

**МАРАТ ОСПАНОВ АТЫНДАҒЫ БАТЫС-ҚАЗАҚСТАН
МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ**



Курмангалиева С.С., Зевалкина Е.В., Сарбулатова А.Ш., Жанаманова Р.Н.

**МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ ЖӘНЕ
ИММУНОЛОГИЯ
ПӘНІ БОЙЫНША
ЗЕРТХАНАЛЫҚ САБАҚТАРҒА АРНАЛҒАН ОҚУ ҚҰРАЛЫ
(Оқу құралы)**

Ақтобе, 2023

УДК 587+579+612.017(075.8)

ББК 28.073+28.3+28.4я73

К 93

Құрманғалиева С.С., Зевалкина Е. В., Сарбулатова А.Ш, Жанаманова Р.Н. Микробиология, вирусология және иммунология пәні бойынша зертханалық сабақтарға арналған оқу құралы: Оқу құралы/– Ақтөбе, 2023, 217б.

Авторлар:

Құрманғалиева С.С. – м.ғ.к., КеАҚ "Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медициналық университеті" микробиология, вирусология және иммунология кафедрасының жетекшісі
Зевалкина Е. В. - КеАҚ "Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медициналық университеті"КЕАҚ микробиология, вирусология және иммунология кафедрасының оқытушысы
Сарбулатова А.Ш. – магистр, КеАҚ "Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медициналық университеті"КЕАҚ микробиология, вирусология және иммунология кафедрасының аға оқытушысы
Жанаманова Р.Н. – магистр, КеАҚ "Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медициналық университеті"КЕАҚ микробиология, вирусология және иммунология кафедрасының аға оқытушысы

Рецензенттер:

Рахимжанова Ф.С. - м.ғ.к., доцент, КеАҚ «Медициналық Семей университеті» микробиология кафедрасының жетекшісі

Уразаева С.Т. – м.ғ.к., доцент, КеАҚ «Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медицина университеті» эпидемиология кафедрасының жетекшісі

Оқу құралы оқу бағдарламасына сәйкес әзірленген және екі бөлімнен тұрады: жалпы микробиология иммунология негіздерімен, жеке бактериология вирусологиямен және бірінші бөлім бойынша 21 зертханалық жұмыс және екінші бөлім бойынша 16 зертханалық жұмыс.

Нұсқаулықтың мақсаты – медицина студенттеріне болашақ дәрігерлерге диагноз қою үшін зерттеу әдістерін дұрыс таңдауға және нәтижелерді дұрыс түсіндіруге мүмкіндік беретін микробиологиялық зерттеу дағдыларын үйрету. Нұсқаулық суреттер мен сызбалармен суреттелген.

Ғылыми кеңес мәжілісінде бекітілген

«25» қаңтар 2024 ж.

Хаттама № 5 (812)

© Курманғалиева С.С., Зевалкина Е.В.,
Сарбулатова А.Ш., Жанаманова Р.Н. 2023

Қысқартулар, шартты белгілер, символдар тізбесі

БҚП - Бактерияға қарсы препараттар

АГ- антиген

АД - антидене

ІТТБ - ішек таяшасы тобының бактериялары

ДДӘ - дискодифузиялық әдіс

СТА - саруызды-тұзды агар

АІЖ – асқазан-ішек жолдары

ЖЖБА - жыныстық жолмен берілетін инфекциялар
 ИФТ - иммуноферменттік талдау
 ЛПС - липополисахарид
 ДЗ - дәрілік заттар
 ЕПА-ет пептонды агар
 ЕПС- ет-пептон сорпасы
 МТК - минималды тежеуші концентрация
 ФАӨ - флюоресцентті антиденелер әдісі
 ЖРВИ - жедел респираторлық вирустық инфекция
 ПТР - полимеразды тізбекті реакция
 АР - агглютинация реакциясы
 ГАР - гемагглютинация реакциясы
 ИФР - иммунофлуоресценция реакциясы
 БР - бейтараптандыру реакциясы
 ЖГАР - жанама гемагглютинация реакциясы
 КБР - комплементті байланыстыру реакциясы
 ЖИТС - жүре пайда болған иммун тапшылығы синдромы
 ХТП - химиотерапиялық препараттар
 ЦМ - цитоплазмалық мембрана
 DCL - абсолютті өлім дозасы
 DIM - минималды өлім дозасы
 LD50-жартылай өлімге әкелетін доза

Мазмұны

Қысқартулар, шартты белгілер, символдар тізбесі	3
Кіріспе	6
Микробиологиялық зертханада жұмыс істеу кезіндегі қауіпсіздік техникасы қағидалары	7
1. Жалпы микробиология иммунология негіздерімен	9
1.1 № 1 зертханалық жұмыс. Бактериялардың морфологиялық және тинкториалдық қасиеттерін зерттеу. Қарапайым бояу әдістері	9
1.2 № 2 зертханалық жұмыс. Күрделі бояудың әдістері: Грам, Пешков	13
1.3 № 3 Зертханалық жұмыс. Циль-Нильсен әдісі бойынша қышқылға төзімді бактерияларды анықтау	19
1.4 № 4 зертханалық жұмыс. Бактерияларды тірі күйде зерттеу: "езілген" тамшы микропрепаратын дайындау	22
1.5 №5 зертханалық жұмыс. Қатты және сұйық қоректік ортадағы бактериялардың дақылдық қасиеттерін зерттеу	24
1.6 № 6 зертханалық жұмыс. Аэробты бактериялардың таза дақылын бөліп алу және анықтау	32
1.7 №7 зертханалық жұмыс. Анаэробтардың таза дақылын бөліп алу	46
1.8 №8 зертханалық жұмыс. Гемагглютинация реакциясы арқылы тауық эмбрионындағы вирустың көрсеткішін анықтау	54
1.9 №9 зертханалық жұмыс. Фаг трансдукциясы бойынша тәжірибе	59
1.10 № 10 зертханалық жұмыс. Тіс жұғындысын микроскопиялық зерттеу	63

1.11 № 11 зертханалық жұмыс. Седиментациялық әдіспен ауаның жалпы микробтық санын (ЖМС) анықтау	68
1.12 № 12 зертханалық жұмыс. Айран микрофлорасы	74
1.13 № 13 зертханалық жұмыс. Температураның бактериялардың вегетативті және споралы түрлеріне әсері	81
1.14 № 14 зертханалық жұмыс. Диск әдісімен бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау	83
1.15 № 15 зертханалық жұмыс. Сериялық сұйылту арқылы бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау	91
1.16 № 16 зертханалық жұмыс. Сілекейдегі лизоцимді титрлеу	95
1.17 № 17 зертханалық жұмыс. Шыныдағы агглютинация реакциясы	100
1.18 № 18 зертханалық жұмыс. Кеңейтілген агглютинация реакциясы	103
1.19 № 19 зертханалық жұмыс. Преципитация реакциясы	108
1.20 № 20 зертханалық жұмыс. Комплементті байланыстыру реакциясы	111
1.21 № 21 зертханалық жұмыс. Фагоцитозды зерттеу	116
II. Жеке бактериология вирусологиямен	121
№1 зертханалық жұмыс: «Фурункулезді бактериологиялық зерттеу әдісі»	121
№2 зертханалық жұмыс «Гонореяны микроскопиялық диагностикасы»	130
№3 зертханалық жұмыс «Шигеллезді бактериологиялық диагностика»	134
№4 зертханалық жұмыс «Іш сүзегінің серологиялық диагностикасы. Видал Реакциясы»	141
№5 зертханалық жұмыс "Тырысқаққа күдік туындаған кезде бактериологиялық зерттеу"	148
№6 зертханалық жұмыс "Көкжөтелді серологиялық диагностикалау үшін агглютинация реакциясы"	153

№ 7 зертханалық жұмыс "Өкпе туберкулезінің микроскопиялық диагностикасы"	158
№ 8 зертханалық жұмыс"Дифтерияның микроскопиялық диагностикасы"	165
№ 9 зертханалық жұмыс "Сібір жарасы кезіндегі Асколи термопреципитациясының реакциясы"	170
№10 зертханалық жұмыс: "Обаның микроскопиялық диагностикасы"	177
№11 зертханалық жұмыс:"Жаралы анаэробты инфекцияның микроскопиялық диагностикасы"	183
№12 зертханалық жұмыс:"Мерез кезіндегі Вассерманның реакциясы"	188
№13 зертханалық жұмыс: "Тұмау вирусын анықтауға арналған ГАТР"	196
№14 зертханалық жұмыс: "Аденовирустық инфекциямен ауыратын науқастың сарысуындағы комплемент байланыстыратын антиденелерді анықтау"	204
№15 зертханалық жұмыс: "Полиомиелиттің серологиялық диагностикасы"	208
№ 16 зертханалық жұмыс:"Кене энцефалитін серологиялық диагностикалауға арналған ГАТР"	212
Қорытынды	218
Қолданылған әдебиеттер тізімі	219

Кіріспе

Құрметті студенттер!

Сіз болашақ дәрігерлерді даярлауда және олардың денсаулық сақтау жүйесіндегі кейінгі практикалық қызметінде өте маңызды рөл атқаратын "Медициналық микробиология, вирусология, иммунология" өте қызықты және мазмұнды пәнін оқи бастайсыз.

Сізге үлкен көлемдегі ақпаратты игеруді және микробиологиялық зерттеулердің негізгі практикалық дағдыларын сәтті игеруді жеңілдету үшін осы оқу құралы дайындалды.

Микробиология сабақтары теориялық және практикалық бөліктерден тұрады. Сабақтың практикалық бөлігі зертханалық жұмысты орындау болып табылады, сондықтан бұл оқу құралының мақсаты медициналық студенттерді зертханалық жұмысты орындауға дайындау, зерттеу нәтижелерін талдауға және түсіндіруге үйрету болып табылады. Осы нұсқаулықтың көмегімен студенттер микробиологиялық зерттеулердің негізгі дағдыларын игереді, алған теориялық білімдерін практикамен бекітеді, клиникалық материалды зертханаға жіберген кезде ілеспе құжаттаманы дұрыс толтыруды үйренеді, бұл болашақ дәрігерлерге диагноз қою үшін микробиологиялық зерттеу әдістерін дұрыс таңдауға және алынған нәтижелерді дұрыс түсіндіруге мүмкіндік береді.

Оқу құралы екі бөлімнен тұрады: жалпы микробиология иммунология негізімен, жеке бактериология вирусологиямен және бірінші бөлім бойынша 21 зертханалық жұмыс және екінші бөлім бойынша 16 зертханалық жұмыс.

Зертханалық жұмыстың сипаттамасы схема бойынша орындалады: тақырыбы, жұмыс мақсаты, қажетті жабдықтар, егжей-тегжейлі иллюстрациялары бар теориялық материал, зертханалық жұмыс хаттамасы және оның орындалу реті. Барлық иллюстрациялар интернет-ресурстардан алынған және теориялық білім мен практикалық дағдыларды жақсы меңгеруге ықпал етеді. Әр зертханалық жұмыстың соңында тақырыпты тереңірек зерттеуге арналған әдебиеттер бар.

Сондай-ақ, оқу құралының құрылымында бактериологиялық зертханада жұмыс істеу кезіндегі қауіпсіздік техникасы мен жұмыс жасау ережелері туралы маңызды бөлім бар, оны студенттер бірінші сабақта үйреніп, кейін қатаң сақтауы керек. Оқу құралында жұмыс істеген кезде авторлар ең алдымен студенттердің мүдделеріне сүйенді және бұл микробиология, вирусология және иммунология сияқты ақпаратқа бай және қызықты пәнді оқу барысында пайдалы және сұранысқа ие болады деп үміттенеді.

Оқу құралы оқу бағдарламасына сәйкес дайындалады және оны барлық мамандықтардың студенттері қолдана алады.

Сізге микроәлемді тануда сәттілік тілейміз!

1. Микробиологиялық зертханалық жұмыс ережелері және қауіпсіздік техникасы

1. Оқу микробиологиялық зертханасына жұмыс жасаға тек қана ережелермен танысқан студенттер жіберіледі.
2. Зертханаға жұмыс жасауға арнайы киіммен ғана болады – ол халат, қалпақ, ауыстырылатын аяқ киім.
3. Әр студентке оның жұмыс орны бекітіледі.

4. Микробиологиялық зертханада жүгіруге, тамақ әкелуге, ішуге, темекі шегуге, шулауға рұқсат етілмейді.
5. Зертханалық жұмысты жасау үшін жұмыс орның ұйымдастыру қажет: ол үшін үстел үстіндегі жеке және артық заттарды алып тастау, зертханалық хаттамасы бар альбомның болуы жеткілікті.
6. Барлық зерттеулер үстелге еңкеймей отырып жүргізіледі.
7. Жұмыс кезіндегі басты қауіп – ол бактериялардың тірі дақылы. Бактериялардың тірі дақылдары бар түтіктер штативтерде тұруы керек, оларды үстел үстіне қоюға тиым салынады. Пробиркалары бар штатив студенттің сол жағында орналасу керек (және егер ол солақай болса, оң жақта). Пробиркаларды сол қолмен алу керек, себебі оң (белсенді) қолда барлық манипуляциялады орындалатын бактериологиялық ілмек ұсталынады.
8. Құрамында тірі микроорганизмдер бар материалды қолмен ұстауға болмайды, ол үшін арнайы арнайы микробиологиялық құралдар бар – бактериологиялық ілмек және инелер, пинцеттер. Бұл құралдар жұмыс аяқталғаннан кейін міндетті түрде спирттік от жалынында залалсыздандырылады.
9. Спирттік от жалынында бактериологиялық ілмекті қыздыру кезінде ол қызады – сондықтан сіз ілмекті тек пластикалық ұстағыштан ұстап, саусақтарыңызды ілмекке тигізбеу керек. Ілмекті залалсыздандырғаннан кейін үстел үстіне қоюға болмайды оны штативке қою керек. Ілмекті бактериялық дақыл қалдықтарымен тастауға болмайды себебі жұмыскерге жұғуы мүмкін. Жұмыс жасардың алдында және жұмыстан соң ілмекті спирттік от жалынында залалсыздандыру қажет.
10. Микробтық дақылмен барлық манипуляция стерильдік аймақта (спирттік шам радиусы айналасында 10-15см) жүргізіледі, сонымен бірге пробирканың шетін күйдіру және ілмекті қыздыру т.б. Жұмыс жасалған препараттарды үнемі жұмыс орнында болуы қажет дезинфекциялық ерітіндісі бар ыдысқа салу керек.
11. Спирттік ашық жалынымен жұмыс істеу кезінде салбырап тұрған халатпендері ерекше қауіп төндіретінің, олардың жеңі қайырып немесе манжетті тағу керек екенің есте ұстаған жөн. Ұзын шашты олардың тұтануын болдырмау үшін қалпақтың немесе орамал астына жинау керек. Спирттік шамға еңкеймеу керек.
12. Спирттік шамды жағар алдында оның корпусының бүтіндігіне, фитильдің қажетті биіктікке шығарылғанына (1см), мойны мен фитиль ұстағышының құрғақ екеніне көз жеткізу керек. Фитиль ұстағыштың бағыттаушы түтігіне мықтап енуі керек, әйтпесе спирт ішіндегі будың жарылуы мүмкін. Спирттік шамды сөндіру кезінде жалынға үрлеуге болмайды, оның үстінен арнайы қақпақпен жабу қажет.
13. Жанып тұрған спирттік шамды қараусыз қалдыруға және бір орыннан екінші орынға ауыстыруға, спирттік шамды басқа спирттік шамның жалынымен тұтандыруға қатаң тиым салынады.
14. Сұйық заттарды сору үшін пипеткаға киілген және мақталы тампонмен жабылған резинкалы алмұртты қолдану керек. Ауызбен соруға қатаң тиым салынады.

