Обертальними рухами суміш розподіляють по дну чашки і залишають

до охолодження. Перевернені чашки поміщають на добу в термостат при температурі 37°C. Число мікробів визначають у 1 г (1 мл) досліджуваного м'яса. Для цього підраховані колонії множать на розведення.

Визначення концентрації водневих іонів (рН). Приготування фільтрату-екстракту. З поверхні м'яса зрізують шматочок, звільняють його від жиру і сухожиль. Зважують 10 г, дрібно нарізають і заливають 100 мл дистильованої води, енергійно струшують. Через 15 хв фільтрують через паперовий фільтр. Витяжку досліджують колориметричним методом за загальною методикою з паранітрофенолом. У свіжому м'ясі рН досягає 5,9–6,4; у сумнівному – 6,6; у непридатному – 6,7 і вище. Витяжка зі свіжого м'яса повинна мати рН 5,8–6,7 і, як виняток, 6,4.

Примітка. Для визначення рН універсальним індикатором беруть .1 мл фільтрату-екстракту й одну краплю індикатора. Змішують. Концентрацію водневих іонів визначають за шкалою.

Таблиця 5

Визначення якості м'яса за реакцією на аміак з реактивом Неслера (за В.Ю. Вольферцом)

Число капель реактива	Зміна кольору і випадіння осаду	Приблизний вміст аміаку, мг %	Оцінка реакції	Якість м'яса
1	2	3	4	5
10	Колір не міняється, помутніння і осаду немає	До 16	–	свіже
10	Пожовтіння і слабе помутніння, осаду немає	16-20	±	Початкова стадія псування, м'ясо підлягає терміновій реалізації
10	Пожовтіння, незначне помутніння і незначний осад	21-30	+	–“–
6-9	Пожовтіння або оранжевий відтінок і осад	31-45	++	Умовно придатне, термінова реалізація після зачищення підозрілих ділянок
1-5	Різде пожовтіння або оранжево-червоний колір і осад	Більше 45	+++	Непридатне, підлягає технічній утилізації

Визначення аміаку реактивом Неслера (крапельний метод).

Реакцію ставлять у двох пробірках: в одну з них наливають 1 мл м'ясного фільтрату-екстракту, в іншу – 1 мл дистильованої води (контроль). Реактив Неслера вносять у пробірки по краплях. Зміна кольору і появу осаду враховують після додавання кожної краплі. Результат оцінки реакції вказують хрестами (табл. 5).

Реакція визначення аміаку реактивом Неслера є демонстративною і може служити одним із критеріїв при оцінці якості м'яса.

Приготування реактиву Неслера. 5 г калію йодиду розчиняють у 5 мл гарячої дистильованої води; 15 г калію гідроксиді (КОН) розчиняють у 40 мл дистильованої води. Розчини змішують і додають 1–2 мл насиченого розчину ртуті дихлориду (сулема). Після охолодження об'єм розчинів дистильованою водою доводять до 100 мл. Зберігають реактив Неслера в банці з темного скла.

Мікрофлора яєць. Мікроби попадають у яйце не тільки під час його формування, але і при зберіганні. З поверхні яйце захищене шкарлупою, що має пори діаметром від 4 до 10 мкм. Кількість пор на 1 см² шкарлупи: у яйценосних порід курей досягає 147, у м'ясних – 132. Через пори мікроби проникають усередину яйця. Особливо цьому сприяє підвищена вологість і температура. У вмістимому уражених яєць виявляють вульгарного протея, кишкову паличку і інші мікроорганізми, тобто ті, котрі здатні рухатись. У залежності від місця зберігання, крім бактерій, через пори можуть проникати цвілеві гриби і дріжджі. Білок яйця – добре середовище для розвитку мікроорганізмів. Частіше уражаються старі яйця, у яких під час зберігання знижуються захисні сили, нейтралізується лізоцим. Свіжі яйця мають природний імунітет. Більша кількість лізоциму міститься в яєчному білку курей (5,71 мг/мл) і менша в такому ж білку водоплавної птиці: качок (1,80 мг/мл), гусей (0,38 мг/мл). Розвиток мікробів у білку яєць веде до псування продукту. У таких яйцях при просвічуванні видно колонії мікробів (у вигляді темних плям, крапок).

Особливо небезпечні яйця водоплавної птиці (качок, гусей), вони часто бувають заражені сальмонелами, мікобактеріями і іншими збудниками інфекційних хвороб, тому їх дозволяється застосовувати тільки у виробництві кондитерських виробів і то після проварювання в кип'ячій воді протягом 13–14 хв.

Пліснявіння яєць. Висока вологість і температура сприяють проникненню в яйце цвілевих грибів. Колонії, що утворюються в яйці не пропускають світло, їх найбільше біля повітряної камери (пуги). Гіфи гриба утворюють густу мережу, виділяють продукти

життєдіяльності. Білок розчиняється, жовток залишається усередині, розміщений у футлярі з гіф. З цвілевих грибів частіше зустрічаються представники роду *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* і інші.

Гниття яєць відбувається під впливом амоніфікаторів. Білок руйнується. Утворюється аміак, сірководень і інші гази. Нерідко такі гази розривають шкарлупу, вміст виливається на сусідні яйця, унаслідок чого відбувається їхнє забруднення і зараження мікробами. Вміст уражених яєць зеленого, чорного і рідше жовтого кольору. З такої маси виділяють мікробів із групи *Pseudomonas* і *Proteus*, а також ешерихій, сальмонел, сінну бацилу, сарцини і ін.

Овоскопія – перегляд яйця в проникаючому світлі. Для цієї мети використовують прилад овоскоп, він являє собою ящик, у верхній частині якого є отвори для яєць. Усередині овоскопа повинно бути джерело світла (звичайна електрична лампочка). Перегляд яєць ефективніше проводити в затемненому приміщенні, але при більш сильному джерелі світла, їм можна користуватися і при природному освітленні. За допомогою овоскопа встановлюють наявність мікробних уражень у яйці.

У таких місцях можна знайти темні (затримуючі світло) ділянки. Вони, можуть бути різні за формою, розмірами і являють собою колонії мікробів.

Проба із зануренням у воду. Яйце обережно занурюють тупим кінцем у склянку з водою. При цьому зіпсоване яйце стоїть на дні чи спливає, свіже – лягає на дно склянки.

Студенти роблять мазок із вмісту зіпсованого яйця, фарбують за Грамом і розглядають його під мікроскопом. По складу і кількості мікробів судять про процеси, що відбуваються в яйці.

Заняття 18

Тема: Організація вірусологічних лабораторій

Мета заняття: Ознайомити студентів з обладнанням та структурою вірусологічної лабораторії, технікою безпеки при роботі в лабораторії.

Матеріальне забезпечення: дистильатор, автоклав, сушильні шафи, лабораторний посуд, холодильник, центрифуга, шприци, пінцети, ножиці, корнцанги, гомогенізатор тканин, полістеролові планшети, мікроскопи та інше.

Зміст заняття: ознайомитися з вірусологічною лабораторією кафедри та її основним обладнанням; вивчити санітарно-епідемічні правила роботи вірусологічної лабораторії; вивчити правила роботи з вірусомісним матеріалом; одержати інструктаж по техніці безпеки при роботі у вірусологічній лабораторії і розписатися в журналі; зафіксувати в учбових альбомах основні типи посуду, інструментарію, приладів та обладнання, які використовуються у вірусологічній лабораторії.

Основні правила організації вірусологічної лабораторії базуються на загальних біологічних властивостях вірусів як неклітинної форми життя.

Віруси є автономними генетичними структурами, які можуть функціонувати та репродукуватися в сприйнятливих до них клітинах. Мають субмікроскопічні розміри, облігатні внутрішньоклітинні паразити.

Ці визначення відображають дві суттєві властивості вірусів: по-перше, наявність у вірусу свого генетичного матеріалу, який використовує біохімічний апарат клітини-господаря, та, по-друге, існування у вірусів позаклітинної інфекційної фази, яка представлена спеціалізованими частками, або віріонами, які репродукуються під генетичним контролем даного вірусу і слугують для введення геному вірусу в інші клітини. Перша властивість вказує на внутрішньоклітинний паразитизм вірусу, однак, він властивий не лише вірусам. У визначенні вірусів підкреслюється особлива природа паразитизму, який можна назвати паразитизмом на генетичному рівні. Виходячи з цього, по-перше, робота з вірусами має проводитись у стерильних умовах, а по-друге, обладнання сучасної вірусологічної лабораторії має максимально забезпечувати ефективні заходи щодо запобігання виходу вірусів в оточуюче середовище і зараження персоналу та населення вірусними інфекціями.

При роботі у вірусологічній лабораторії треба суворо дотримуватися правил асептики та антисептики.

Асептика – система профілактичних заходів та прийомів, які попереджають попадання мікроорганізмів та вірусів з оточуючого середовища в організм людини і досліджуваній матеріал, і спрямовані на створення безмікробних умов для запобігання зараженню. Вона передбачає використання стерильних інструментів та матеріалів,

обробку рук, дотримання особливих санітарно-гігієнічних правил та прийомів роботи.

Антисептика – комплекс заходів, спрямованих на хімічне та біологічне знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів та вірусів, щоб запобігти зараженню при попаданні на ушкоджені і неушкоджені ділянки шкіри та слизових оболонок.

При роботі з вірусомісним матеріалом необхідно забезпечити виконання таких вимог:

- не допускати виходу вірусів у зовнішнє середовище;
- запобігати контамінації вірусів сторонньою мікрофлорою;
- забезпечити особисту безпеку роботи.