15. Құрамында тірі микроорганизмдер бар сұйықтықтарды бір ыдыстан екіншісіне құю дезинфекциялық ерітіндімен толтырылған табақшаның үстінде жүргізіледі.
16. Тірі микробтары бар материал үстелге немесе қолға түскен жағдайда, бұл туралы мұғалімге хабарлау қажет. Содан кейін мұғалімнің бақылауымен үстел мен қолдың бетін әрдайым жұмыс орнында болатын дезинфекциялаушы ерітіндімен өңдеңіз, содан кейін қолды сабынмен және сумен жуыңыз.
17. Электр құрылғыларымен жұмыс істегенде, құрылғыны дымқыл қолмен ажыратпаңыз. Құрылғы ақаулы болған жағдайда (қыздыру, ұшқын, тұйықталу) оны дереу сөндіріп, болған жағдай туралы оқытушыға хабарлау қажет.
18. Студенттер зертханалық жұмысты тек оқытушының қатысуымен жасай алады.
19. Жұмыс аяқталғаннан кейін жұмыс орнындағы үстелді дезинфекциялау (5% ерітінді формалин немесе хлорамин), қолды дезинфекциялық ерітіндімен шайып және сабынмен жуу қажет.
20. Бөлмені күнделікті мұқият тазалау дезинфекциялау құралдарын ылғалды тәсілмен қолдана отырып, жүргізіледі.

1. Жалпы микробиология иммунология негіздерімен

1.1. Зертханалық жұмыс №1

Тақырыбы: **Бактериялардың морфологиялық және тинкториалдық қасиеттерін зерттеу. Жай бояу әдістері**

Мақсаты: бактериялардың таза дақылдарынан алынған микропрепараттардың дайындау кезеңдері мен жай бояумен бояу әдісін меңгеру

Студент білуі тиіс:

1. Микробиологиялық зертхананың ұйымдастыру принциптері мен құралжабдықтарын.
2. Микробиологиялық зертханада жұмыс істеу ережесін.
3. Бактериялардың морфологиясын және оны зерттеу әдістерін.
4. Микропрепараттардың түрлерін және бактерияларды бояудың жай әдістерін.

Студент жасай білуі тиіс:

1. Бактериялардың таза дақылдарынан алынған бекітілген микропрепаратты дайындау және жай бояу әдісімен бояу.
2. Биологиялық микроскоптың иммерсиялық жүйесінің көмегімен микроскоптау.
3. Микропрепараттағы бактерияларды морфологиялық және тинкториалдық қасиеті бойынша ажырату.

Негізгі теориялық ережелер Микроскопиялық (бактериоскопиялық) зерттеу әдісі

Микроскопиялық зерттеу әдісі – зерттеу материалындағы микробтардың (таза дақыл, патологиялық материал, қоршаған ортадан алынған сынамалар) микроскопияның көмегімен морфологиялық және тинкториалдық (боялу қасиеті) зерттеу әдістерінің жиынтығы.

Негізгі мақсаты-инфекциялық аурудың этиологиясын құру, сондай-ақ зертханалық тәжірибеде бөлінген таза дақылдардың тазалығын анықтау. Зертханалық практикада келесі микроскопиялық препараттардың типтерін қолданады:

- 1) бекітілген микропрепарат;
- 2) «жаншылған» тамшы;
- 3) «ілінген» тамшы;
- 4) «қалың» тамшы;
- 5) жұқа жағынды;
- 6) тушь көмегімен жасалған препарат.
- 7) таңба жағындысы;

Осылайша, микроскопиялық әдіс микробтардың морфологиялық (мөлшері, пішіні, микробтық жасушалардың өзара орналасуы) және тинкториалды (бояу қабілеті) қасиеттерін зерттеуге мүмкіндік береді.

Микроскопиялық әдісті бағалау: қол жетімді, жылдам, қарапайым, арзан, бірақ сезімталдығы төмен (зерттелетін материалдың 1 мл-де кемінде 100 000 бактерия болуы керек) және ақпараттылығы төмен (әртүрлі микроорганизмдердің ұқсас морфологиясына байланысты), сонымен қатар тірі микробтармен жұмыс істеу кезінде инфекция қаупі бар.

Бекітілген микропрепаратты дайындау кезеңдері:

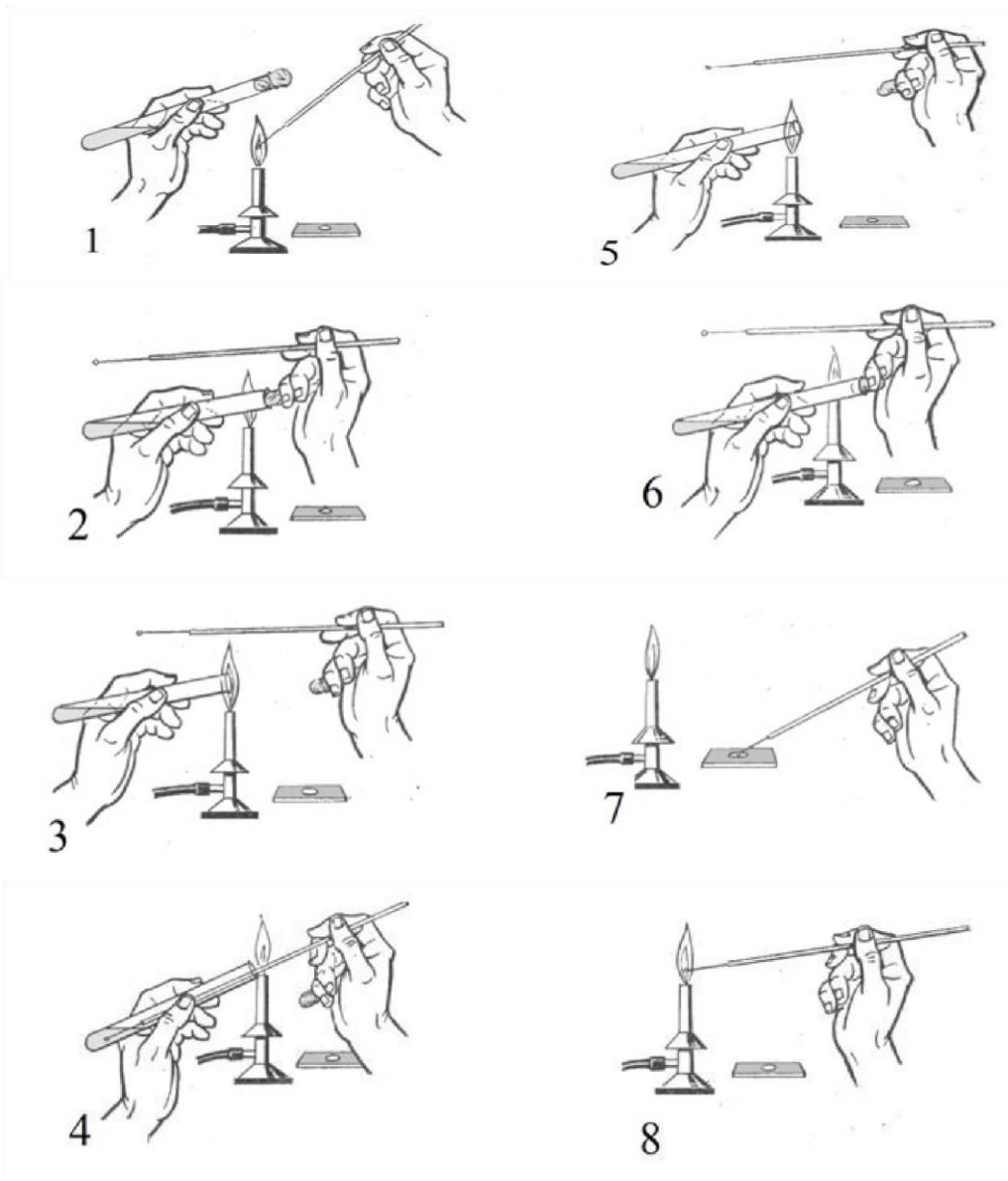
1. Жағындыны өзін дайындау
2. Кептіру
3. Бекіту
4. Бояу

Зертханалық жұмысты орындау барысы

Микропрепаратты дайындау үшін таза майсыздандырылған заттық шыныларды пайдаланады өйткені бейненің сапасы соған байланысты. Майсыздандырудың ең қарапайым әдісі-әйнекті құрғақ сабынмен ысқылау, содан кейін дәке немесе мата сүрткішпен сүрту. Әйнектің артқы жағында әйнектің ортасын микропрепараттың шекараларын шамамен 2-4 см² сопақ түрінде стеклографпен сызып көрсетеді. Осылайша дайын болған заттық әйнекті шыны «көпіршесіне» табақшаға қояды.

Егер микропрепарат тығыз қоректік ортада өсірілген бактериялық дақылдан дайындалған болса, онда қыздырылған ілмекпен заттық әйнекке бір тамшы физиологиялық сұйықтықты жағады. Содан кейін бактериялардың дақылы бар пробирканы сол қолмен орта жағынан ұстап микроорганизмдер колониялары бар қоректік ортаның беті зерттеушіге қарайтындай етіп алынады. Ілмекті қалам ұстағандай көлденең бағытта ұстайды, және оны спирт шамының жоғары бөлік жалынында ұшынан бастап барлық бойын қызарғанға дейін зарарсыздандыру керек (1, сурет 1). Содан кейін, оң қолдың кішкентай саусағымен және төртінші саусағымен бактериологиялық ілмекті босатпай, мақта тығынын ұстаңыз, оны пробиркадан шығарыңыз және келесі манипуляциялар кезінде осылай ұстаңыз (2, сурет 1). Тығынның беті инфицирленген болып саналады, сондықтан оны үстелге қоюға болмайды. Ашық пробирканың шеттері спирттің жалынына қыздырылады және стерильді ілмек енгізіледі (3, сурет1). Микробтық массаның аз мөлшерін қоректік ортаның бетінен ілмекпен алып, пробирканың қабырғаларына немесе жиектеріне тиіп кетпейтініне көз жеткізіп, пробиркадан ілмек шығарылады (4, сурет1). Пробирканың басын спирттік шамның жалынына қайтадан қыздырады (5, сурет1), содан кейін мақта тығынын күйдіреді және пробирканы онымен жауып штативке қояды (6, сурет1).

Микроб массасы бар ілмекті бір тамшысы физиологиялық ерітіндіге енгізеді, араластырады және алынған суспензия белгіленген шекарада жұқа қабатпен біркелкі етіп орналастырады (7, сурет1). Ілмек қайтадан спирттік шамның жалынында қыздырады, содан кейін оны штативке қоюға болады.



1 сурет – Бекітілген микропрепаратты дайындау кезеңі
Интернет желісінен алынған.

2-кезең. Жағындыны кептіру

Жағындыны бөлме температурасында ауада немесе спирттік шамның от жалынында жылы ауа ағынында кептіруге болады.

3-кезең. Жағындыны бекіту

Жағындыны бекіту (өлтіру) бактериялардың әйнекке жабысып бояу кезінде шайылып кетпеуі үшін, сондай-ақ олардың боялуы үшін қажет, өйткені тірі бактериялар боялмайды.

Бекітудің ең қарапайым әдісі-жоғары температурада әсер ету. Ол үшін жағындыны спирттік шамның от жалынының жоғарғы (ең ыстық) бөлігінен үш рет өткізіледі. Бекіту кезінде жағындыны қызып кетпеуі маңызды (заттық шыныны қолдың беткейіне тигізгенде жылу сезімін тудыруы керек, бірақ ыстық болмауы керек). Термиялық бекіту өрескел болып саналады, сондықтан химиялық бекіту әлі де қолданылады, әсіресе қан

жағындылары үшін. Ол үшін жағындысы бар заттық шыныны белгілі бір уақытқа бекітетін сұйықтығы бар ыдысқа батырылады (метил спирті, этил спирті, Никифоров қоспасы және т.б.) және сумен жуылады.

4-кезең. Жағындыны бояу

Бактериялар боялмаған күйде әйнек сияқты сыну коэффициентіне ие және жарық микроскопияда көрінбейді. Жағындыны бояу мақсатына байланысты қарапайым немесе күрделі әдістермен жүргізіледі. Қарапайым әдіспен анилин қатарының бір ғана бояуы қолданылады (метилен көк, фуксин, генциан күлгіні), ол аз мөлшерде жағындыны бояумен толығымен жабылатындай етіп қолданылады, 1-2 минуттан кейін (фуксин), 3-5 минуттан кейін (метилен көк), 2 минуттан кейін (генциан күлгін) бояу сумен жуылады, жағындыны сүзгі қағазымен кептіріп, микроскоппен иммерсиялы объективпен қарайды.

ХАТТАМА №1

Микроорганизмдердің морфологиялық және тинкториалдық қасиеттерін зерттеу. Жай бояу әдістері.

Зерттеу күні	Зерттеу материалы	Жұмыс барысы	Нәтиже
1	ЕПА-дағы стафилококк және ішек таяқшасының дақылы	1. Жағынды дайындау. 2. Жай әдіспен бояу (метиленкөгі, фуксин). 3. Микроскоппен қарау 4. Суретін салу	

Материалдар мен жабдықтар: стерильді физиологиялық ерітіндісі бар пробирка; бактериологиялық ілмек; ЕПА-да стафилококк пен ішек таяқшасының дақылы бар пробиркалар; спирт шамы, анилинді бояғыштардың ерітінділерінің жиынтығы; шайғыш; таза заттық шынылар; препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар табақша; сүзгіш қағаз; шыны бояғыш қарындаш (стеклограф); дезинфекциялау ерітіндісі; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық май. пробиркаларға арналған штатив; **Әдебиеттер:**

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 13-31.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,б. 15-31.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.5-24.

1.2. Зертханалық жұмыс №2

Тақырыбы: **Күрделі бояу әдістері: Грам, Пешков бойынша.**

Мақсаты: Грам, Пешков бойынша бояу әдістерін меңгеру.

Студент білуі тиіс:

1.Бактерия жасушасының құрылымын, жасуша қабырғасының құрылысының ерекшеліктерін Грам (+) Грам (-) бактериялар

2.Грам және Пешков бойынша бояудың ажыратушы әдістерін мен механизмін;

Студент жасай білуі тиіс:

1.Бекітілген микропрепаратты дайындап Грам және Пешков әдісі бойынша бояу;

2.Бактерияларды морфологиялық және тинкториалдық қасиеттері бойынша ажырату, иммерсиялық жүйемен микроскоптау.

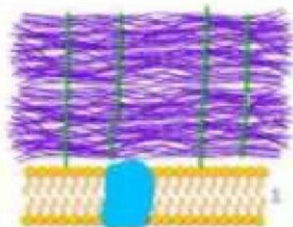
Негізгі теориялық ережелер

Бояудың мақсатына байланысты қарапайым және күрделі әдістері қолданылады. Қарапайым бояу әдісінде тек қана бір бояғыш қолданылады, күрделі бояу әдісінде 2 бояғыш және арасында түссіздендіреді. Түссіздендіру үшін су, спирт, қышқылдар қолданылады. Микробиологиядағы бояғыштар анилинді негізді (сілтілі) пайдаланады, сирек бейтарап, өйткені бактерия жасушасының құрамы бекітілгеннен кейін қышқыл реакцияға ие.

Бояудың күрделі әдістері әртүрлі бактерияларды бір-бірінен тинкториалды қасиеттері бойынша ажырату үшін қолданылады, сондықтан оларды дифференциалды деп атайды. Күрделі бояу әдісінің мысалы Граммен бояу. Осы әдіс арқылы бактериялардың жасуша қабырғасының құрылымы мен олардың тинкториалды қасиеттері арасында байланыс орнатуға болады.

Грам-оң бактерияларда пептидогликанның (құрғақ массаның 50-90%) және тейхой қышқылдарының (2-сурет) көп мөлшерінен тұратын қалың (20-80 нм) көп қабатты жасуша қабырғасы бар, олармен Люголь ерітіндісінің қатысуымен генциан күлгін кешен түзеді. Кейін микропрепаратты этил спиртімен өңдеу кезінде пептидогликан қабатындағы тесігі тарылады, бұл йодпен бояғыш кешенінің жасуша қабырғасынан шығуына жол бермейді.

Мұндай бактериялар генциан күлгінімен боялғаннан кейін фуксинді қабылдамайды, нәтижесінде жасушалар күлгін түске ие болады.



Грамположительные:

1. Цитоплазматическая мембрана,
2. Пептидогликан (муреин),
3. Тейхоевые кислоты

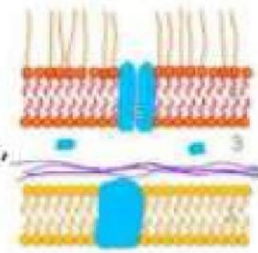
2 сурет - Грам (+) бактериясының жасуша қабырғасының құрылысы.

Интернет желісінен алынған.

Грам теріс бактериялардың қалыңдығы 14-17 нм жасуша қабырғасы бар, онда сыртқы мембрана бөлінеді, периплазмалық кеңістік, пептидогликан қабаты және басқа компоненттер (фосфолипидтер, белоктар, липополисахаридтер) (3-сурет). Пептидогликан құрғақ массаның 1-10% құрайды, бұл грам-позитивті бактерияларға қарағанда айтарлықтай аз. Сонымен қатар, тейхой қышқылдары мен пептидогликан микрофибриллалары бос орналасқан. Сондықтан грам-теріс микробтар генциан күлгін және йодтың жасуша қабырғасының компоненттерімен берік байланысын дамытпайды және бояғыштар этил спиртімен оңай шайылады. Мұндай бактериялар фуксинмен қосымша қызыл (қызғылт) түске боялады.

Грамотрицательные бактерии:

1. Цитоплазматическая мембрана,
2. Пептидогликан (муреин),
3. Периплазматическое пространство,
4. Внешняя мембрана (ЛПС),
5. Пору



3 сурет - Грам (-) бактериясының жасуша қабырғасының құрылысы. Интернет желісінен алынған.



Ганс Кристиан Йоахим Грам (дат. Hans Christian Joachim Gram (1853 ж.13 қыркүйек 1853 — 1938 ж. 14 қараша) — Дат бактериологы

Ганс Кристиан Йоахим Грам-1884 жылы бактерияларды екі негізгі класқа бөлу үшін бояу әдісін жасаған дат бактериологы.

1 кесте - Граммен бояу кезінде бактериялардың таралуы

Морфологиялық то	Грам оң	Грам теріс
Коктар	Вейлонелалар мен нейссериялардан басқа кокктар	Вейлонеллы, нейссерии (менингококки, гонококки)

Таяқшалар	Спора түзетін листериялар (кlostридиялар, бациллалар) Тармақталған және тармақшалануға бейім (микобактериялар, коринебактериялар)	Энтеробактериялар, бордетеллалар, бруцеллалар, легионеллалар, бактероидтар, псевдомонадалар, фузобактериялар.
Иілген	-	Барлық иілгіш бактериялар

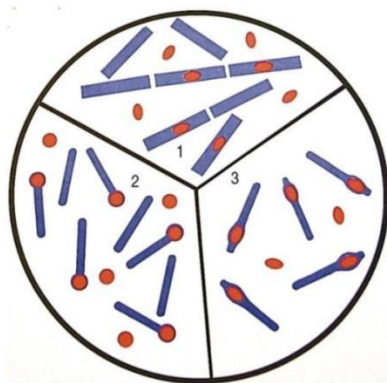
Микроорганизмдердің граммен оң немесе теріс бояу қабілеті маңызды белгі болып табылады және оларды басқа қасиеттермен бірге анықтау кезінде міндетті түрде ескеріледі.

Бактериялардың спораларын анықтаудың күрделі бояу әдістері

Кейбір бактериялар қолайсыз жағдайларда спора түзуге қабілетті. Спора түзілуі негізінен грам-оң таяқша тәрізді бактерияларға (бациллалар мен кlostридиялар) тән. Бактериялардың споралары пластинкалы құрылымы бар қалың, тығыз қабатты қабықшаға ие, бос судың минималды мөлшері, липидтердің, кальцийдің, пиколин қышқылының жоғары мөлшері, сондықтан қолайсыз жағдайларда ұзақ уақыт (ондаған жылдар) өмір сүре алады.

Пішіні бойынша споралар дөңгелек және сопақша, жасушада орналасуы бойынша – орталық, терминалды, субтерминальды, сонымен қатар мөлшері бойынша ерекшеленеді, бұл бактерияларды анықтауда ескеріледі (5сурет). *Bacillus* тұқымдас бактерияларда спораның диаметрі вегетативті жасушаның диаметрінен аспайды, ал *Clostridium* тұқымдас бактерияларда спораның мөлшері жасуша диаметрінен үлкен болады.

Бактериялардың споралары жарықтың үлкен сынғыштығымен сипатталады және тірі бактериялардың микроскопиясында боялмаған күйде споралар жылтыр дәндерге ұқсайды. Сондай-ақ, спораларды анықтау үшін арнайы бояу әдістері қолданылады: Ожешко (Ауески), Пешков, Цил-Нильсен немесе фазалық контрастты микроскопия арқылы. Спора түзетін бактериялардың мысалдары: *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*.



1-бациллалардың орталық орналасуы; 2-сіреспе кластридияларының терминалдық орналасуы; 3-ботулизм кластридияларының субтерминалдық орналасуы

5 сурет - Бактериялардағы споралардың орналасу нұсқалары (Ожешко әдісі бойынша бояу). Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмысты орындау барысы:

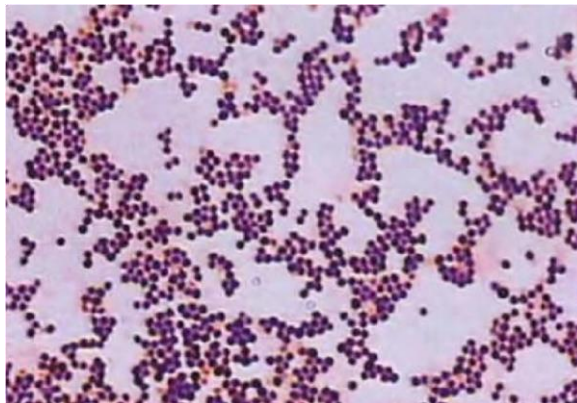
Бактериялардың жасуша қабырғасының құрылымын зерттеу үшін әртүрлі модификациядағы **Грам бояу** әдісі қолданылады (А. Синевтің модификациясын ұсынамыз) (сурет 6):

1. Бекітілген жағындыға алдын-ала генциан күлгін бояумен сіңдірілген және кептірілген сүзгі қағазының бір бөлігі қойылады. Қағазға бірнеше тамшы су жағылады және 1-2 минут ұсталады.
2. Қағазды пинцетпен алып тастаңыз, бояғыштың қалған бөлігін төгіп тастаңыз және сумен жуыңыз. Люголь ерітіндісін 1 минутқа жағыңыз. Йодтың генциан күлгінімен әрекеттесуіне байланысты жағынды қара түске айналуы керек.
3. Люголь ерітіндісі төгзіледі, сумен жумай, этил спирті жағылады, бояғыштың күлгін ағындары шамамен 30 секунд өткенге дейін сақталады.
4. Жағындыны сумен мұқият жуыңыз.
5. Пфейфер фуксинін 1-2 минутқа жағыңыз.
6. Жағынды сумен мұқият жуылады, сүзгі қағазымен кептіріледі.

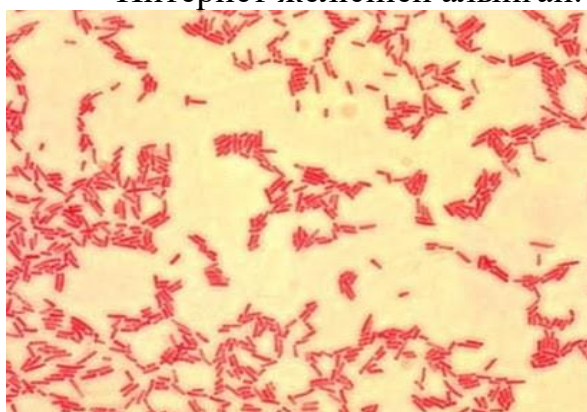


6 сурет - Грам бойынша бояудың реттілігі. Интернет желісінен алынған.

Грамм-оң бактериялар күлгін түске (сурет 7), ал Грамм-теріс бактериялар қызыл түске боялады (сурет 8).



7 сурет - *S. aureus* таза дақылынан жағынды. Грамм бойынша бояу.
Интернет желісінен алынған.



8 сурет - *E. coli* таза дақылынан жағынды. Грамм бойынша бояу.
Интернет желісінен алынған.

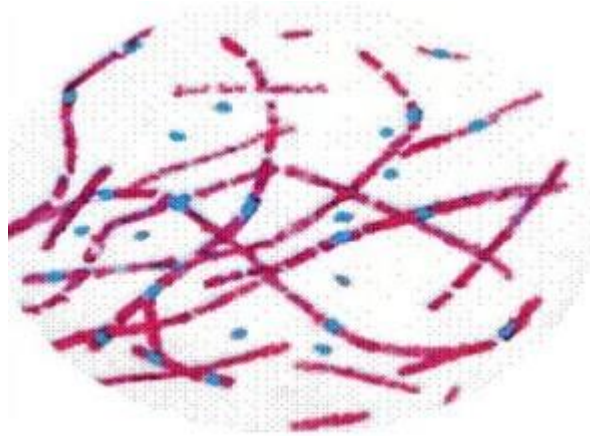
Пешков әдістемесі бойынша спораларды бояу

Пешков әдісі бактерияларды бояу бояғыш қайнағанға дейін қыздырылған кезде жүзеге асырылады, сонымен қатар бактерия жасушасының споралары мен цитоплазмасы боялады, бірақ кейіннен сумен жуылған кезде цитоплазма түссізденіп, спора бояғышты мықтап ұстайды.

Зертханалық жұмысты орындау барысы:

1. Жағындыны от жалынына бекітеді
2. Жағындыға сүзгі қағазының бөлігін қойып Леффлер метиленді көгінкұйады, заттық шыныны пинцетпен ұстап спирттік шамнын от жалынында 1520 секунд қайнатады.
3. Заттық шыныны суытып және жағындыны сумен шаяды.
4. 30-60 секунд 0,5%-тік сулы ерітіндімен нейтралдайды.
5. Сумен шайып және сүзгі қағазбен кептіреді.