Розподіл вірусів на групи за ступенем їхньої небезпеки для людини дозволяє розділити лабораторії на категорії в залежності від того, з якою групою (чи групами) вірусів ведеться робота в тій чи іншій лабораторії.

Для забезпечення можливості роботи з вірусами, що належать за ступенем небезпеки до різних груп, необхідні універсальні багатопрофільні лабораторії.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я запропонувала розділити вірусологічні лабораторії на 3 категорії:

1) Базові лабораторії (основні або загального типу); в зв'язку з конкретними особливостями роботи вони можуть бути обладнаними різними захисними засобами та устаткуванням. Це – лабораторії учбові, служби охорони здоров'я, лікарень, діагностичні лабораторії, університетські лабораторії. В них працюють зі збудниками інфекції III (віруси лімфоцитарного хориомеїнігиту, грипу, поліомієліту, вісповакцини, енцефаломіокардиту) та IV груп (ентеровіруси, риновіруси, аденовіруси, коронавіруси, реовіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, герпесу, вітряної віспи, цитомегалії людини), вірусами рослин та бактерій.

2) Режимні лабораторії (ізолювані) або лабораторії утримання. Це – спеціальні діагностичні лабораторії, де працюють зі збудниками інфекцій II групи, а саме арбовірусами, аренавірусами, які не увійшли в I групу, вірусами сказу (дикий штам) та натуральної віспи, вірусами гепатитів B та C, ВІЛ.

3) Лабораторії особливого режиму (максимально ізолювані) або лабораторії максимального утримання. Це – лабораторії для роботи з особливо небезпечними патогенними вірусами I групи, такими як:

віруси геморагічних лихоманок Ебола та Марбург (родина філовірусів), Ласса, Хунін та Мачупо (родина аренавірусів).

Незалежно від того, до якої категорії відноситься та чи інша лабораторія, проводиться зонування приміщень з метою групування їх в самостійні зони з однаковими рівнями реально присутніх або потенційно можливих професійних ризиків для розподілення цих зон між собою та ізоляції їх від зовнішнього середовища необхідними бар'єрами. Розподіл приміщень за зонами дозволяє найбільш доцільно проводити їх обеззаражування, цільову санітарну обробку персоналу, обробку використаного спецодягу та інших засобів індивідуального захисту, матеріалів та предметів, що передаються між зонами.

Структура вірусологічної лабораторії визначається завданнями та особливостями її діяльності. Проте існує загальний для всіх лабораторій мінімум вимог, без яких неможливе проведення вірусологічних досліджень.

Вірусологічну лабораторію треба розташовувати в місцях, де відсутня вібрація будинку, яка може привести до неспроможності працювати з мікроскопами, оптичними та аналітичними приладами. Не можна розміщувати лабораторію поблизу димових труб, котелень, місць, де можливе забруднення повітря пилом або хімічно активними газами. Це може руйнувати точні прилади, утруднюючи при цьому проведення досліджень.

Вірусологічну лабораторію слід розташовувати у світлому ізольованому приміщенні з окремими входом та виходом.

Площа лабораторії повинна відповідати санітарній нормі – 14 м^2 в середньому на одного працівника. Приміщення повинні бути достатньо просторими для безпечного проведення лабораторних досліджень з шириною проходів до робочих місць $1,5\text{ м}$.

В структурі базової вірусологічної лабораторії обов'язковими є такі підрозділи: мийна, стерилізаційна та препаратурська кімнати, кімнати для вирощування культур клітин, для серологічних досліджень, віварій. В залежності від умов роботи вірусологічної лабораторії доцільно мати термальні та морозильні кімнати. Мийна кімната площею біля 10 м^2 , з розрахунку 5 м^2 на одного працівника, повинна мати прилади для миття посуду та прання білизни, раковини з гарячою та холодною водою, столи, газові та електричні плити, сушильні шафи. Посуд та інструментарій, забруднені інфекційним матеріалом, миють після обеззаражування дезінфекційними речовинами.

В стерилізаційній кімнаті розташовані дистильатор, автоклав, парові стерилізатори, сушильні шафи та інша апаратура для сушіння та стерилізації посуду, інструментарію, одягу, живильних середовищ, води, буферних розчинів. Для кожного парового стерилізатора за правилами техніки безпеки треба відводити площу 7,5 м².

Препараторська кімната призначена для зберігання посуду, діагностичних препаратів, хімічних реактивів.

Віварій (приміщення для утримання тварин) повинен мати карантинний відділ, кімнати (ізолювані одна від одної з окремими виходами) для здорових та інфікованих тварин з витяжними шафами, для миття та дезінфекції кліток, інвентарю та спецодягу, приготування кормів, кладову, кремаційну та інші.

Кімнати, призначені для роботи з вірусами, повинні мати добре природне і штучне освітлення. Вікна повинні виходити на північ або бути зробленими з матового або молочного скла, оскільки віруси інактивуються прямим сонячним світлом. Ці кімнати повинні складатися з двох відділень – боксу площею не менше 9 м² та передбокснику площею біля 4 м², розділених скляною перегородкою з розсувними, а не на петлях дверима, для економії площі та для того, щоб уникнути коливань повітря та запобігти зайвому попаданню повітря в бокс.

Обладнання вірусологічних лабораторій

Крім устаткування та посуду, який використовується в бактеріологічній та хімічній роботі, у вірусологічних лабораторіях обов'язкова наявність спеціального обладнання.

Для тривалого зберігання в незмінному стані вірусомісного матеріалу, розчинів, сироваток, вакцин, антигенів тощо, необхідно мати холодильні установки з інтервалом температури від +4°C до -170°C. Це – камери глибокого та надглибокого заморожування (-30°C, -170°C), холодильні камери (-20°C), холодильники (+4°C), холодильні кімнати з внутрішньою температурою до +4°C. Для інкубування курячих ембріонів та культур клітин необхідні термостати (сухоповітряні та водяні). Вірусологічній лабораторії необхідні центрифуги на 1500 – 3000 об./хв. для осадження великих часток подрібненого вірусологічного патологічного матеріалу та трипсинізації тканин. Повна очистка вірусів від баластних речовин та їх концентрація здійснюється за допомогою високошвидкісних центрифуг на 30000 об./хв. і більше з пристроями для охолодження та створення вакууму в робочій камері.

Для зараження та розтину лабораторних тварин та курячих ембріонів і для відбору вірусомісного матеріалу потрібний набір різних спеціальних інструментів – шприци різних розмірів (туберкулінові на 1 мл, Люєра на 2, 5, 10, 20 мл), голки, шпатель, скальпелі, пінцети анатомічні та хірургічні, ножиці, корнцанги, тощо.

Для подрібнення патологічного матеріалу використовують гомогенізатор тканин, фарфорові ступки з товкачиками.

У вірусологічній лабораторії в достатній кількості повинні бути емальовані відра, тази, металеві бікси, бактеріальні фільтри, скляний посуд (бажано з боросилікатного скла); матраси, чашки Карреля, пробірки Лейтона та інший скляний та пластмасовий посуд для вирощування культур клітин, флакони, склянки, колби різного об'єму зі шліфами та без них, круглодонні та плоскодонні, конічні (Ерленмейєра), круглі (Кольрауша), з патрубками (Бунзена – для відсмоктування, Вюрца – для дистиляції), мензурки, бюретки, фарфорові тиглі, чашки Петрі, градуйовані піпетки різного об'єму (1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора, Пастера, мікропіпетки, флакони з корками, що загвинчуються та притираються, пробірки хімічні, біологічні, серологічні, бактеріологічні, центрифужні, автоматичні (самплери), ампули різних розмірів, ексикатори, лійки, мірні циліндри.

Для постановки серологічних реакцій необхідні полістиролові планшети. В лабораторіях такого типу повинні бути різні терези: хімічні, аналітичні, торсіонні, центрифужні для зрівноваження пробірок. Необхідним обладнанням є мікроскопи різних типів: біологічний світловий, біологічний інвертований, біологічний бінокулярний, біологічний стереоскопічний, люмінесцентний, електронний.

В лабораторії у достатній кількості мають бути різні металеві та пластмасові штативи для пробірок, гумові корки з силіконової та звичайної гуми різних розмірів (№ 11, 12, 14), олівці або чорнила для скла, фільтрувальний папір, лейкопластир, тощо.

Значна кількість всього описаного обладнання використовується у стерильному вигляді. Для цього згідно різних методів обробки інструментарій та посуд, піддають чистці, миттю, дезінфекції та стерилізації.

Сучасні вірусологічні лабораторії мають необхідні прилади та устаткування для проведення експрес-діагностики вірусних інфекцій, а саме імуноферментного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу,

імуноелектроблотингу, електронної мікроскопії, імуноелектронної мікроскопії, полімеразної ланцюгової реакції.

Правила роботи в учбових вірусологічних лабораторіях

1. Вхід у вірусологічну лабораторію дозволяється лише особам, які пройшли інструктаж по техніці безпеки.
2. Працювати дозволяється лише у спецодязі.
3. Не дозволяється ходити і розмовляти під час роботи з вірусним матеріалом.
4. Категорично забороняється приносити особисті речі, палити, приймати їжу та зберігати продукти і воду, користуватися косметикою.
5. Проводити відсмоктування інфекційного матеріалу тільки за допомогою автоматичних та напівавтоматичних піпеток чи гумових балонів. Категорично забороняється всмоктувати в піпетку досліджуваній матеріал ротом.
6. Для виключення випадкових уколів вміло та обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів та лабораторних тварин.
7. Після закінчення роботи використані предмети (піпетки, шпателі, предметні та накривні скельця, тощо) помістити в дезінфікуючий розчин на 1 добу, після чого промити та прокип'ятити.
8. Посуд з використаними живильними середовищами, кров'ю, мокротинням та іншим інфікованим матеріалом зібрати в банки і продезінфікувати в автоклаві (30 хв. при 1,5 атм.) або обробити дезінфікуючим розчином, прокип'ятити чи спалити.
9. Після заняття обов'язково помити руки та при необхідності продезінфікувати їх спиртом.
10. Забороняється викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.
11. При аварії під час роботи з вірусомісним матеріалом обов'язково попередити викладача або лаборанта.