Споралар Леффлердің метилен көгімен боялған көгілдір-көк түске, ал бактерияның вегетативті денешіктер нейтралды қызыл түске боялады (9 сурет).



9 сурет - *Bac.anthraxis* таза дақылы, Пешков бойынша бояу. Интернет желісінен алынған.

№2 ХАТТАМА Бояудың күрделі әдістері: Грам, Пешков бойынша

Күні	Зерттелетін материал:	Зерттеу барысы:	Нәтижесі:
1	ЕПА-дағы стафилококк пен ішек таяқшасы	1. Жағынды даярлау. 2. Грам бойынша бояу. 3. Микроскоптан қарау. 4. Суретін салу.	
2	ЕПА-дағы спора дақылы	1. Жағынды дайындау. 2. Пешков бойынша бояу. 3. Микроскоптан қарау. 4. Суретін салу.	

Құрал-жабдықтар мен материалдар: бактериологиялық ілмек; спирттік шам; пробиркаларға арналған штатив; ЕПА-дағы стафилококк, ішек таяқшасы және споротүзүші бактериялардың таза дақылдары бар пробиркалар; таза заттық шынылар; физиологиялық ерітінді, препараттарды бояуға арналған шыны «көпірі» бар табақша; сүзгіш қағаз; шыныдағы қарындаш (стеклограф); дезинфекциялаушы ерітінді; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық май; Грам және Пешков бойынша бояулар жиынтығы.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 31-35.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- С. 31-33.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.24-26.

1.3. Зертханалық жұмыс № 3

Тақырыбы: **Циль-Нильсен әдісі бойынша қышқылға төзімді бактерияларды анықтау**

Мақсаты: қышқылға төзімді бактерияларды бояудың күрделі әдісін игеру (Циль-Нильсен әдісі)

Студент білуі тиіс:

- 1.Қышқылға төзімді бактериялардың жасушалық қабырғасының құрылымы мен химиялық құрамының ерекшеліктері;
- 2.Циль-Нильсен бойынша күрделі бояу әдісінің механизмі мен техникасын.

Студент жасай білуі керек:

- 1.Циль-Нильсен әдісі бойынша микропрепаратты бояу;
- 2.Иммерсионды жүйесі бар биологиялық микроскоптан қарай білу.

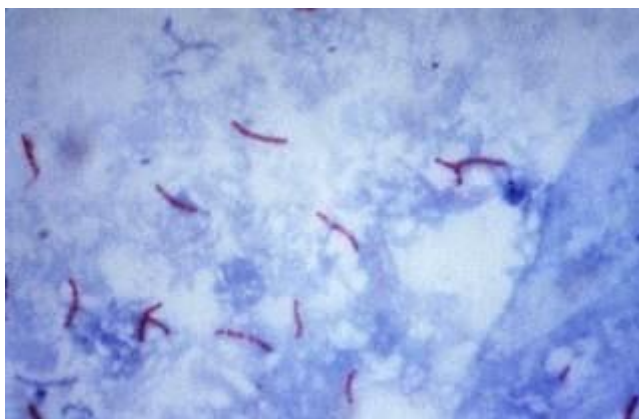
Негізгі теориялық ереже

Бұл әдіс, оны 1882-1883 жж. ойлап тапқан неміс дәрігерлері –микробиолог Франц Циль мен патологанатом Фридрих Нельсен (Нильсен) есімімен аталған.

Әдісті бактерияларды бояудың күрделі әдісіне жатқызады және қышқылға төзімді микобактериялар – туберкулез қоздырғышы (*Mycobacterium tuberculosis*) мен алапесті (*Mycobacterium leprae*) бояу үшін қолданады.

Жасушалық қабырғаларында липидтердің, микол қышқылдар мен балауыздың айтарлықтай мөлшеріне байланысты қышқылға төзімді бактериялар анилинді бояуларды нашар қабылдайды, сол себепті Грам бойынша нашар боялады. Бұл бактерияларды бояу үшін, Цильдің фенолды фуксинін қолданып, Циль-Нильсен бойынша арнайы бояу әдісін қолданады (сурет 10).

Әдістің мәні микропрепаратты Цильдің карболды фуксинімен бояу үдерісі кезінде үш рет спиттік шамның от жалынында буы шыққанша қыздырады. Бұндай температурада қышқылға төзімді бактериялардың жасушалық қабырғасының липидтері ыдырап, жасуша фуксинді Цильмен қызыл түске боялады. Кейін препарат суытылған кезде липидтер өздерінің құрылымын қалпына келтіреді, және кейін 5% де концентрлі күкірт қышқылымен немесе тұздықшқылды спиртпен шайған кезде бактерия бояуды қышқылға төзімсіз бактериялар тәрізді түссізденбейді. Соңғы кезеңде микропрепарат макроорганизм жасушалары мен тіндерін немесе бөгде микрофлораны көгілдіркөк түске бояу үшін қосымша бояумен (метилен көк) боялады.



10 сурет - Қақырықтағы туберкулез микобактериялары, Циль-Нильсен әдісімен бояу. Интернет желісінен алынған.

Туберкулездің қышқылға төзімді микобактериялары (0,2 – 0,7x1-10 мкм) микроскоптың астында біртекті немесе түйіршікті цитоплазмасы бар рубиндіқызыл жіңішке түзу немесе сәл қисық таяқшалар түрінде көрінеді, жеке, жұптасып немесе топтасып орналасуы мүмкін және микропрепараттың басқа компоненттерінің көгілдір фонында айқын көрінеді (10-сурет).

Жұмыстың орындалу барысы:

1. Құрғатылған және бекітілген жағындыны сүзгіш қағаздың үзігін салып, Цильфуксинінің карболды ерітіндісін құйып, шыныны пинцетпен ұстай отырып, спирт шамы жалыны үстінде бу пайда болғанша қыздырады. Бұдың пайда болуын жағындының жанынан қараған ыңғайлырақ. Бұл процесті, әрбір рет сайын шыныны суыту үшін шетте ұстап, 2-3 рет қайталап отырады. Қағаздың оның булануының нәтижесінде, сүзгіш қағаздың кебуіне қарай карболды фуксинді ақырындап құяды.
2. Сүзгі қағазды пинцетпен алып тастап, жағындыны суытып және сумен шаю;3. 1-2 мин толық түссізденуге дейін препаратқа 5%-тік күкірт қышқылын немесе тұзқышқылды спиртті құйып отыру; 3. Микропрепаратты сумен мұқият шаю;
4. Леффлер көгімен бояу (3-5 мин);
5. Сумен шайып алу және сүзгі қағазбен құрғату

Қышқылға төзімді бактериялар нәтижесінде рубинді-қызыл, ал қалған бактериялар – көк түсті боялады.

№ 3 ХАТТАМА Қышқылға төзімді бактериялар және олардың Циль-Нильсен бойынша боялуы

Күні	Зерттеу материалы:	Зерттеу барысы:	Нәтижесі:
------	--------------------	-----------------	-----------

1	Құрғатылған және бекітілген микропрепарат	1. Микропрепаратты ЦильНильсен әдісі бойынша бояу. 2. Микроскоптан қарау. 3. Бактериялардың морфологиялық және тинкториялық қасиеттерін зерттеу. 4. Суретін салу.	
---	---	--	--

Құрал-жабдықтар мен материалдар: спирт шамы; бактериологиялық ілмек; пробиркаларға арналған штатив; дайын бекітілген микропрепарат, препараттарды бояуға арналған шыны «көпірі» бар табақша; сүзгіш қағаз; шыныдағы қарындаш (стеклограф); дезинфекциялық ерітінді; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсионды май; Циль-Нильсен бойынша бояуға арналған реактивтер: Цильдің фенолды фуксині, Леффлер метилен көгі, 5–10 %-тік H₂SO₄ ерітіндісі.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапаца, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, -б. 35-36..
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 33-34.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.26.

1.4. Зертханалық жұмыс № 4

Тақырып: **Бактерияларды тірі күйінде зерттеу: "жаншылған" тамшы микропепаратын дайындау**

Мақсаты: "жаншылған" тамшы микропепаратын дайындау әдісін игеру

Студент білуі тиіс:

1. Бактерияларды тірі күйінде зерттеу әдістерін.

Студент жасай алуы керек:

1. "Жаншылған тамшы" микропрепаратын дайындауды;
2. Биологиялық микроскоптың иммерсиялық жүйесімен микроскопия жасауды.

Негізгі теориялық ақпараттар

Тірі күйінде микроорганизмдерді, олардың пішінін, қозғалғыштығын немесе ішкі құрылымын анықтау үшін зерттеледі. Ол үшін нативті

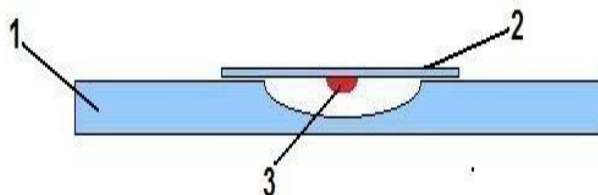
микропрепарат "жаншылған" (сурет 12) немесе "ілінген" тамшы (сурет 11) әдістерін дайындайды.

Нативті микропрепараттарды микроскопиялау үшін фазалы контрасты микроскоп және қараңғы түнек микроскопты қолданады, себебі тірі микроорганизмдер қарапайым микроскоппен аз контрасты және түссіз болып дұрыс көрінбейді.

«Ілінген тамшы» препараты

«Ілінген тамшы» микробтардың қозғалғыштығын, дамуын көбеюін, спорасының өсуін қадағалауға қолдануға ыңғайлы.

Микропрепаратты дайындау үшін зерттеу материалының бір тамшысын немесе бактериялар қоспасын майсыздандырылған жабынды әйнектің ортасына орналастырады, оның үстіне тамшы ортасында болатындай етіп ойығы бар заттық шыныны орнатады. Ойықтың жандарын алдын ала вазелинмен жағады. Жабынды әйнекпен жабысқан заттық шыныны аударады, сол кезде тамшы ойықтың қабырғасы мен түбіне жетпей ілініп тұрады.



11 сурет - "Ілінген тамшы": 1 – ортасында ойығы бар заттық шыны; 2 – жабын шыны; 3-микроорганизмдер суспензиясы. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы "жаншылған" тамшы препараты



12 сурет - "Жаншылған тамшы" препаратын дайындау. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

1. "Жаншылған тамшы" препаратын дайындау үшін майсыздандырылған заттық шынының ортасына бактериологиялық ілмекпен сорпа дақылын және 1 см² аумаққа біркелкі етіп орналастырады. Агардағы дақылдан микропрепаратты дайындау үшін заттық шыныға алдымен бір тамшы физиологиялық жағылады және онда ортадан алынған микробтардың бір ілмегі араластырылады.

2. Жабынды әйнекті тамшының шетіне қойылып, оны төмендетіп жабындыәйнек пен заттық шыны арасындағы ауаны ығыстырады. Тамшы әйнектер арасында "жаншылады", ал әйнектер бір-біріне мықтап жабысады

және сұйықтық жұқа қабатпен олардың арасындағы кеңістікті жабын әйнегінен шықпай толтырады.

3. Жабынды әйнекке бір тамшы иммерсиялық май тамызылады және конденсатор сәл төмен түсірілген x90 объективімен, x7 немесе x10 окулярымен микроскопияланады.

Салыстырмалы түрде үлкен бактериялармен жұмыс істегенде, сіз x40 және тіпті x8 құрғақ линзаларын қолдана аласыз және иммерсиялық майсыз қолдана аласыз.

"Жаншылған тамшы" әдісінің кемшілігі-препараттың тез кебуі, сондықтан оны дайындағаннан кейін бірден микроскопиялау керек.

Нәтижені бағалау: "жаншылған" және "ілінген" тамшылар препараттарындағы қозғалмайтын микробтар броундық қозғалыстың бейнесін жасайды, бірдей жылдамдықпен айтарлықтай емес қашықтыққа қозғалады,

№4 хаттама

Бактерияларды тірі күйінде зерттеу: "жаншылған" тамшы микрореагентын дайындау

Күні	Зерттеу материалы:	Зерттеу барысы:	Нәтиже:
1	1. Қоректік сорпадағы қозғалмалы бактериялар дақылы бар пробирка. 2. Қоректік агардағы бактериялардың дақылы бар Петри табақшасы	1. "Жаншылған тамшы" препаратын дайындаңыз. 2. Микроскоппен қарау. 3. Суретін салу.	

Материалдар мен жабдықтар: спирт шамы, бактериологиялық ілмек, "көпірі" бар табақша, заттық шынылар, жабындық шынылар, натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі, қоректік сорпада бактериялар дақылы бар пробирка, қоректік агарда бактериялар дақылы бар Петри табақшасы, физиологиялық ерітінді, биологиялық микроскоп, иммерсиялық май.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 42-44.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 38-39.

3.Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.23-24.

1.5. Зертханалық жұмыс № 5

Тақырып: **Тығыз және сұйық қоректік ортадағы бактериялардың дақылдық қасиеттерін зерттеу**

Мақсаты: тығыз және сұйық қоректік ортадағы бактериялардың дақылдық қасиеттерін зерттеу әдісін игеру.

Студент білуі тиіс:

1.Қоректік орта түрлерін

2.Әр түрлі қоректік ортада бактериялардың өсу сипаты мен ерекшеліктері

Студент жасай білуі керек:

1.Тығыз және сұйық қоректік ортада бактериялық дақылдың өсу сипатын зерттеу және сипаттау

Негізгі теориялық ақпараттар

Микробтардың дақылдық қасиеттері қоректік ортадағы микроорганизмдердің өсу сипаты мен ерекшеліктерін, сондай-ақ оларды өсіру жағдайларын білдіреді. Дақылдық қасиеттерді зерттеу бөліп алынған дақылды анықтау үшін маңызды, өйткені бұл қасиеттер тұрақты және әр түрге тән.

Дақылдық әдіс - бұл ауру қоздырғышының таза дақылдың бөліп алу және оның қасиеттерін зерттеу мақсатында зерттелетін материалды жасанды қоректік ортаға себуден тұратын әдіс. Бактериялогияда дақылдық әдіс бактериологиялық, микологияда – микологиялық, протозоологияда – протозоологиялық, вирусологияда – вирусологиялық деп аталады.

Таза дақыл - бір түрдегі немесе түр асты бактериялардың қоректік ортада өсетін популяциясы.

Микроорганизмдерді сәтті дақылдандыру үшін дұрыс қоректік ортаны таңдау өте маңызды.

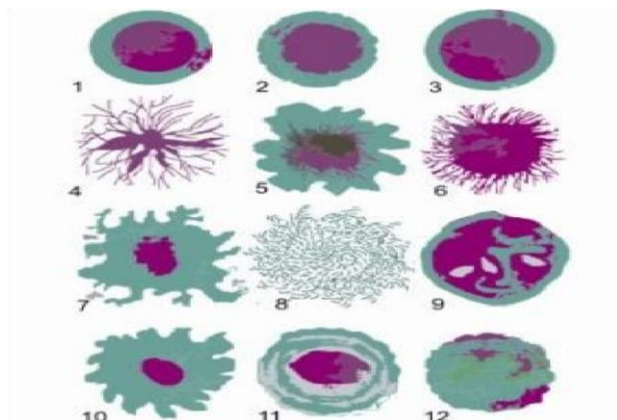
Тығыз қоректік ортада микробтардың өсуі

Тығыз қоректік ортадағы микробтардың өсуін зерттеу үшін зерттеу материалын Петри табақшадағы ортаға оқшауланған колониялардың өсуін алу үшін себінді жасау керек. **Колония** - бір немесе бірнеше бактерия жасушаларының көбеюі нәтижесінде тығыз қоректік ортаның бетінде немесе тереңдігінде өскен бір түрдегі немесе биовар бактерияларының шоғыры.

Колониялар мөлшері, түсі, пішіні, беті, жиек контуры, рельефі, консистенциясы, құрылымы бойынша сипатталады.

Колонияның мөлшері оның диаметріне байланысты. Егер диаметрі 1 ммден аз болса, онда бұл ергежейлі (нүктелік) колониялар, диаметрі 1-2 мм - ұсақ, диаметрі 2-4 мм - орташа, диаметрі 4-6 мм және одан үлкені - ірі.

Колонияның пішіні дұрыс-дөңгелек, дұрыс емес-сопақша, амеба тәрізді, ризоидты (тамыр тәрізді), жұлдыз тәрізді (13-сурет).

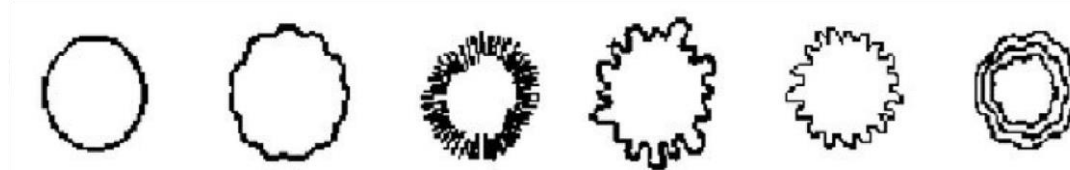


1-дөңгелек; 2 – фестончатый жиегі бар дөңгелек; 3 – шетінен роликпен дөңгелек; 4, 5 - ризоид; 6 – ризоидты жиегі бар дөңгелек; 7 – амеба тәрізді; 8

жіп тәрізді; 9 – бүктелген; 10 – тұрақты емес; 11 – концентрлік; 12- күрделі 13 сурет - Бактериялардың колонияларының пішіні. Интернет желісінен алынған.

Жиек контурының пішіні - колонияны үлкейту әйнегі немесе микроскоп астында қарау кезінде анықталады. Колониялар тегіс және тегіс емес жиектер болады (сурет 14). Тегіс емес өз кезегінде бөлінеді:

- 1) бахромалы – жұмсақ жіпшелерді еске түсіреді;
- 2) тісті – әрүрлі мөлшермен мен пішіндегі өткір тісті;
- 3) фестонды ірі түр – жеңіл дөңгеленген және дұрыс пішінді айналған тісті
- 4) толқынды ірі тістері анық көрінбейтін ірі түрі;
- 5) бұлыңғыр - нақты анықталған сызық жоқ;

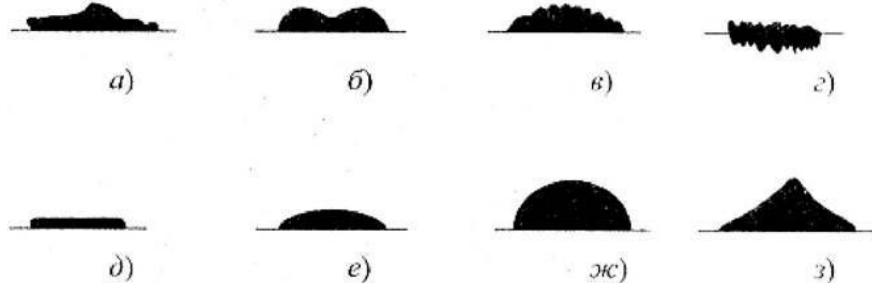


14 сурет - Жиек контурының сипаты. Интернет желісінен алынған.

Колонияның **рельефі** оның қоректік орта бетінен жоғары көтерілуімен және тік қимадағы пішіннің контурымен сипатталады. Колонияның рельефі бүйірден және жоғарыдан қараған кезде көзбен немесе үлкейткішпен анықталады (сурет 17). Ажыратады:

- 1) тұрақты дөңгелек пішінді тамшы тәрізді және күмбез тәрізді колониялар, әртүрлі дәрежеде дөңес, олар тік бөлімде доптың сегменті болып табылады және тек радиус ұзындығымен ерекшеленеді. Әлсіз дөңес колониялардың радиусы ұзын, күмбез тәрізді – кішірек;

- 2) колониялар тегіс үстіңгі жағы бар, жайпақ немесе тік үзілген жиектері бар жазық-дөңес, тік қимада трапеция пішініне ие;
- 3) тік қимасында үшбұрыш пішіні бар конус тәрізді колониялар;
- 4) емізік түрінде көтерілген ортасы және шеткері білігі бар колониялар;
- 5) езілген орталығы бар колониялар;
- 6) колониялар тегіс, орта бетінде қозғалады.

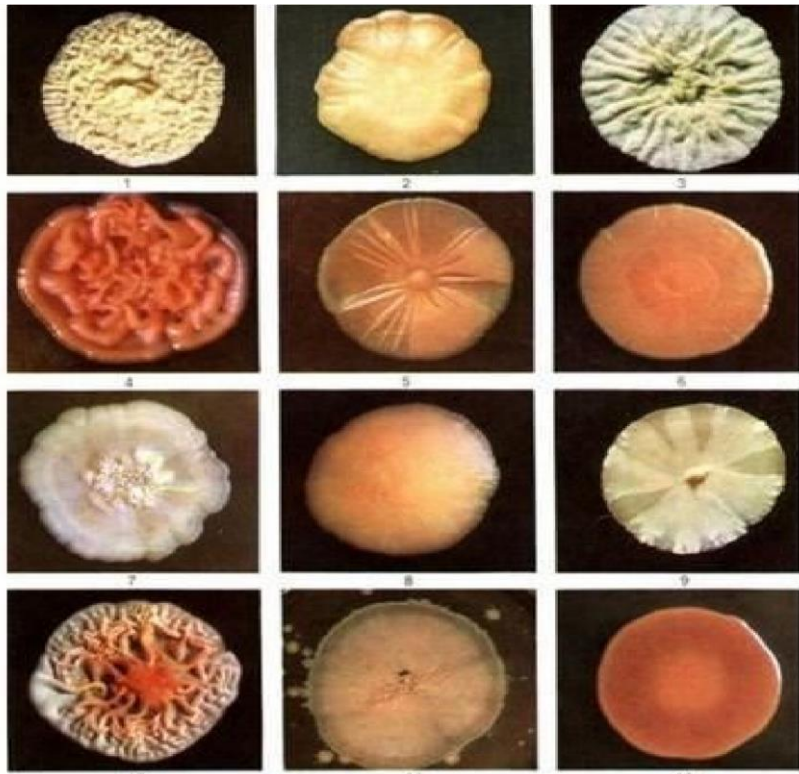


а - иілген; б - кратер тәрізді; в - дөңес; г - агарға өсетін; д - жазық; е-дөңес; ж тамшы тәрізді; з-конус тәрізді

15 сурет - Микроорганизмдер колонияларының бедері. Интернет желісінен алынған.

Колонияның беті үлкейткіш әйнектің көмегімен немесе микроскоптың аз үлкейткіші арқылы зерттеледі. Колонияның беті күңгірт немесе жылтыр, құрғақ немесе дымқыл, тегіс немесе бұжыр болады (сурет 16). Тегіс колониялар S (англ. smooth) әрпімен (сурет 17) , бұжыр колониялар R (англ. rough) әрпімен (сурет 18) белгіленеді.

Колониялардың S-формаларының R-формаларына ауысуы мутация нәтижесінде пайда болады және диссоциация деп аталады. Осы екі негізгі типтен басқа, диссоциация процесінде шырышты M-тип (лат. mucus) колониялар пайда болады.



16 сурет - Әр түрлі бактериялардың колонияларының беті. Интернет желісінен алынған.



17 сурет - Колониялардың S-формасы. Интернет желісінен алынған.

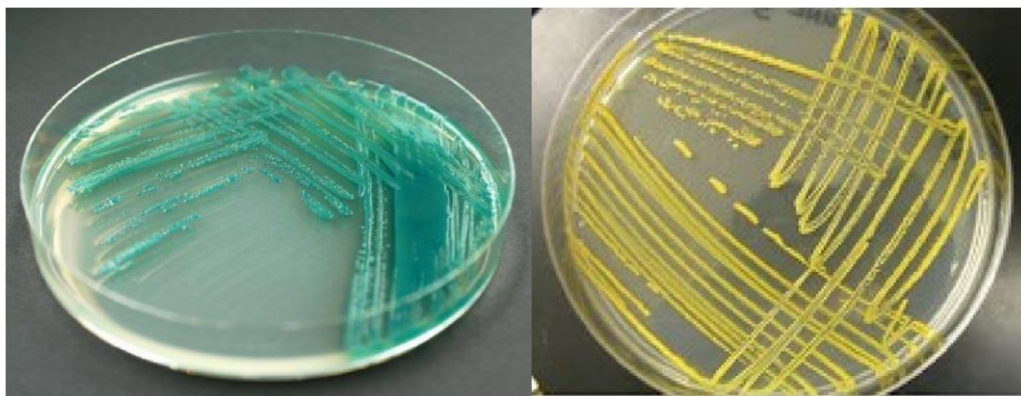


18 сурет - Колониялардың R – формасы

Колонияның түсі микробтар шығаратын пигментіне байланысты (сурет 19). Патогендік бактериялардың басым көпшілігі пигментті қалыптастырмайды, нәтижесінде колониялар түссіз және әр түрлі дәрежеде мөлдір болады. Пигмент түзуші бактериялар әр түрлі түсте колониялар түзеді: сүтті-ақ, кілегей, сары, алтын-қызғылт сары, көк, қызыл, жұпаргүл түсті, қара және т. б (сурет 20).



19 сурет - Пигмент түзуші бактериялардың колониялары. Интернет желісінен алынған.



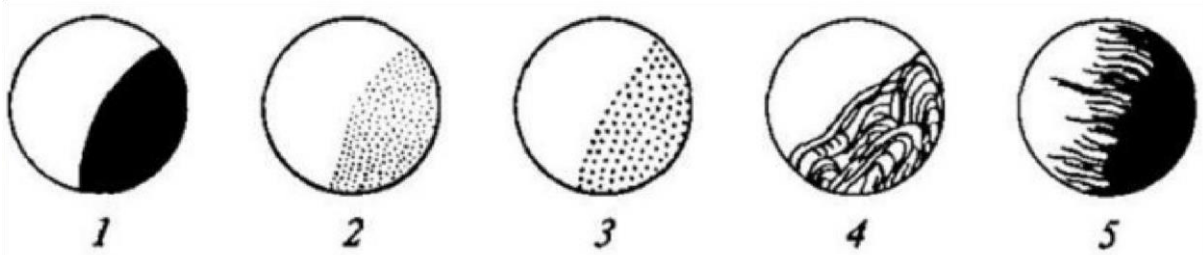
20 сурет - Көк-жасыл түсті пиоцианин пигменті бар *Pseudomonas aeruginosa* колониялары (сол жақта) және сары пигменті бар стафилококк колониялары. Интернет желісінен алынған.

Колонияның құрылымы микроскоптың әлсіз ұлғаюымен, тарылған диафрагмамен немесе сәл төмендетілген конденсатормен өтетін жарықта анықталады (сурет 21).

Құрылымның табиғаты бойынша колониялардың келесі түрлері бөлінеді:

- 1) гомогенді - айқын құрылымы жоқ;
- 2) түйіршікті-дән мөлшеріне қарай ұсақ және ірі түйіршік болып бөлінеді;
- 3) колониялардың қалыңдығында ұзын, тығыз тоқылған жіптердің болуымен сипатталатын жіп тәрізді немесе талшықты.

Колониялар біртекті және біртекті емес болады. Біртекті емес колонияның ортаңғы бөлігі өзгеше перифериялық немесе бөлек бөліктерінде бірдей емес болады.



1 - біртекті, 2-ұсақ түйіршікті, 3 - ірі түйіршікті, 4 - ағынды, 5- талшықты 21 сурет - Колонияның құрылымы. Интернет желісінен алынған.

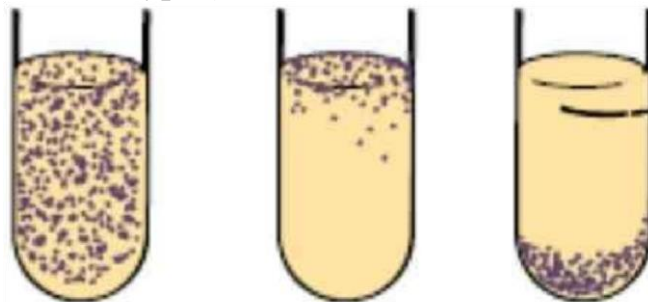
Колонияның консистенциясын бактериялық ілмектің көмегімен бір бөлігін түрту немесе алу арқылы зерттеледі.