Контрольні питання та контрольні завдання

1. На яких основних правилах базуються принципи організації вірусологічних лабораторій?
2. Охарактеризувати основні принципи організації вірусологічних лабораторій.
3. Які завдання вирішуються у вірусологічній лабораторії?
4. Принципи класифікації вірусів за ступенем біологічної небезпеки.

5. Яка роль вірусів у інфекційній патології людини та тварин?
6. Які причини та джерела внутрішньолабораторного зараження персоналу вірусологічних лабораторій?
7. Проаналізувати типи аварійних ситуацій, що призводять до лабораторного зараження.
8. Які категорії вірусологічних лабораторій створені для роботи з вірусами різного ступеня біологічної небезпеки?
9. Як і для чого здійснюється зонування вірусологічних лабораторій?
10. Дати характеристику базовій вірусологічній лабораторії.
11. Що таке дезінфекція? Як і для чого вона здійснюється?
12. В чому різниця між асептикою та антисептикою?
13. Дати порівняльну характеристику різним методам стерилізації.
14. Охарактеризувати основні правила роботи в базових вірусологічних лабораторіях.
15. Які особливості роботи в режимних вірусологічних лабораторіях?
16. Чим відрізняються умови роботи в лабораторіях особливого режиму?
17. Які основні вимоги ставляться до приміщення вірусологічної лабораторії та її оснащення?
18. Які особливості має обладнання вірусологічної лабораторії?
19. Які існують засоби індивідуального захисту для роботи у вірусологічних лабораторіях?

Заняття 19

Тема: Курячі ембріони та їх використання у вірусології

Мета заняття: Ознайомитись з різними методами культивування вірусів на курячих ембріонах. Відпрацювати методики ураження курячих ембріонів та культивування вірусів на них. Відпрацювати техніку відбору вірусомісного матеріалу з курячих ембріонів.

Матеріальне забезпечення: 9- та 11-денні курячі ембріони, овоскоп, непатогенний для людини вірус грипу, штативи для фіксації ембріонів, спирт йодований, пробірки, чашки Петрі, піпетки на 2-5 мл, стерилізатори із стерильними інструментами, (шприци на 1мл, пінцети анатомічні, голки ін'єкційні, ножиці), фізіологічний розчин,

дезінфікуючий розчин, маркери, таблиці зі схемою курячого ембріону та методами його ураження.

Зміст заняття: Ознайомитися з будовою курячого ембріону за таблицями. Підготувати курячий ембріон до ураження (овоскопування, визначення місця розміщення повітряної камери, великих кровоносних судин, тіла ембріону, обробка шкаралупи йодом). Підготувати шприци з вірусомісним препаратом для ін'єкцій. Уразити курячий ембріон непатогенним для людини вірусом грипу відкритим та закритим методами в хоріонантотроїсну оболонку, в алантотроїсну порожнину, амніотичну порожнину, в жовточний мішок та тіло ембріону. Провести розтин уражених курячих ембріонів. Отримати вірусомісний матеріал з органів інфікованих курячих ембріонів і декемулювати яйце.

Метод культивування вірусів на курячих ембріонах стали широко застосовувати після того, як Вудруфф та Гудпасчур в 1931р. описали зараження хоріонантотроїсної оболонки курячого ембріону вірусом курячої віспи. В 40-х роках з'явилося багато робіт по культивуванню різноманітних вірусів – віспи, вісповакцини, простого герпесу, лихоманки долини Ріфт, весняно-літнього енцефаліту, Омської геморагічної лихоманки та інших. Було відмічено, що існує деяка вибірковість у вірусів до тієї чи іншої тканини. Віруси віспи добре розмножувались на хоріонантотроїсній оболонці, вірус паротиту – в амніоні, вірус грипу – в амніоні та в алантотроїсній порожнині. Сьогодні майже в усіх вірусологічних лабораторіях проводять роботу на курячих ембріонах, тому що ця експериментальна модель зручно використовувати для:

- виявлення вірусу в патологічному матеріалі;
- первинного виділення вірусу;
- культивування, зберігання та накопичення вірусу в лабораторних умовах;
- титрування вірусів;
- як тест-об'єкт для реакції нейтралізації;
- визначення ефективності противірусних препаратів.

Будова курячого ембріону

Куряче яйце знаходиться в шкаралупі, через пори якої здійснюється газообмін. Під шкаралупою лежить підшкаралупна оболонка. У результаті запліднення в ході дроблення яйцеклітини утворюється три зародкових шари: ектодерма, мезодерма та ентодерма, з яких розвиваються тканини та органи ембріону. Разом з розвитком

плоду утворюються екстраембріональні оболонки амніон та хоріон (або серозна оболонка).

Амніон знаходиться безпосередньо біля зародку. Це мішок з рідиною, в якому розташоване тіло ембріону. Амніотична рідина на початку розвитку являє собою фізіологічний розчин солей, який надалі збагачується білком. Кількість амніотичної рідини на 10-11 день розвитку ембріону становить приблизно 1 мл.

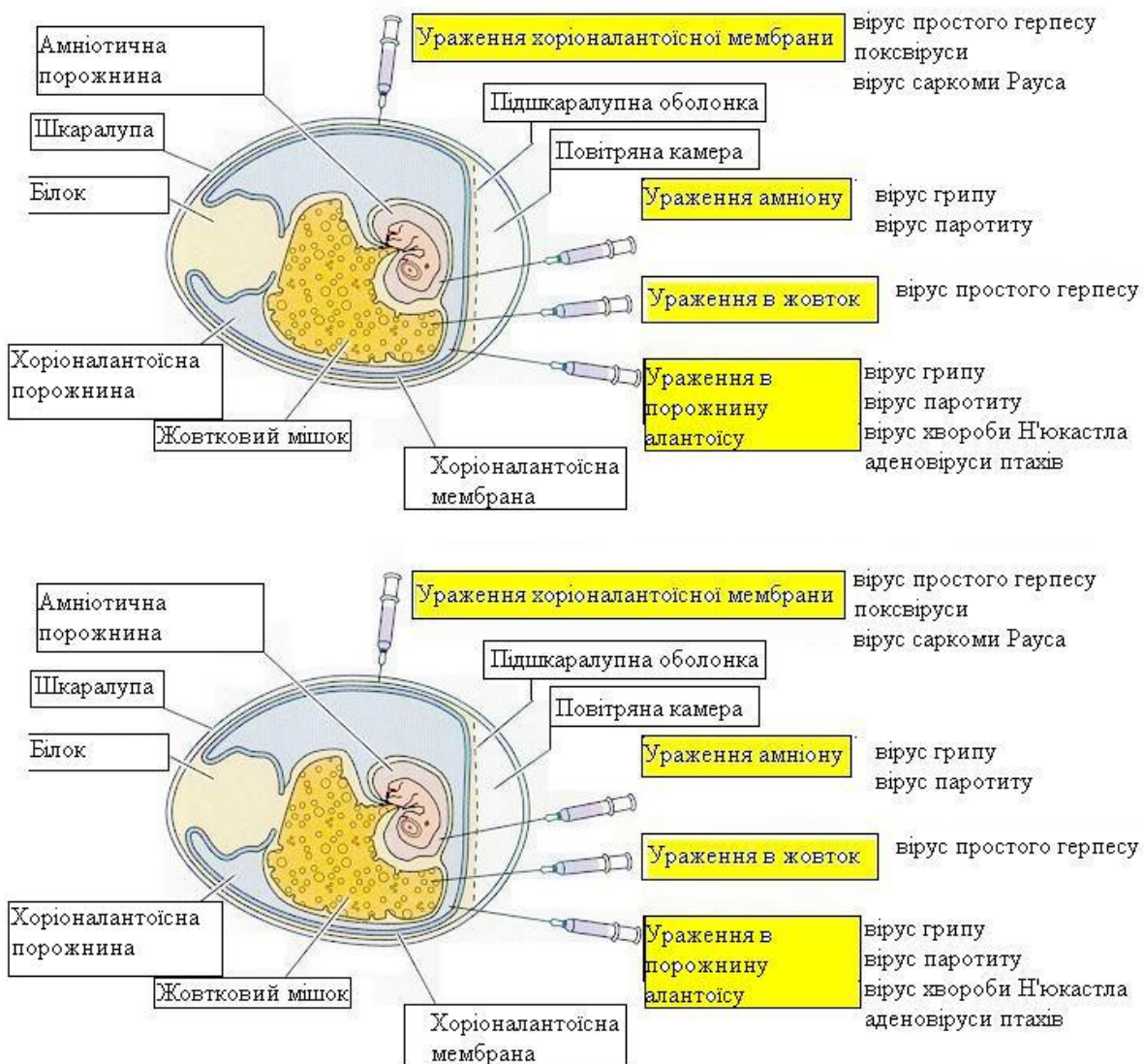


Рис. 15. Будова курячого ембріону та способи його ураження

Хоріон знаходиться безпосередньо під підшкаралупною оболонкою. На ранній стадії розвитку ембріону з нього утворюється виріст – алантоїс, що є порожнинним органом. У процесі розвитку алантоїс проходить між амніоном та хоріоном і оточує зародок разом з жовтком. Алантоїс розвивається дуже швидко, його максимальний ріст відбувається з 4-го по 13-й день розвитку. Оболонка алантоїсу частково зрощується з хоріоном, утворюючи хоріоантотісну оболонку (рис. 15).