Колонияның консистенциясы бойынша:

- 1) май немесе паста тәрізді, олар оңай алынып тасталады және сары майсияқты қоректік ортаның бетіне жағылады;
- 2) тұтқыр немесе шырышты, жабысқақ және ілмектің артынан созылады;
- 3) ілмек тиген кезде шашыранқы, құрғақ, сынғыш;
- 4) талшықты немесе былғары, қоректік ортаның бетінен серпімді пленкәтүрінде алынады.

Сұйық қоректік ортадағы микробтардың өсу ерекшеліктері.

Сұйық қоректік ортада бактериялардың келесі өсу формалары анықталды: лайлану, тұнба, пленка (22-сурет).



біркелкі лайлану, беткі өсу (пленка), төменгі өсу (тұнба)

22 сурет - Сұйық ортадағы бактериялардың өсуі

2. Әр түрлі дәрежедегі ортаның **біркелкі лайлануы** түріндегі бактериялардың өсуі факультативті анаэробтарға тән.
3. Әр түрлі ерекшеленетін пленка түріндегі бактериялардың **беткі өсуі**:
 - 1) жұқа, нәзік, түссіз, әрең көрінетін пленка;
 - 2) қалың, шырышты, тұтқыр консистенциялы пленка, ілмекке жабысып,оның артына созылады;
 - 3) тығыз, құрғақ, әжімделген пленка

Пленканың түсі пигменттің болуына байланысты. Беткейінде пленка түріндегі бактериялардың өсуі облигатты аэробтарға тән.

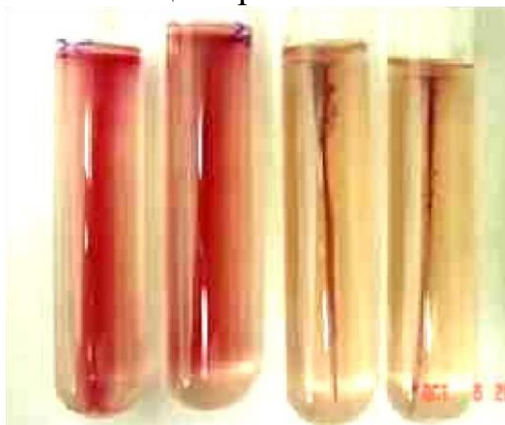
4. Бактериялардың ыдыс **қабырғасына өсуі** кезінде пробиркадағы қоректік орта толығымен мөлдір болып қалады. Бактериялар өсіп, көп немесе аз мөлшерде борпылдақ қабыршақтарды немесе, керісінше, бактериялардың түріне байланысты оңай немесе қиындықпен алынып тасталатын ыдыс қабырғаларының ішкі бетіне бекітілген ықшам дәндерді құрайды. 4. Пробирканың түбінде әртүрлі сипаттағы және әртүрлі ауырлық дәрежесіндегі тұнба түріндегі бактериялардың **төменгі өсуі**. Тұнба мол немесе аз, біртекті немесе қабыршақты, консистенциясы тұтқыр немесе сынғыш болуы мүмкін. Тұнбаның үстіндегі өсіп келе жатқан орта мөлдір немесе лайлы болуы мүмкін. Төменгі өсу анаэробты бактерияларға тән.

Жартылай сұйық қоректік ортада өсу.

Жартылай сұйық қоректік ортада микробтардың өсу ерекшеліктерін анықтау үшін зерттелетін дақыл жартылай сұйық агардың 0,2-0,5% бағанына себіледі.

Жартылай сұйық агар бағанындағы жылжымалы микробтар қоректік ортаның қалыңдығына аз немесе біркелкі таралатын айқын лайлануды тудырады (23 сурет).

Микробтардың қозғалмайтын формалары тек қоршаған ортаны егу кезінде өседі. Бұл жағдайда өсіп келе жатқан орта толығымен мөлдір болып қалады.



23 сурет - Жартылай сұйық агар бағанындағы өсу (алғашқы 2 пробиркада қозғалғыш бактериялардың өсуі)

Жұмыстың орындалу барысы

1. Қоректік сорпадағы *E. coli* және *S. aureus* бактерияларының өсу сипатын зерттеу.
2. ЕПА-де *E. coli* және *S. aureus* өсуінің дақылдық қасиеттерін жазбашатүрде сипаттаңыз: лайлану дәрежесі, бетінде пленканың болуы, қабырға сақинасының болуы, шөгінділердің болуы, ортаның түсі.
3. ЕПА-ғы өсіндіні альбомға суретін салу
4. Тығыз қоректік ортада бактериялардың өсу сипатын зерттеу.
5. Альбомға Петри табақшасындағы ЕПА-да бактериялардың өсу суретін салыңыз (ауадан себу)
6. ЕПА-ға бөлінген колониялардың бірінің дақыл өсу қасиеттерін жазбашатүрде сипаттаңыз: колонияның пішіні, колонияның диаметрі, колонияның

түсі, рельефі, колонияның беті, жиектердің сипаты, колонияның құрылымы, консистенциясы, жылтырлығы, мөлдірлігі.

№5 хаттама Тығыз және сұйық орталарда бактериялардың дақылдық қасиеттерін зерттеу

Күні	Зерттеу материалы	Жұмысты орындау барысы	Нәтиже
1	E. coli, S. aureus өскен ЕПА	1. Сұйық ортадағы өсуді сипаттап, суретін салу Макроскопиялық сипаты: 1. Лайлану дәрежесі 2. Бетіндегі қабықша 3. Сақина болуы 4. тұнба 5. Түсі	
1	ЕПА-ға ауадан түсіп өскен бактериялар дақылы	Дақылдың макроскопиялық сипаты, схема: 1. Формасы 2. Диаметрі 3. Түсі 4. Рельефі 5. Беті 6. Шеттері 7. Құрылысы 8. Консистенциясы 9. Жылтырлығы 10. Мөлдірлігі	

Материалдар мен жабдықтар: штатив, E.coli, S.aureus таза дақылдары, пробиркалардағы ЕПА-да спора түзетін бактериялар, бактериялардың колонияларының өсуімен Петри ыдысындағы ЕПА (ауадан себу).

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 50-51.
2. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор.Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.42-60.

1.6. Зертханалық жұмыс № 6

Тақырыбы: Аэробты бактериялардың таза дақылын бөліп алу және анықтау

Мақсаты: аэробты микроорганизмдердің таза дақылын бөліп алу және түрге дейін анықтаудың негізгі кезеңдерін игеру

Студент білу керек:

1. Зерттеудің бактериологиялық әдісінің мәні, артықшылықтары мен кемшіліктері;
2. Аэробты бактерияларды өсірудің негізгі принциптері мен әдістері;
3. Бактерияларды биохимиялық қасиеттері бойынша анықтау әдістері.

Студент жасай алуы керек:

1. Петри ыдысындағы ЕПА-ға, қисайтылған ЕПА-ға, Гисс ортасына ілмекпен себуді жүргізу.
2. Гисс орталарында бактериялардың өсу нәтижелерін түсіндіру.

Негізгі теориялық ақпарат

Зерттеудің бактериологиялық әдісі кез-келген микробиологиялық зертхананың практикалық қызметінде маңызды болып табылады. Ауруды тудырған этиологиялық факторды анықтау және сәйкесінше емдеу тактикасын таңдау оның дұрыс орындалуына байланысты. Бұл әдістің маңыздылығы көптеген жағдайларда дәрігерлердің микробтық ассоциациялармен айналысатындығымен түсіндіріледі, содан кейін аурудың пайда болуында микробтардың әрқайсысының рөлін анықтау қажет.

Микробтардың таза дақылын бөліп алу бактериологиялық зерттеу әдісінің міндетті кезеңі болып табылады. Бактериялардың таза дақылдары бір түрдің немесе түр асты дараларынан тұратын дақылдар деп аталады. Таза дақыл морфологиялық, дақылдық, биохимиялық және антигендік қасиеттерді зерттеу үшін қажет, олардың жиынтығы зерттелетін микроорганизмнің түрге жататындығын анықтайды.

Таза дақылды бөліп алу үшін зерттелетін материалды қоректік ортаға себу жүргізіледі. Себінді себу техникасына және зерттелетін материалдағы микробтардың концентрациясына байланысты тығыз өсетін ортаның бетіндегі бактериялар үздіксіз өсуді (24-сурет) немесе "ағынды өсуді" (бактериялардың жоғары концентрациясында) немесе оқшауланған колонияларды (яғни бактериялардың төмен концентрациясында көрші колониялармен шеттермен жанаспайтын) құрай алады. Оқшауланған колонияларды алмай таза дақылды бөліп алу мүмкін емес.

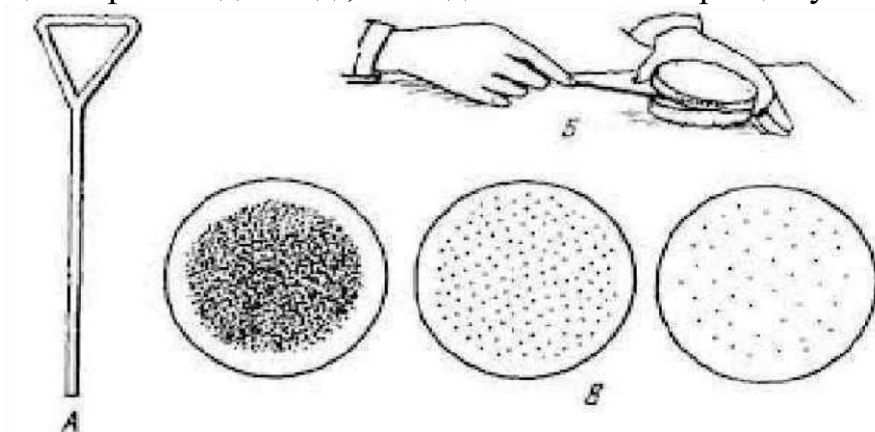


24 сурет - Оқшауланған колониялар, жоғарғы жағында - бактериялардың ағынды өсуі. Интернет желісінен алынған.

Оқшауланған колониялардың өсуін алу үшін микробиологиялық зертханаларда бірнеше әдістер қолданылады.

Таза аэробты дақылдарды бөліп алу әдістері Дригальский әдісі

Бұл әдіс зерттелетін материалды тығыз қоректік ортасы бар үш петри табақшаға (үш сектор) ілмекпен немесе шпательмен кезекті түрде себуден тұрады (25-сурет). Бірінші табақшаға зерттелетін материалдың бір тамшысы енгізіледі және стерильді шпательмен оны қоректік ортаның бетіне ысқылайды. Әрі қарай, шпательді күйдірмей және жаңа материал жинамай, осы шпательмен екінші және үшінші ыдыстарға себіліп, қоректік заттардың бетіне қалған материалды сүртеді. Колониялардың ең көп саны бірінші табақшада, ең азы үшіншіде өседі, ал ондағы колониялар оқшауланады.

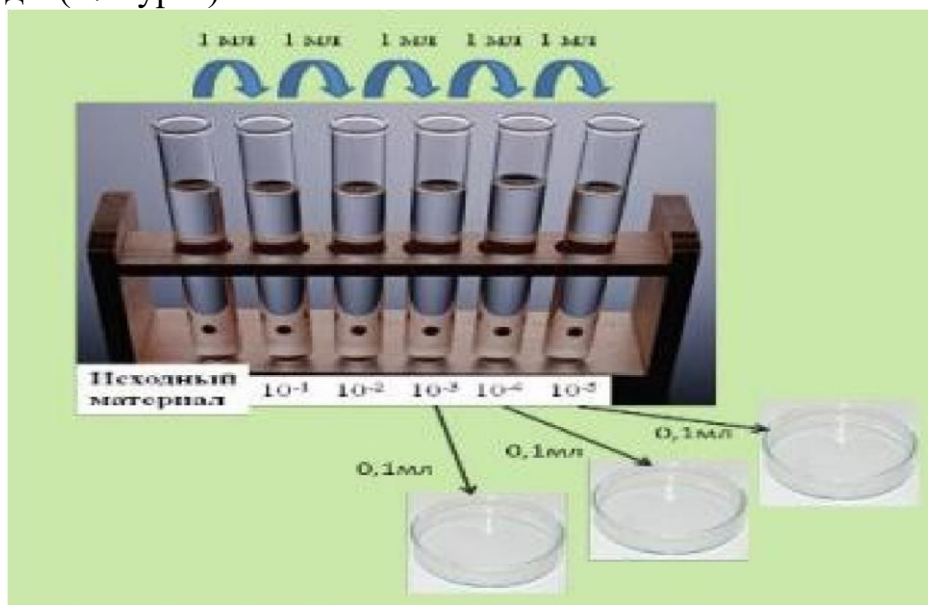


25 сурет - Дригальский әдісі. Интернет желісінен алынған.

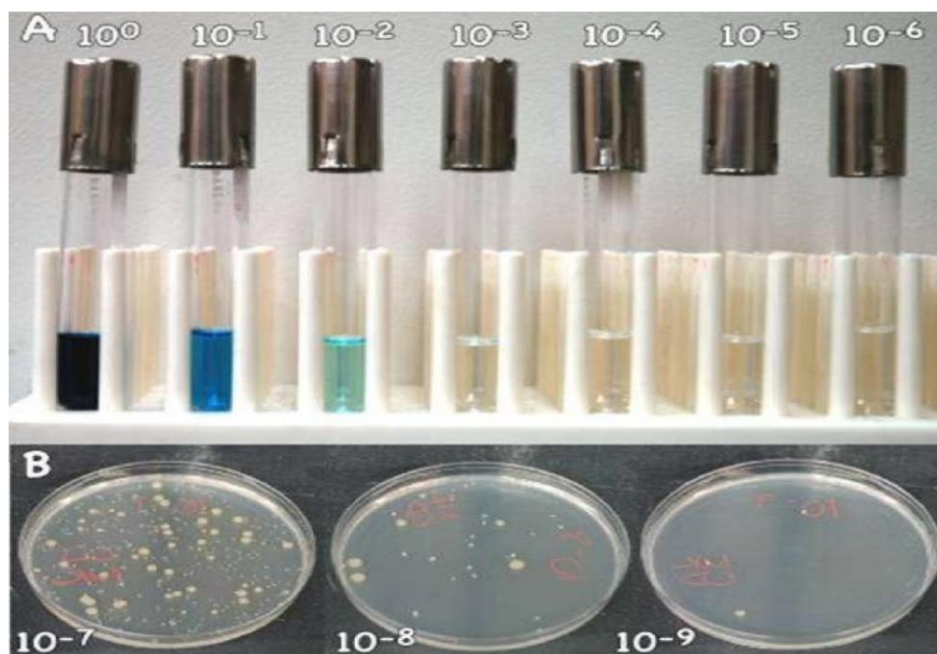
Кох әдісі (пластикаларда сұйылту әдісі)

Бұл әдіс үшін 15 мл балқытылған және 43-45°С дейін салқындатылған қоректік агары бар бірнеше пробиркалар қолданылады. Бірінші пробиркаға бактериялогиялық ілмекпен зерттелетін материалдың біреуін енгізіп, араластырылады. Осылайша, зерттелетін материал 10^{-1} , яғни 10 есе

сұйылтылады. Содан кейін, қыздырылған және салқындатылған ілмекпен 1-ші пробирканың құрамы 2-ге ауыстырылады, араластырылады және 10^{-2} сұйылтылады, сол сияқты 2 - ден 3-ке дейін және т.б. және қажетті мөлшерде 10 есе сұйылту алынады. Дайындалған сұйылтулар пробиркадан нөмірлеріне сәйкес келетін нөмірлермен белгіленген стерильді Петри табақтарына құйылады. Зерттелетін материалмен қоректік агар қатайғаннан кейін табақшалар термостатқа 37°C температурада 18-24 сағатқа орналастырылады (26-сурет). Табақшалардағы өсіп келе жатқан колониялардың саны зерттелетін материал сұйылтылған сайын азаяды және колониялар оқшауланады (27-сурет).



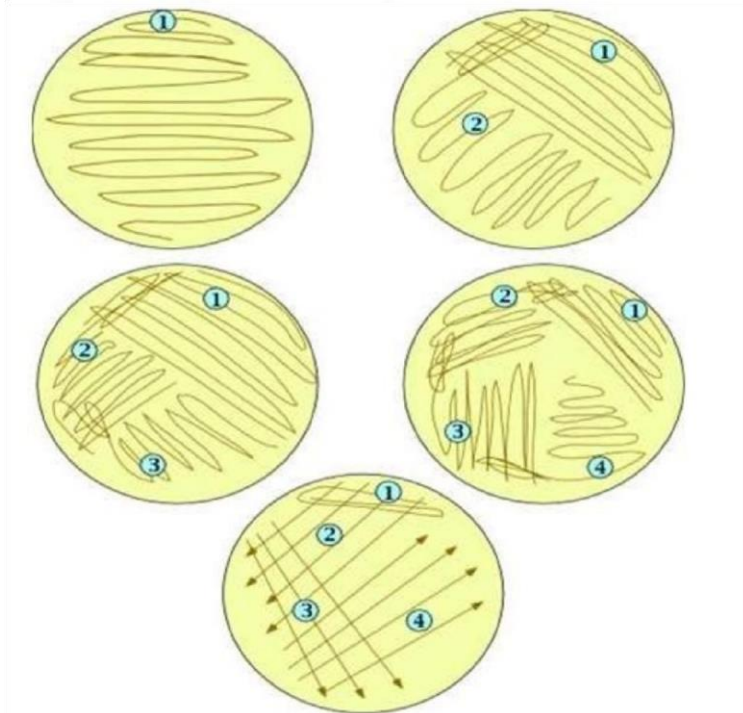
26 сурет - Кох әдісі бойынша бастапқы материалды сұйылту. Интернетжелісінен алынған.



27 сурет - Кох әдісі (Дайын нәтиже). Интернет желісінен алынған.

Азаятын штрихтар әдісімен себу

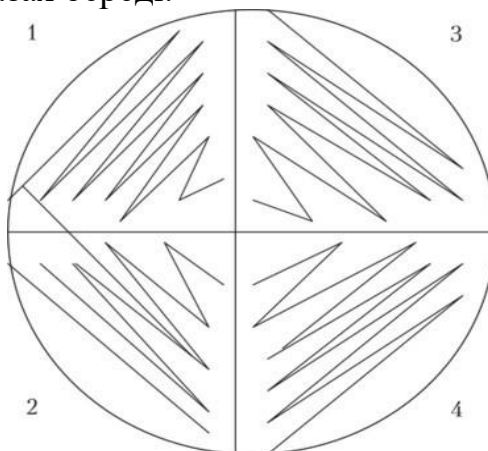
Бұл әдіс мол аралас микрофлорасы бар зерттелетін материалдан таза дақылдарды оқшаулау үшін қолданылады. Материалдың бір ілмегін алыңыз және тығыз қоректік ортаның бетіне себу суретте көрсетілгендей жасалады (28сурет). Себіндіні қоректік ортасының бүкіл бетінде жасауға болады немесе әр сектордың алдында ілмекті қыздыру арқылы секторларға себуге болады.



28 сурет - Азаятын штрихтар әдісімен себу. Интернет желісінен алынған.

Ілмекпен секторларға себу техникасы

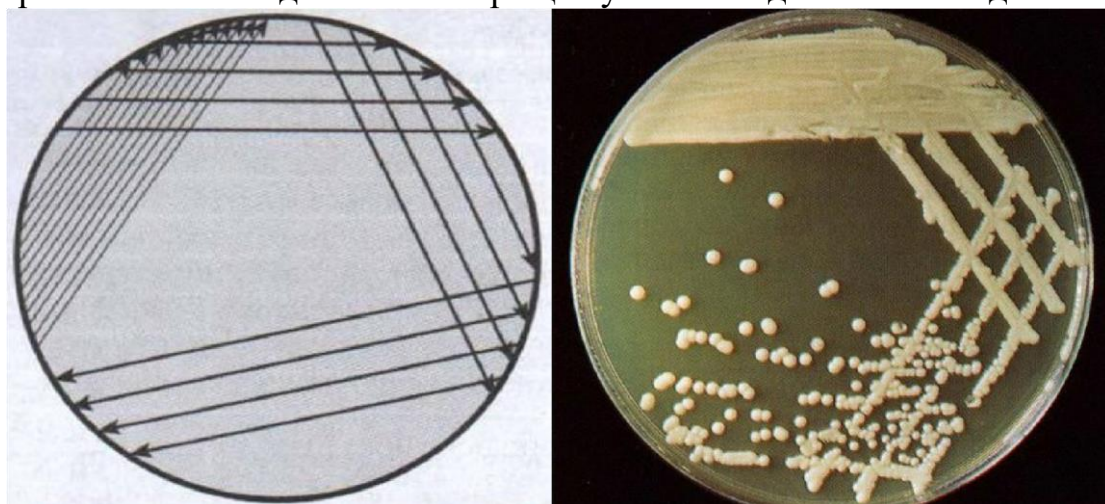
Петри ыдысындағы қоректік орта 4-5 радиалды секторға бөлінеді. Материалды стерильді ілмекпен алып, барлық секторларда бір ілмекпен кезеккестек, оны қыздырмай себеді (сурет 29). Өскен колониялардың саны сектордан секторға дейін азая береді.



29 сурет - Петри табақшасындағы ЕПА-ға ілмекпен секторларға себу схемасы. Интернет желісінен алынған.

Голд әдісімен себу

Мұны істеу үшін Петри ыдысы алдын-ала төрт секторға бөлінеді. Бірінші секторда зерттелетін материалды 20-30 штрих егу жасалады. Ілмек залалсыздандырылады, бірінші сектор материалынан екінші секторға 3-4 штрих жүргізіледі. Ілмекті қайтадан залалсыздандырып, екінші сектордан үшіншіге, материалды бірінші, содан кейін екінші штрих, содан кейін үшінші және төртінші штрихтар жасалады. Қайтадан ілмекті қыздырып, бірінші және төртінші секторлардың штрихтарына қиылыспайтынына көз жеткізіп, үшінші сектордан төртке штрих жасайды (сурет 30). Ең мол өсім бірінші секторда, одан әрі азаю бағытында колониялар оқшауланғанға дейін жалғасады.



30 сурет - Голд себу техникасы және дайын нәтиже. Интернет желісінен алынған.

Сондай-ақ, бактериялардың таза дақылдарын зерттелетін материалды элективті қоректік ортаға себу арқылы алуға болады. Мысалы, егер сіз зерттелетін материалды сарысулы-тұзды агарға (СТА) көп аралас микрофлорамен сепсеңіз, онда басқа бактериялардың өсуін тежейтін NaCl концентрациясының жоғарылауына байланысты тек стафилококк колониялары өседі.

Сондай - ақ, белгілі бір микробтардың белгілі бір температураға, қышқылдарға, сілтілерге, оттегінің парциалды қысымына, рН және т.б. төзімділігін ескере отырып, өсірудің ерекше жағдайларын жасау әдісі қолданылады, мысалы, туберкулезбен ауыратын науқастың қақырығы ілеспе микрофлорадан босату үшін күкірт қышқылымен немесе сілті ерітіндісімен өңделеді.

Сондай-ақ, механикалық және биологиялық бөлінуді біріктіретін комбинерленген әдіс қолданылады. Бактериялардың таза дақылын бөліп алу және бактериялардың осы түрінің концентрациясын бір уақытта анықтау үшін егу алдында осы материалды тұзды ерітіндіде сериялық сұйылту жүзеге асырылады.

Таза дақылды бөліп алғаннан кейін оны идентификациясы жүргізіледі, ол үшін бактериялардың түрі мен түр астын анықтау қасиеттер кешенін

егжейтегжейлі зерттейді (морфологиялық, культуралық, биохимиялық, антигендік, фагтарға, антибиотиктерге сезімталдық және т.б.).

Бөліп алынған бактериялардың биохимиялық қасиеттерін зерттеу

Биохимиялық (ферментативті қасиеттер) - бактериялардың ферменттермен күрделі органикалық қосылыстарды ыдырату қабілеті. Микроорганизмдердің әр түрі белгілі бір ферменттер жиынтығын синтездейді, бұл қабілет әртүрлі түрлерде ерекшеленетін гендер жиынтығымен байланысты, сондықтан ферменттің болуы немесе болмауы арқылы микроорганизмдердің түрін анықтауға болады. Ферментативті қасиеттерді зерттеу үшін қатаң арнайы құрамдағы қоректік орта қолданылады, оған зерттелген микроорганизмдердің таза дақылы бактериологиялық ілмекпен еңгізеді.

Биохимиялық қасиеттерді зерттеу таза аэробты дақылды бөліп алғаннан кейін III-ші кезеңінде басталады. Бөлінген таза дақылдағы сахаролитикалық (көмірсулардың ашытылуы) және протеолитикалық (ақуыздардың бөлінуі) қасиеттері міндетті түрде зерттеледі. Қажет болса, каталаза, оксидаза және т. б. сияқты басқа ферменттердің болуын зерттейді.

Бактериялардың сахаролитикалық қасиеттерін зерттеу

Микроорганизмдердің түріне байланысты көмірсулардың ашытуы әртүрлі заттардың пайда болуымен жүреді (май қышқылы, сірке қышқылы, алкоголь және ашытудың басқа түрлері). Альдегидтерді, қышқылдарды және газ тәрізді өнімдерді (CO_2 , H_2 , CH_4) қалыптастыру үшін әртүрлі көмірсулардың ыдырауы (әдетте "кант" деп аталады) әр түрлі көмірсулармен (лактоза, глюкоза және т.б.) сұйық немесе жартылай сұйық Гисс орталарына себу кезінде және Андрееде реагенті немесе сулы алқызыл индикаторы арқылы анықталады.

Гисс ортасы құрамы:

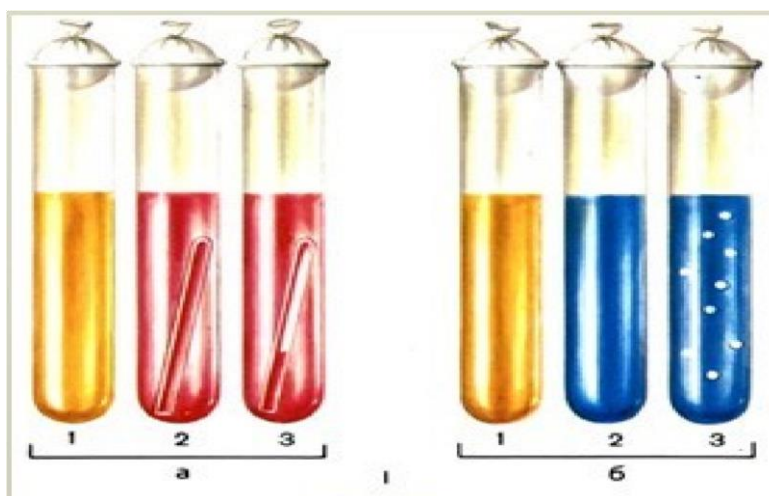
1. сұйық немесе жартылай сұйық қоректік (ЕПС, ЕПА) негіз;
2. субстрат (көмірсулардың немесе полиатомды алкогольдің 1% ерітіндісі) - глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маннит және т. б.
3. рН көрсеткіші.

Сұйық ортада Андрееде индикаторы қолданылады. Дайын ортада рН 7,27,4, түсі бозғылт қызғылт, қышқыл пайда болған кезде орта қызылға айналады.

Газды ұстап алу үшін шыны қалқыманы қолданады. Жартылай сұйық ортада ВР индикаторы қолданылады (Сулы көк және розол қышқылы), дайын орта түссіз. Орта қышқылдар түзсе көгереді, сілтілер түзсе – қызарады. Егер газ тәрізді өнімдер үздіксіз түзіле берсе, онда пайда болған газ бағанды бұзады.