Це орган дихання зародку, тут розміщені кровоносні та лімфатичні судини. В останні дні розвитку ембріону хоріонантотісна оболонка атрофується, повітря поступає через пори шкаралупи і курча починає дихати легенями.

Алантична порожнина – це орган виділення. На початку розвитку він заповнений прозорим фізіологічним розчином, а надалі збагачується уратами та речовинами, які містять азот та фосфор. З 12-13 дня розвитку рідина стає каламутною, а при охолодженні з неї випадає осад сечової кислоти. Кількість алантичної рідини досягає 6-8 мл на 11-13 день розвитку і поступово зменшується.

Ембріональні тканини з великою кількістю клітин, що швидко діляться, з високим обміном речовин є дуже сприятливим середовищем для культивування вірусів. Особливо це стосується оболонок ембріону, які багаті клітинами зародкового епітелію. Суттєву роль для розмноження вірусів відіграє жовткова оболонка, що оточує жовток. Він є органом живлення і під час розвитку поступово зменшується. У період з 5-го по 12-й день інкубації курячі ембріони можуть бути використані для ураження вірусами. Ураження в ту чи іншу частини ембріону проводяться в період її максимального розвитку, коли кількість чутливих клітин найбільша.

Підготовка курячих ембріонів до ураження.

Ембріони доставляють із інкубатора. У лабораторії ембріони інкубуються в термостаті при температурі 37⁰С і вологості 60-70 %. Ембріони розміщують повітряними камерами вверх у штативі. Підготовка курячих ембріонів до ураження включає овоскопування та дезінфекцію шкарлупи, а також відповідну підготовку робочого місця. При овоскопуванні на шкарлупі олівцем помічають: межі повітряної камери, місце розміщення зародка та ділянку безсудинної зони розміром 0,5x0,5 см. Ці відмітки служать орієнтиром при виборі місця введення вірусомісного матеріалу. Місця ін'єкції обробляють йодованим спиртом.

Методи експериментального ураження курячих ембріонів.

Існує кілька методів ураження ембріонів. Найбільш часто використовують ураження в алантичну порожнину та в хоріонантотісну оболонку, рідше – в амніотичну порожнину та жовтковий мішок і зовсім рідко – в тіло зародка та кровоносні судини хоріонантотісної оболонки. Вибір методу залежить від тропізму вірусу, а також цілі ураження. При будь-якому методі ураження вводять 0,1-0,2 мл інфекційного матеріалу.

Ураження в алантоїсну порожнину. При ураженні цим методом добре розмножуються віруси грипу, хвороби Ньюкасла, ринопневмонії коней, везикулярного стоматиту та інші. Існує кілька варіантів методу.

Ембріон фіксують вертикально тупим кінцем вверху. У шкаралупі на 5-6 мм вище межі повітряної камери роблять отвір діаметром 1 мм. Голку вводять паралельно повздовжній вісі на глибину 10-12 мм. Після ін'єкції вірусомісного матеріалу голку виймають, а отвір в шкаралупі закривають краплею розплавленого стерильного парафіну.

Інший варіант методу полягає в тому, що зроблений у шкаралупі отвір над повітряною камерою використовують лише для виходу частини повітря. Отвір для самого ураження роблять на ділянці безсудинної зони хоріоалантоїсної оболонки з боку зародка. Голку вводять на глибину 2-3 мм. Вводять вірусомісну рідину об'ємом 0,1-0,2 мл і закривають отвір парафіном.

Ураження в хоріоалантоїсну оболонку. Цей метод ураження курячих ембріонів використовують частіше для культивування епітеліотропних та пантропних вірусів: віспи, інфекційного ларинготрахеїту птахів, катаральної лихоманки овець та ін. Ураження може бути виконано через природну або через штучну повітряну камеру.

Для ураження через природну повітряну камеру ембріон розміщують в штативі вверху повітряною камерою і в шкаралупі проти неї вирізають віконце діаметром 15-20 мм. Через нього пінцетом знімають підшкаралупну оболонку, а на оголену ділянку хоріоалантоїсної оболонки (ХАО) наносять 0,2 мл вірусомісної суспензії, отвір закривають лейкопластирем або покривним склом, закріплюючи його парафіном.

Ураження через штучну повітряну камеру застосовують частіше, ніж через природну, тому що таке ураження забезпечує контакт вірусомісного матеріалу з більшою поверхнею ХАО і як наслідок веде до утворення більшої кількості вірусу. Для ураження ембріону цим методом його поміщають у штатив горизонтально зародком вверху. У шкаралупі роблять два отвори: один невеликий над центром повітряної камери (необхідний для відсмоктування повітря), а інший діаметром 0,2-0,5 см збоку, зі сторони зародка. Складність методу полягає в тому, що роблячи другий отвір, необхідно спочатку зняти шматочок шкаралупи, потім, не ушкоджуючи ХАО, зсунути підшкаралупну оболонку в сторону так, щоб через утворений отвір могло пройти повітря. Після цього гумовою грушею через перший отвір

відсмоктують повітря з природної повітряної камери. У результаті через боковий отвір повітря заходить в середину, утворюючи штучну повітряну камеру, дном якої є ХАО.

Через боковий отвір на поверхню ХАО наносять інфекційну рідину і отвір закривають лейкопластиром. Перший отвір немає необхідності закривати, так як внутрішній листок підшкаралупової оболонки при цьому методі ураження не порушується і продовжує виконувати роль бар'єру для мікрофлори оточуючого середовища. Подальша інкубація ембріонів, уражених цим методом, проводиться в горизонтальному положенні боковим отвором вверху.

Ураження в жовточний мішок. Цим методом користуються найчастіше при роботі з вірусами хвороби Марека, ринопневмонії коней, катаральної лихоманки овець. Уражають ембріони 5-7-денного, а інколи і 2-3 денного віку (вірус лихоманки долини Риф). Використовують два варіанти ураження.

Перший варіант. Ембріони поміщають у штатив вверху повітряною камерою, в шкаралупі над нею роблять розріз і вводять голку на глибину 3,5-4 см під кутом 45° до вертикальної осі в напрямку, протилежному місцю знаходження зародку.

Другий варіант. Ураження здійснюють на горизонтально закріпленому ембріоні, при цьому зародок знаходиться внизу, а жовток над ним. Отвір у шкаралупі закривають краплею розплавленого парафіну.

Ураження в амніотичну порожнину. Для цього методу ураження використовують ембріони 6-10 денного віку. Метод використовується при культивуванні вірусів грипу, н'юкаслської хвороби, ринопневмонії коней та ін. Є два способи ураження.

Закритий спосіб. Яйце поміщають на овоскоп в горизонтальному положенні зародком вверху. Через отвір в шкаралупі над повітряною камерою вводять голку з тупим кінцем в напрямку до зародку. Доказом того, що голка проникла в амніон, є рух тіла зародка в напрямку руху голки.

Відкритий спосіб. Шкаралупу над повітряною камерою зрізують так, щоб утворився отвір діаметром 1,5-2,5 см. Через нього пінцетом знімають підшкаралупну оболонку. Потім анатомічним пінцетом захоплюють ХАО і підтягують до отвору. Притримуючи лівою рукою пінцет з фіксованою в ньому оболонкою амніону, вводять вірусомісний матеріал. Потім оболонки відпускають, отвір закривають лейкопластиром і ембріон інкубують у вертикальному положенні.

Описані методи найбільш часто використовують в лабораторній практиці. Ураження в тіло зародку та судини ХАО застосовують рідко.

Ураження в тіло зародка. Для ураження використовують ембріони 7-12 денного віку. Відомо два варіанти.

Перший варіант. Уражують так, як і в амніон закритим способом, з тією різницею, що беруть гостру голку і на овоскопі показником попадання голки в тіло вважають підпорядкування зародка руху голки.

Другий варіант. Уражують так, як і в амніон відкритим способом: через отвір в шкаралупі підтягують пінцетом тіло зародка. Матеріал вводять в головний мозок чи певні частини тіла. При таких методах ураженнях буває значний процент загибелі ембріонів.

Описані технічні прийоми експериментального ураження курячих ембріонів мають різні варіанти. Уражені курячі ембріони поміщають до термостату для подальшої інкубації, в процесі якої проходить репродукція внесених вірусів та їх накопичення у відповідних структурах. Температура інкубації ембріонів варіює від 33 до 38⁰С в залежності від властивостей вірусу, яким було проведено ураження.

За ембріонами ведуть постійне спостереження, переглядають на овоскопі.

Загибель ембріонів в перші 24 год після ураження частіше обумовлена розмноженням грибів, бактеріальної мікрофлори, внесених в ембріон разом з інокулятом, або травмованих при ураженні. Ця загибель вважається неспецифічною. У більш пізні строки ембріони гинуть у результаті, як правило, розмноження вірусів.

При роботі з вірусом грипу слід пам'ятати, що найбільше накопичення досягається при зараженні розведеним вірусом. Масовані дози дають малий вихід вірусу за рахунок утворення дефектних інтерферуючих часток (феномен фон Магнуса) та іноді призводять до загибелі ембріону. Тому при серійних пасажах вірусу грипу, щоб отримати культуру з високим титром, використовують його розведення в межах 10⁻³ - 10⁻⁴.

Ембріони інкубують до моменту максимального накопичення вірусу. Для кожного вірусу і навіть для штаму цей термін є визначеним і варіює в межах від 2 до 7-8 діб. Потім ембріони охолоджують при 4⁰С протягом 3-4 годин і розтинають.

Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні.

Показником ураження ембріона вірусом є його загибель у характерні для даного вірусу терміни. Друга ознака розмноження вірусу

– патологоанатомічні зміни, що з'являються у різних структурах ембріону. Наприклад, ХАО може мати набряк, крововиливи, вузли. Такі зміни спостерігаються при ураженні курячих ембріонів вірусами віспи птахів, інфекційного ларинготрахеїту птахів, хвороби Ауески та іншими. Сам зародок при цьому може відставати у рості і розвитку, тобто з'являється феномен карликовості. Внутрішні органи також можуть мати ознаки розмноження вірусу. Наприклад, набрякла жовто-зеленого або темно-зеленого кольору печінка курячого ембріону є ознакою розмноження в ньому вірусу гепатиту гусей.

Зустрічаються такі віруси (наприклад, штам В1 вірусу н'юкаслської хвороби), які, розмножуючись у курячих ембріонах, не викликають ні їх загибелі, ні патологоанатомічних змін. Виявити такий вірус можливо за рахунок реакції гемаглютинації або імуноферментного аналізу.

Інколи при розтині ембріону не вдається виявити ознаки розмноження вірусу, хоча він і знаходиться у досліджуваному матеріалі. Такий пасаж називають “сліпим”.

Розтин курячого ембріону та отримання вірусомісного препарату.

Розтин курячих ембріонів здійснюють із дотриманням правил асептики. У залежності від тропізму вірусу, яким проводили ураження, вірусомісним матеріалом можуть бути ХАО, тканини зародку, жовтковий мішок, а також алантоїсна та амніотична рідини. Екстраембріональні (алантоїсна, амніотична) рідини є готовою суспензією вірусів.

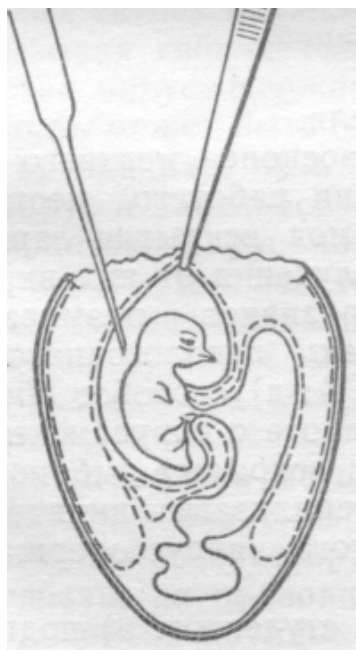


Рис. 16 Відбір амніотичної рідини (за Новіковим)

Амніотичну рідину об'ємом до 1мл відбирають, вводячи піпетку в амніон між головою та тілом зародка під його шиєю (рис. 16).

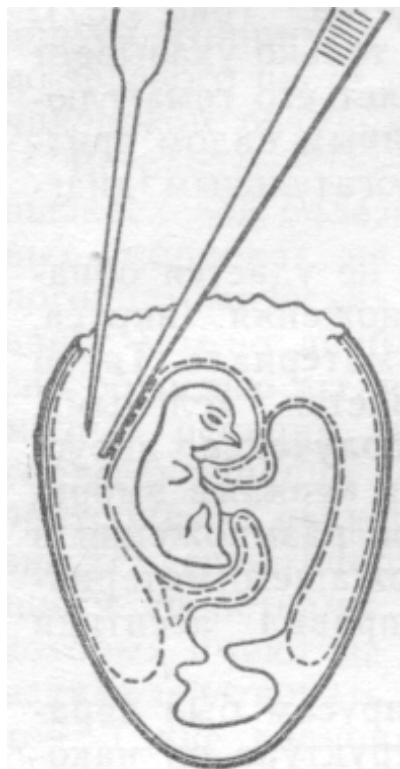


Рис. 17. Відбір алантоїсної рідини (за Новіковим та ін.)

Перед розтином шкаралупу ембріону обробляють йодованим спиртом. Розтин роблять стерильними інструментами в боксі. Шкаралупу зрізують над повітряною камерою (природною чи штучною), при цьому яйце тримають під нахилом, щоб шкаралупа не впала всередину. Ножиці не повинні торкатись і пошкоджувати оболонку, що знаходиться під повітряною камерою, для цього зріз повинен проходити вище межі повітряної камери. Алантоїсну рідину відбирають пастерівською піпеткою об'ємом до 10 мл, якою проколюють підшкаралупну оболонку і ХАО над тілом зародку (рис. 17).

Хоріоналантоїсну оболонку вилучають таким чином. Спочатку ножицями підрізують оболонку і обережно виймають ембріон разом із жовтковим міхуром та білком в чашку Петрі, отримуючи таким чином деембріоноване яйце. Саму оболонку відокремлюють від шкаралупи і кладуть в стерильну чашку.

Проводять макроскопічні дослідження. Найбільш характерні зміни спостерігають на оболонці у вигляді невеликих, округлої форми непрозорих вогнищ запалення, білуваті, перламутрові бляшки з некротичним центром.

Контрольні питання

1. Використання курячих ембріонів у вірусології. Мета використання.
2. Опишіть особливості анатомії та фізіології курячого ембріону.
3. Назвіть методи зараження курячих ембріонів. Від чого залежить вибраний метод зараження курячого ембріона?
4. Чим пояснюється той факт, що у вірусологічних експериментах використовуються ембріони різного віку?
5. У чому полягає методика отримання вірусомісного матеріалу із органів і тканин інфікованих курячих ембріонів?
6. Які ви знаєте типи патологічних змін в органах і тканинах курячих ембріонів при вірусних інфекціях? Приклади вірусів.

Заняття 20

Тема: Методи діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів. Серологічні методи досліджень

Мета заняття: Ознайомитись з різними методами діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів.

Матеріальне забезпечення: планшети з округлими виямками, піпетки, гумові груші, дезрозчин, вірусомісний матеріал, сироватка, фізіологічний розчин, пробірки, маркер.

Зміст заняття: Ознайомлення з методами діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів: реакцією гемаглютинації, серологічними методами дослідження, імунодифузійними тестами, радіоімунологічним аналізом, імуофлуоресцентним та імуоферментним аналізом.

Реакція гемаглютинації. Можливість використовувати еритроцити різноманітних тварин як індикатори, що дозволяють виявляти різні антигени або антитіла, була продемонстрована в 1902 р., коли Р. Крауз та Д. Людвіг вперше показали здатність стафілококів і вібріонів викликати аглютинацію еритроцитів. Г. Херст в 1941 р. помітив, що при розтині заражених грипом ембріонів кров, яка витікала з пошкоджених судин, при змішуванні з вірусомісною алантоїсною рідиною збиралась в конгломерати з червоних кров'яних тілець.

Пізніше було показано, що багато вірусів мають гемаглютинуючі властивості, наприклад, ортоміксовіруси, параміксовіруси, рабдовіруси, поксвіруси, реовіруси, аденовіруси та інші; крім того, було виявлено,

що віруси аглютинують не тільки еритроцити курей, але й інших видів птахів та ссавців (курчат, качок, голубів, чайок, морських свинок, собак, людини), завдяки чому цей метод почав широко використовуватись для ідентифікації вірусів.

Принцип реакції гемаглютинації полягає в тому, що аглютинація відбувається за рахунок адсорбції вірусних часток на поверхневих рецепторах еритроцитів різноманітних видів тварин (без участі в реакції специфічних антисироваток). Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – гліко-, та ліпопротеїди суперкапсиду), які дістали назву гемаглютининів, з поверхневими білками еритроцитів (глікопротеїнами). В результаті такої адсорбції еритроцити склеюються один з одним, що призводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи в'язки планшету тонкою плівкою у вигляді перевернутої парасольки (повна аглютинація). Якщо ж реакція не відбулась, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом. Взаємозв'язок між вірусом та еритроцитами є зворотним і може наступити фаза елюції (звільнення) вірусу за допомогою вірусного ферменту нейрамінідази, яка дисоціює утворені зв'язки. Швидкість елюції залежить від ряду факторів: концентрації солей в розчині, температури, рН середовища. Здатність вірусу елюювати з еритроцитів часто використовують при роботі з вірусом грипу для його очистки та концентрації.

Реакція гемаглютинації (РГА) широко застосовується у вірусологічній практиці як швидкий, технічно простий, дешевий та достатньо надійний метод виявлення гемаглютинуючих вірусів в досліджуваному матеріалі, а також для титрування вірусів. Умови постановки реакції гемаглютинації залежать від багатьох чинників. Різні типи вірусів, а іноді і штами одного й того ж вірусу відрізняються чутливістю до спектру еритроцитів (гемаглютинуючих видів). Наприклад, до вірусу грипу найбільш чутливі еритроцити курей, людини (0 – групи), морських свинок; до вірусів енцефаліту – еритроцити гусей; до вірусу кору – еритроцити мавп; фітовіруси активно аглютинують баранячі еритроцити. Таку видову приналежність еритроцитів часто використовують для індикації вірусів. У лабораторній діагностиці найчастіше використовують еритроцити птахів, а не ссавців, бо вони швидше аглютинуються і дають чіткий результат. Інтенсивність реакції залежить від температури та виду вірусу. Наприклад, для вірусів грипу та паротиту інтенсивність РГА

найбільша при 4–22⁰С, для вірусу поліоми – 4⁰С РГА, як правило, ставлять в ізотонічних розчинах з рН в межах 6,0-9,0 (наприклад, 0,85 % NaCl). В кислому та лужному середовищах відбувається швидка інактивація гемаглютинуючих властивостей вірусу.

Для реакції використовують завис еритроцитів від 0,25 до 3 %, але найбільш оптимальною є 0,5-1,5 %. Для її приготування свіжоотриману кров дефібринують механічно (за допомогою стерильних намистин), або використовуючи антикоагулянти (2,5–5 % розчин цитрату натрію, гепарину). Дефібриновану кров тричі відмивають центрифугуванням у фізіологічному розчині при 1000-1500 об/хв, а з осаду готують необхідну концентрацію еритроцитів. Зберігаються вони в холодильнику приблизно тиждень. В разі потреби можна використати формалінізовані еритроцити.

Постановка реакції складається з приготування двократних розведень вірусу на фізіологічному розчині і додавання до кожного розведення рівного об'єму зависі еритроцитів. В контролі замість розведення вірусу використовують фізіологічний розчин. Планшет струшують і залишають при певній температурі. Після визначеного часу експозиції враховують результати. За позитивний результат приймають аглютинацію еритроцитів, тобто вони вільно розміщені по дну виймки, а за негативний – компактне осідання еритроцитів у вигляді диска на дно виймки (рис. 18).

Позитивну реакцію оцінюють плюсами від одного до трьох відповідно, за інтенсивністю аглютинації. Те найбільше розведення вірусомісного матеріалу, з яким аглютинація оцінюється не менше, як на два плюси (воно відповідає приблизно 50 % аглютинованих еритроцитів), містить 1 гемаглютинуючу одиницю (1 ГАО). 1 ГАО \approx 105 БУО (бляшкоутворюючих одиниць) \approx 10⁷ фізичних часток, що виявляються за допомогою електронного мікроскопу.

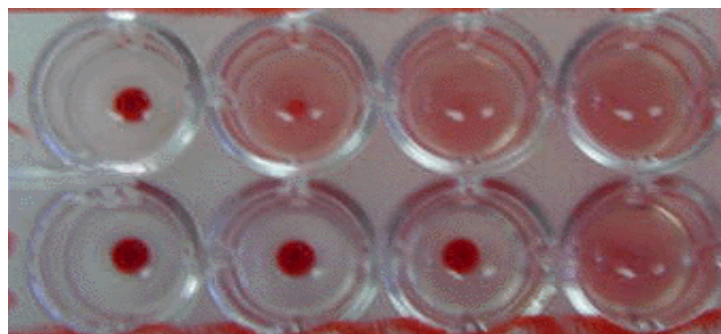


Рис. 18. Врахування результатів реакції гемаглютинації

Імунологічні методи дослідження. Від самого початку досліджень вірусних хвороб постала актуальна проблема їх розпізнавання й діагностики, оскільки були відсутні швидкі та надійні методи. Візуальне спостереження зовнішніх симптомів широко застосовувалось, так як прояв симптомів залежить головним чином від взаємодії вірусу і організму. Але на характер прояву симптомів впливають різноманітні фактори, що ускладнює діагностику. Саме тому було розроблено методи виявлення та використання антитіл (імуноглобулінів) для розпізнавання антигенів, тобто серологічні реакції. Ці методи досліджень, засновані на виявленні антигенної специфічності вірусів, не залежать від взаємовідносин вірусу та організму. Завдяки специфічності антитіла реагують тільки з тими антигенними детермінантами вірусного білку, у відповідь на введення якого вони утворились, або з вірусами, що подібні за антигенною структурою. При контакті специфічних антитіл з антигеном між амінокислотними залишками антигензв'язуючого центру і епітопом антигену утворюються багаточисельні нековалентні зв'язки. В порівнянні з ковалентними зв'язками сили нековалентної міжмолекулярної взаємодії (водневі зв'язки, електростатичні, ван-дер-ваальсові та гідрофобні взаємодії) досить слабкі, однак при великій кількості слабких взаємодій сумарна енергія зв'язування стає значною.

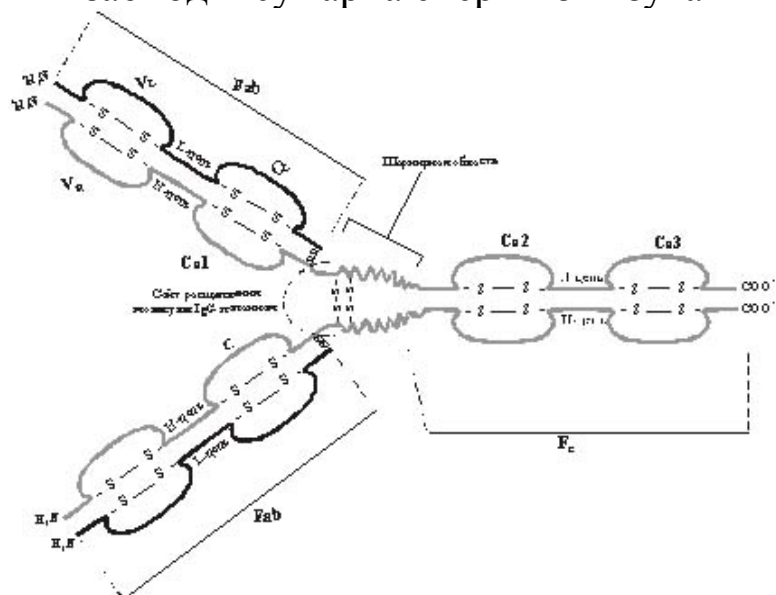


Рис. 19. Структура імуноглобуліну класу G:

Fab-область - варіабельна область молекули імуноглобуліну;

Fc-область – константна область молекули імуноглобуліну.

Основна структурна одиниця імуноглобуліну будь-якого класу складається з двох однакових легких і двох однакових важких поліпептидних ланцюгів, що утримуються разом дисульфідними

зв'язками (рис. 19). Від типу важких ланцюгів залежить приналежність молекули імуноглобуліну до того чи іншого класу і підкласу. Так у людини чотири підкласи IgG (IgG 1, IgG 2, IgG 3 та IgG 4). Відомі також два підкласи IgA (IgA 1 та IgA 2), але підкласів IgM, IgD та IgE людини не виявлено.

Переваги серологічних методів – швидкість отримання результатів діагностики в поєднанні з високою специфічністю.

Чутливість серологічних реакцій – це найменша кількість вірусних часток в одиниці об'єму зразка, яку даний метод може виявити. Чутливість (кількісний показник) оцінюється на модельних об'єктах – очищених препаратах вірусів, соку штучно заражених рослин, мазках-відбитках різних органів та деяких інших.

Чутливість та специфічність імунологічних тестів – це основні критерії, за якими оцінюється доцільність їх використання.

Підбір відповідного методу і вибір оптимальних умов для протікання реакції антиген-антитіло – одна з важливих задач, яку ставить перед собою спеціаліст.

Реакція гальмування (затримки) гемаглютинації (РГГА або РЗГА). Принцип реакції РГГА полягає в тому, що блокований антитілами вірус не може аглютинувати еритроцити. Переваги РГГА – специфічність, простота техніки, швидкість, він не потребує стерильності. Недоліки - реакція можлива тільки з гемаглютинуючими вірусами. Всі сироватки, досліджувані в РГГА, перед роботою прогривають при 56–60 °С протягом 30 хв для видалення неспецифічних інгібіторів. Для РГГА використовують еритроцити тих видів, що і для РГА.

Постановку реакції проводять в два етапи. На першому етапі готують робочу дозу антигену (для вірусу грипу – 4 ГАО), перевіряють її правильність за допомогою РГА. Ця процедура необхідна і тому, що чим нижчий титр вірусу, взятого для РГА, тим менші концентрації антитіл він виявляє. Титр в 4 ГАО є найнижчим, що дозволяє отримувати достовірну гемаглютинацію, а оскільки в процесі реакції вірус ще двічі розводять, то кількість віріонів буде такою, яка є необхідною для аглютинації всіх 100 % еритроцитів.

Другий етап – готують серію розведень сироватки в однакових об'ємах в виїмках планшети (від 1:10 до 1:1280). На точність виявлення титру антитіл впливає кратність розведень сироватки. До кожного розведення сироватки додають рівний об'єм вірусу в титрі 4 ГАО. Суміш витримують певний час при визначеній температурі. В кожную

виямку з АГ та АТ додають рівний об'єм 1 % зависі еритроцитів. Отже, в пробірці змішують рівні об'єми сироватки крові та суспензії вірусу і після експозиції визначають, чи зберігся в суміші вірус шляхом додавання суспензії еритроцитів. Аглотинація еритроцитів вказує на наявність, а відсутність гемаглютинації – на відсутність вірусу в суміші. Відсутність вільного вірусу в суміші вірус + сироватка розцінюється як ознака взаємодії антитіл сироватки і вірусу. Іншими словами, якщо в сироватці є специфічні антитіла, то вірус втрачає здатність аглютинувати еритроцити і аглютинація відсутня.

Титром антитіл вважають те найбільше розведення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації.

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА). Суть реакції непрямой аглютинації в тому, що еритроцити з попередньо адсорбованими антигенами здатні аглютинуватись в присутності гомологічних сироваток (АТ). Еритроцити виконують роль носія зі специфічними детермінантами і склеювання їх відбувається в результаті взаємодії антиген-антитіло та реєструється візуально за характером утворюваного осаду. РНГА дуже чутлива реакція, за її допомогою можна виявити 0,01 мг/мл АГ, а за специфічністю вона наближується до ІФА.

Існує дві модифікації РНГА: 1) адсорбція антигену на поверхні еритроцитів; 2) адсорбція антитіл на поверхні еритроцитів з наступною аглютинацією в присутності гомологічного вірусу.

Облік результатів проводять після осадження еритроцитів в контрольних виямках. За позитивний результат приймають аглютинацію еритроцитів (вони вільно розміщені по дну виямки); за негативний – компактне осідання еритроцитів у вигляді диска на дно виямки.

За титр антитіл в сироватці приймають найбільше її розведення, що викликає аглютинацію сенсibilізованих еритроцитів.

Реакція зв'язування комплементу (РЗК). Принцип реакції полягає у взаємодії між антигеном і антитілом в присутності комплементу. Індикатором на наявність чи відсутність комплементу у вільному стані в досліджуваній суміші антиген-антитіло є гемолітична система, гемоліз якої не відбувається при відсутності комплементу. Якщо в даній системі антиген з'єднується з специфічним антитілом, то комплемент адсорбується цим комплексом і спостерігається затримання гемолізу. У випадку невідповідності антигену та антитіл комплемент включається в реакцію між гемолітичною сироваткою і чутливими

еритроцитами, в результаті чого спостерігається гемоліз різної інтенсивності до повного лізису еритроцитів. Таким чином, відсутність лізису означає позитивну реакцію, в той час як повний гемоліз вказує на відсутність в досліджуваній сироватці антитіл до даного антигену.

Як і всі серологічні реакції, РЗК дає оптимальний результат при використанні певних співвідношень компонентів, тому перед постановкою основного дослідження необхідно визначити робочі дози основних компонентів реакції, які встановлюються за фактом гемолізу в розведеннях кожного компонента в присутності індикаторної системи.

Реакція нейтралізації (РН). Принцип реакції нейтралізації полягає в тому, що в пробірці поєднують рівні об'єми сироватки крові та суспензії вірусу і після витримки визначають, чи зберігся в суміші активний вірус. Проводять це шляхом зараження сумішшю чутливої до даного вірусу живої системи (біопроба на тест-об'єктах). Відсутність дії вірусу на тест-об'єкт при позитивному контролі розцінюють як свідчення нейтралізації біологічної активності вірусу антитілами сироватки і, відповідно, гомологічності антитіл сироватки і антигенів вірусу. При цьому чим більше в сироватці антитіл до взятого вірусу, тим в більш високому розведенні вона ще здатна нейтралізувати певну (стандартну) дозу вірусу. У випадку позитивної біопробы вважають, що нейтралізація вірусу не відбулась, так як сироватка не містить антитіл до взятого вірусу. РН ставлять в двох варіантах: 1) змішують рівні об'єми різних розведень сироватки з постійною дозою вірусу; 2) з'єднують рівні об'єми одного й того ж розведення сироватки (або нерозведену сироватку) із зростаючими дозами вірусу.

Імунодифузійні тести. Термін „преципітація”, як правило, використовується для визначення реакції взаємодії між розчиненими антигенами і специфічними антитілами. Результат цієї взаємодії – преципітат помітний не озброєним оком. Цю реакцію відкрив Р. Крауз в 1897 р. при вивченні бактеріальних захворювань. З того часу вона широко застосовується при діагностиці бактеріальних і вірусних захворювань, особливо фітовірусних інфекцій. Реакція характеризується високою чутливістю (можна виявити 0,3-0,5 мкг білка), простотою, її можна виконувати як в лабораторії, так і польових умовах.

Принцип реакції преципітації полягає в утворенні комплексів антиген-антитіло у вигляді решітки. Один з варіантів з'єднання: молекули антигена являються вузлами решітки, а молекули антитіл –

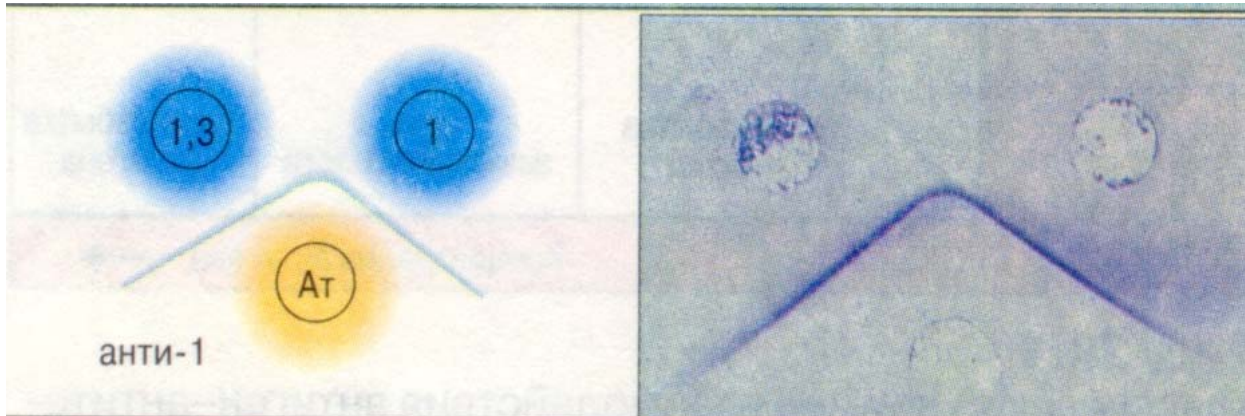
зв'язуючими ланцюгами. Оскільки антигени полівалентні, кожна вірусна частка здатна зв'язуватися з антитілами, що несуть два активних центри ідентичної специфічності, утворюючи структуру решітки. З'єднання відбувається за рахунок притягання полярних груп антигенних детермінант і активного центру. Протяжність утвореної решітки залежить від відносних концентрацій реагентів. Видимий преципітат утворюється лише у випадку, коли в розчині міститься велика кількість антигена. Мінімальна кількість вірусу, необхідна для утворення видимого преципітата – 0,1-1,0 мкг. Утворення специфічного осаду може гальмуватися надлишком антигену (вірусу) або антисироватки, тому необхідно проводити їх серійне розведення. Співвідношення реагентів, яке дає швидку преципітацію, називається оптимальним співвідношенням. Для кожного вірусу та антисироватки існує межове розведення, далі якого преципітація не спостерігається.

Досить розповсюдженою з імунодифузійних тестів є реакція кільцепреципітації. Її використовують для визначення титру антисироватки або антигену. Для цього роблять розведення одного з компонентів реакції (антигену або антитіла) та обережно нашаровують інший компонент в певній концентрації. В результаті реакції на межі двох фаз утворюється кільце преципітації, звичайно, при умові специфічності антигену і антитіла. Останнє розведення антигену, при якому ще утворюється кільце преципітації, вважають титром сироватки, і навпаки, останнє розведення сироватки – титром антигену. Реакція супроводжується двома контролями – в кожному один з компонентів замінюється фізіологічним розчином.

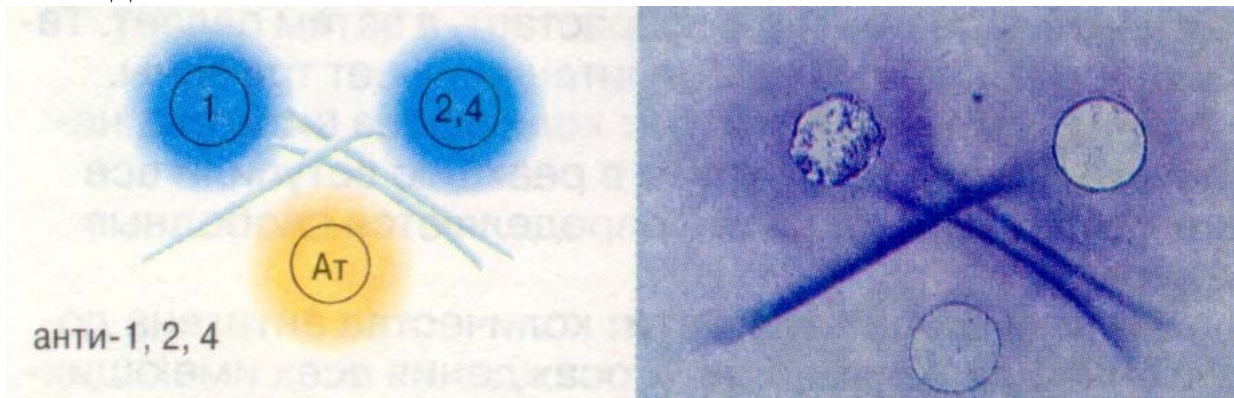
Розвиток методів імунодифузії став можливий завдяки використанню гелевих носіїв. Перенесення реакції преципітації між антигеном і антитілом із рідкого середовища (кільцепреципітація, преципітація в пробірках) в гель дозволило досліджувати індивідуально кожну пару антиген-антитіло, так як антиген дифундує назустріч гомологічним антитілам з певною швидкістю. Отже, реакції засновані на здатності до дифузії в гелях антитіл та розчинених антигенів і відсутності такої здатності у комплексу антиген + антитіло, який утворюється при контакті дифундуючих назустріч один одному гомологічних антигену та антитіла. Комплекс антиген + антитіло осаджується в тій ділянці, де співвідношення A_g і A_t є оптимальним, в результаті утворюються смуги преципітації у вигляді мутно-білих ліній в гелі.

Тести, основані на імунодифузії, пов'язані з розділенням суміші антигену та антитіл за розміром часток, коефіцієнтом дифузії і концентраціями реагентів. Ці методи дозволяють одночасно визначати специфічність антисироваток, ступінь антигенної спорідненості між досліджуваними вірусами (рис. 20) та їх штамми, вести контроль за чистотою моно специфічних сироваток і антигенів та т.д.

1. Ідентичні епітопи



2. Неідентичні антигени



3. Частково ідентичні епітопи

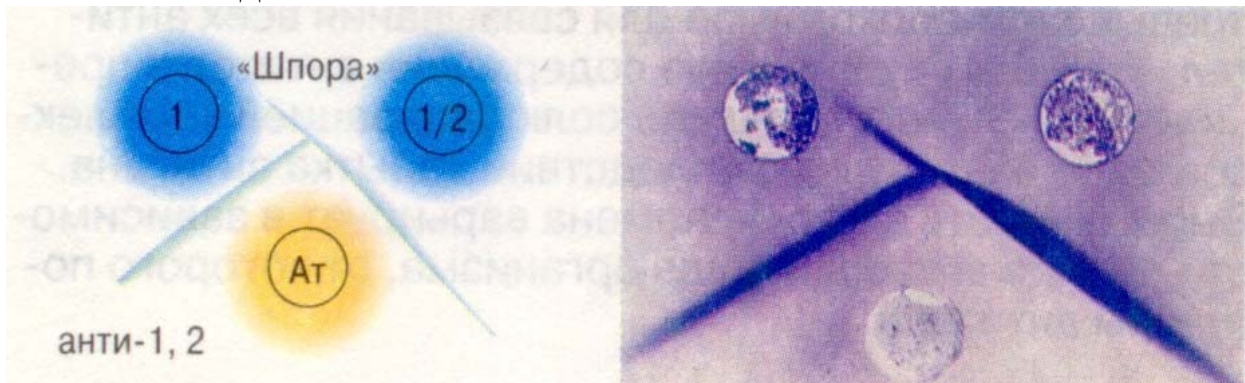


Рис. 20. Реакція преципітації в гелі: подвійна імунодифузія.

Радіоімунологічний аналіз (RIA). В 1959 р. Р. Ялоу і С. Берсон розробили кількісний імунологічний метод виявлення інсуліну в плазмі людини з використанням інсуліну, міченого радіоактивним ізотопом йоду (J^{151}). Використання радіоактивних ізотопів в поєднанні з

імунохімічними методами досліджень дозволяє реалізувати виключну вибірковість останніх для мінімальних кількостей біополімерів. Особлива перевага радіоімунологічного аналізу – висока чутливість. З його допомогою вдається виявити нанограмові (10^{-9}), а іноді і пікограмові (10^{-10}) рівні антитіл та вірусів. В РІА поєднується специфічність, властива реакціям антиген-антитіло, з чутливістю, яку дає використання радіоактивної мітки.

Радіоімунологічний аналіз базується на законі дії мас, за яким речовина, що визначається, буде конкурувати зі своїм міченим аналогом (антигеном) за обмежену кількість зв'язуючих місць антитіла до досягнення хімічної рівноваги всіх компонентів реакційної суміші.

Мічений антиген зв'язується зі специфічним антитілом з утворенням міченого комплексу антиген-антитіло. При проведенні РІА проявляється здатність неміченого антигену дослідного матеріалу конкурувати за активні центри антитіл, пригнічуючи зв'язування міченого антигену. Як результат конкурентного пригнічення відношення зв'язаного з антитілом антигену довільного міченого антигену зменшується при збільшенні концентрації неміченого антигену. Іншими словами, метод базується на здатності антитіл зв'язуватися з міченим радіоактивним ізотопом антигеном та на конкурентному пригніченні цієї реакції неміченим антигеном. Потім, коли цей антиген відділяється від незв'язаного, вимірюється радіоактивність однієї або обох фракцій.

Мітять препарати антигенів як правило радіоактивним ^{125}J .

Останнім часом РІА використовується все рідше, оскільки пов'язаний з застосуванням радіоактивних ізотопів.

Імунофлуоресцентний аналіз (ІФ) або метод флуоресцюючих антитіл, з'явився на початку 40-х років ХХ ст., коли А. Кунс з співробітниками використали здатність до флуоресценції одного з флюорохромів, кон'югували з ним антитіла і показали наявність збудника інфекції в тканинах. З того часу метод отримав значний розвиток і почав використовуватись в різних областях науки.

Особливість цього методу полягає в тому, що імунний комплекс стає видимим в люмінесцентному мікроскопі у випадку, якщо імуноглобулін кон'югується флюорохромом (флуоресцеїном, родаміном та ін.). В результаті ковалентного зв'язку антитіла з флуоресциюючим барвником утворюється нова сполука – флуоресциюючі антитіла. При цьому антитіла зберігають свою основну

властивість – специфічність, а флюорохром – здатність до випромінювання світла.

Перевага імуофлюоресцентного аналізу в порівнянні з іншими методами полягає в дослідженні внутрішньоклітинної локалізації антигену.

Розроблені декілька варіантів реакції імуофлюоресценції: прямий, непрямий, сендвіч-метод, модифікація непрямого методу з використанням комплементу та інші (рис. 21).

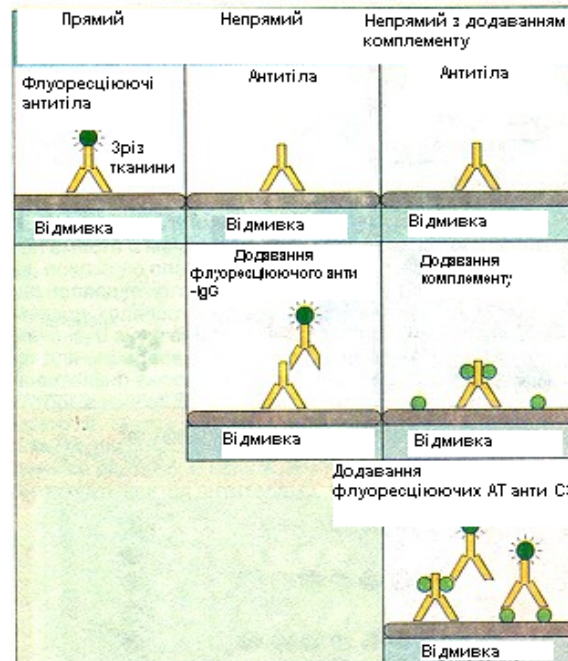


Рис. 21. Порівняння різних модифікацій імуофлюоресцентного аналізу.

Імуоферментний аналіз. Початком використання імуоферментних методик у вірусологічних дослідженнях вважають появу перших повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі до імуноглобулінів. Зусилля дослідників сконцентрувались на розробці методів кількісного імуохімічного аналізу, заснованого на використанні антигенів (Аг) та антитіл (Ат), мічених ферментами. На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імуохімічний підходи, що призвело до створення імуоферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імуохімічної реакції, з допомогою якого візуалізується утворення комплексів.

Методи ІФА розділяються на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. В світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*, що означає дослівно “фермент зв’язаний імуосорбентний аналіз”). В цьому методі

використовується принцип імобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носії. Гомогенні методи аналізу (“ЕМІ”, *enzyme multiplay immunotechnic*) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. Суть цих методів полягає в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула фермент втрачає свою каталітичну активність.

Широко ввійшов в практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістирола.

ІФА дуже зручний, оскільки антигеном у фітовірусології в імуносорбентному тесті може бути свіжий сік рослин, очищені вірусні препарати, гомогенат із насіння або з комах-переносників. Одна з важливих переваг ІФА – висока чутливість, яка досягається, як правило, за рахунок ферментного кон'югату, збільшення періоду інкубації, особливо на стадії ферментативної реакції, і здійснення такої послідовності етапів, при якій антиген зв'язується з імобілізованими на носії антитілами, а потім взаємодіє з доданими на останній стадії кон'югованими антитілами.

За чутливість методу ІФА приймається та концентрація антигену (або розведення екстракту рослин, що аналізується), при якому величина оптичної густини продукту ферментативної реакції на 0,2 оптичні одиниці перевищує величину оптичної густини в контрольних виїмках.

Контрольні питання

1. Який механізм РГА?
2. Назвіть фактори, що впливають на ефективність РГА.
3. Що таке титр вірусу в РГА?
4. В чому принцип визначення титру вірусу в ГАО?
5. В чому принцип реакції кільце преципітації і які задачі дозволяє вирішувати ця реакція?

Рекомендована література

1. Харченко С. М. Мікробіологія : підручник / С. М. Харченко. – К. : Сільгоспосвіта, 1994. – 352 с.
2. Асонов Н. Р. Практикум по микробиологии / Н. Р. Асонов. – М. : Агропромиздат, 1988. – 155 с.
3. Асонов Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М. : Агропромиздат, 1989. – 351 с.
4. Посібник з медичної вірусології / під ред. В. М. Гиріна. – К. : Здоров'я, 1995. – 367 с.
5. Практикум із загальної вірусології / за ред. А. Л. Бойка – К. : Видавничий центр «Київський університет», 2000. – 269 с.
6. Костенко Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко, Е. И. Скаршевская, С. С. Гительсон. – М. : Агропромиздат, 1989. – 272 с.
7. Ветеринарна мікробіологія та імунологія / А. В. Демченко, В. О. Бортнійчук, В. Г. Скубицький, В. М. Апатенко. – К. : Урожай, 1996. – 368 с.
8. Ветеринарная микробиология и иммунология / [Н. А. Радчук, Г. В. Дунаев, Н. М. Количев и др.] ; под. ред. Н. А. Радчука. – М. : Агропромиздат, 1991. – 383 с.
9. Ветеринарная микробиология / [П. А. Емельяненко, Г. В. Дунаев, Д. Г. Кудлай и др.]; – М. : Колос, 1982. – 304 с.
10. Ветеринарное законодательство Т.3 / под ред. А. Д. Третьякова. – М. : Колос, 1981. – 640 с.

Навчальне видання

ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ і ВІРУСОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладачі: **Кот Стах Петрович**
Кириченко Віктор Анатолійович

Формат 60x841/16 Ум. друк. арк. 4,8

Тираж 30 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №4490 від 20.02.2013 р.