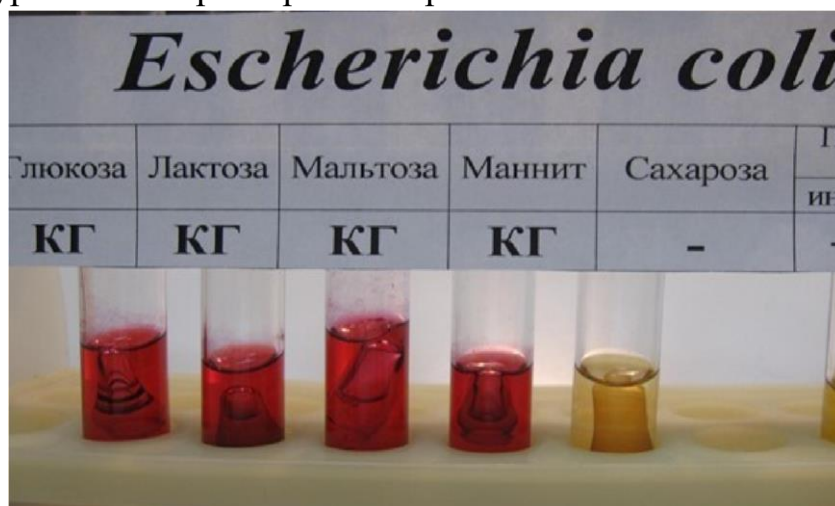
Гисс орталарын "түрлі-түсті" қатар деп те атайды, өйткені бактериялардың әртүрлі түрлеріндегі ферменттердің әртүрлі жиынтығына байланысты түрлітүсті түтіктердің (пробирка) ауысуы байқалады (31 сурет). Қысқа қатардағы 5 көмірсулардан (глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, маннит) және ұзын қатардағы көмірсулардан басқа, басқа моносахаридтер

(арабиноза, ксилоза және т.б.), полисахаридтер (инулин, крахмал, гликоген) және спирттерді (глицерин, дульцит, инозин) ажыратады.



а-көмірсулар мен Андреде индикаторы бар сұйық орта; б – ВР индикаторы бар жартылай сұйық орта; 1-көмірсулардың ыдырауы жоқ; 2-қышқыл түзетін көмірсулардың ыдырауы; 3-қышқыл мен газ тәрізді өнімдерді қалыптастыру үшін көмірсулардың ашытуы.

31 сурет - Гисс орталары. Интернет желісінен алынған.



Сахароза ашытылмайды, қалған көмірсуларқышқыл мен газ түзе ыдырайды

32 сурет – E. Coli қысқа қатары. Интернет желісінен алынған.

Сахаролитикалық қасиеттер Эндо, Левин, Плоскирев, Клиглер, Рессель, Олькеницкий және тағы басқа дифференциалды диагностикалық орталарда да зерттеледі.

Мысалы, Эндо ортасында негіз ретінде ЕПА, көмірсулар лактоза, фуксин және натрий сульфиті бар. Дайын орта бозғылт қызғылт түске ие. Бұл ортада лактозаны ашытатын бактериялар өскенде ацетилальдегидтің түзілуі нәтижесінде рН қышқыл жағына ауысады, натрий сульфитімен әрекеттесіп және фуксиннің қалпына келуіне әкеледі. Сондықтан Эндо ортасындағы лактозаға оң бактериялар (эшерихия) қою қызыл колонияларды, ал лактозаға

теріс (шигелла, сальмонелла) бозғылт қызғылт колонияларды құрайды (33 сурет).

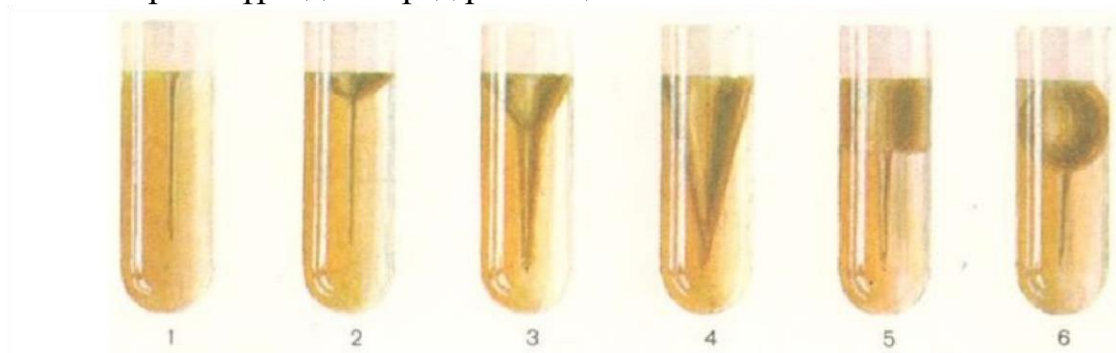


33 сурет - Эндо ортасында лактозаға теріс (солжақта) және лактозаға оң(оңжақта) бактериялардың өсуі. Интернет желісінен алынған.

Бактериялардың протеолитикалық қасиеттерін зерттеу.

Таза дақылдың протеолитикалық қасиетін зерттеу үшін желатинді, сарысулы, сүтті пептонды ортаға себінді жүргізеді.

Желатинді сұйылту. Желатиназа ферментін анықтау үшін желатин бағанына пробирканың түбіне дейін егу арқылы себінді жүргізіледі. Бірнеше күн бойы 22°C температурада инкубациялайды. Желатиназа болған кезде желатин сұйылтылады, воронка немесе "шырша" пайда болады (34 сурет). Сұйылту процесі жоғарыдан жүреді, әр түрлі микробтар оларға тән сұйылту формасын береді: шеге түрінде - тырысқақ вибрионы, шұлық түрінде стафилококк, қабат, яғни жоғарыдан төменге қарай - көк іріңді таяқша, төңкерілген шырша түрінде – күйдіргі таяқшасы.



34 сурет - Желатинді сұйылтудың әртүрлі формалары (шеге, воронка, шұлық, сталактит түрінде, жоғарыдан төменге қарай). Интернет желісінен алынған.

Сүт ақуызын ыдырату қабілетін казеинолитикалық белсенділікті зерттеу үшін, таза дақылды Эйкманның сүт агарына себіледі. Термостатта 36 ° сағат 2448-де инкубациялайды. Оң нәтиже пептонизацияда (сүтті ағарту) көрінеді,

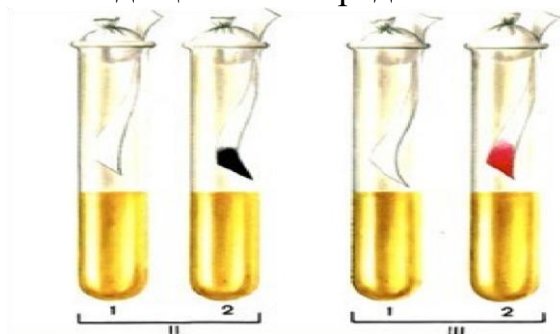
яғни колониялардың айналасында қоректік ортаның ақ сүт фонында мөлдір аймақтар пайда болады.

Пептондардың ашытуын зерттеу үшін бактериялар пептон суына немесе етті-пептонды сорпасына себеді. Пептонды ашытудың соңғы өнімдері - индол (C_8H_7N), күкіртсутек (H_2S), аммиак (NH_3) және басқа қосылыстар.

Күкіртсутекті табу үшін таза дақыл себілгеннен кейін ЕПС немесе пептонды суы бар пробиркаға тығынның астына қорғасын сірке қышқылының ерітіндісіне малынған сүзгі қағазының тар жолағы салынады. Егер күкіртсутегі болса, индикатор қағазы PbS күкірт қорғасынының пайда болуына байланысты қара болады.

Индолды анықтау үшін қымыз қышқылының қаныққан ерітіндісімен сіңдірілген индикаторлық қағазды қолданады, егер индол түзілсе қағаз қызарады. (35 сурет).

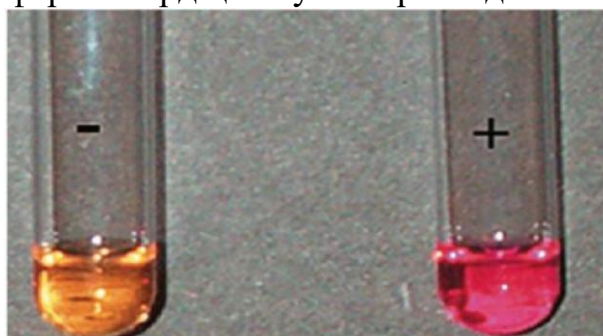
Аммиак ылғалданған лакмус қағазымен анықталады, ол да тығынның астына қойылады. Аммиак түзілген кезде қағаз көкгереді.



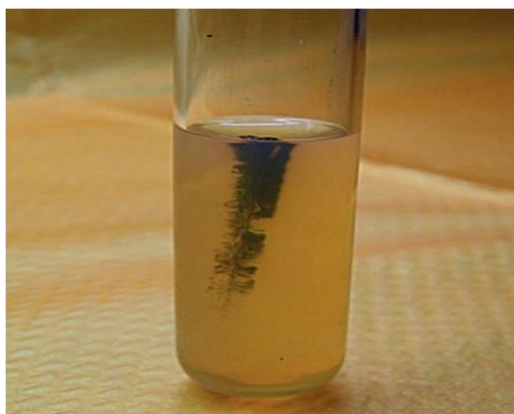
1-теріс нәтиже, 2-оң нәтиже

35 сурет - II-күкірт сутекті анықтау, III-индолды анықтау. Интернет желісінен алынған.

Қажет болған жағдайда уреаза (36 сурет), цистиназа (37 сурет), амин қышқылдарының декарбоксилазасы, фенилаланиндезаминаза, лецитиназа және т. б. сияқты басқа ферментердің болуын зерттейді.



36 сурет – Несеп нәрді ыдыратуы (уреаза сынағы). Интернет желісінен алынған.



37 сурет - Цистиназаға арналған тест (Пизу сынама). Интернет желісінен алынған.

Тотығу-тотықсыздану ферменттерінің белсенділігін анықтау

Каталаза сынағы стафилококктарды, энтеробактерияларды, микобактерияларды және басқа микроорганизмдерді дифференциалды диагностикалау үшін қолданылады. Каталаза сутегі асқын тотығын молекулалық оттегі мен суға ыдыратады. Бұл фермент облигатты аэробтар мен факультативті анаэробтарда бар, өйткені олардың тыныс алу процесінде сутегі асқын тотығы пайда болады және оны ыдырату үшін бұл фермент қажет. Каталазаны анықтау үшін 2 мл сұйық бактериялық дақылды бар пробиркаға жаңа дайындалған 3% сутегі асқын тотығының бірнеше тамшысын қосады. Газ көпіршіктерінің пайда болуы каталазаның болуын көрсетеді. Немесе зерттелетін таза дақылдың суспензиясының бір тамшысы тамызылады және оған 1-3% сутегі асқын ерітіндісінің тамшысы қосылады. Каталаза болған кезде газ көпіршіктері пайда болады (38 сурет).



38 сурет - Каталазаға сынама. Интернет желісінен алынған.

Оксидазаның бар болуын тексеретін сынақ псевдомонадаларды (оксидаза-оң) энтеробактериялардан (оксидаза-теріс) дифференциациялау үшін қолданылады.

Оксидаза аэробты тыныс алу түрі бар бактерияларда болады. Оксидазаны анықтау үшін тығыз ортада өскен бактериялық дақылдың бетіне 1% альфанафтолдың спирттік ерітіндісінің бірнеше тамшылары, 1% метолдың сулы ерітіндісі қосылады. Индофенолдың пайда болуына байланысты көккүлгін түстің пайда болуы оксидазаның болуын дәлелдейді (Эрлих әдісі).

Сондай-ақ, бұл сынақ үшін фенилендиаминмен сіңдірілген Окси-тесттің (А/Қ Лахема, Брно, Чехия республикасы) индикаторлық жолақтары жиі

қолданылады. Платина ілмегінің таза 18 сағаттық дақылы индикаторлық жолақпен (басқа металдардың әсерінен фенилендиаминнің каталитикалық тотығуы жүреді) сүртіледі және 1 минуттан кейін оксидаза болған кезде күлгінкөк бояу пайда болады (39 сурет).



39 сурет - Оксидаза сынағы. Интернет желісінен алынған.

Бактерияларды биохимиялық анықтаудың заманауи әдістері

Қазіргі уақытта бактерияларды биохимиялық анықтау үшін көбінесе дифференциалды диагностикалық ортаның орнына коммерциялық микро тест жүйелері қолданылады - құрғақ дифференциалды диагностикалық орталар немесе қажетті бактериялық фермент әсер етуі керек субстраттар орналастырылған тесіктері бар полистерол немесе картон планшеттер (40 сурет). Практикалық зертханаларда API (фирма "bioMereux", Франция), BBL Crystal (фирма "Becton Dickinson" АҚШ), MICRO-1a-TEST (фирма "PLIVALachema", Чехия) және тағы басқа диагностикалық панельдер қолданылады. Тест-жүйелердегі бөлінген таза дақылды индикациялау келесі түрде жүргізіледі:

- Таза дақылдан бактериялық суспензия тұзды ерітіндіде немесе буферде дайындалады.
- Дайындалған суспензияны планшеттің шұңқырына енгізеді.
- Инкубациялау(әдетте 18-24 сағатқа 37°C температурада).
- Инкубация кезінде шұңқырларда биохимиялық реакциялар жүреді, олардың нәтижесі индикатордың түсінің визуалды өзгеруімен немесе фотометр құрылғысының көмегімен бағаланады.
- Бактерияның дақылын биохимиялық белсенділік кестелерінің, компьютерлік бағдарлама немесе код кітаптарының көмегімен алынған нәтижелерді талдайды.



Вид системы для энтеробактерий после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительные, нижний – все отрицательны.



Вид системы для стафилококков после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительные, нижний – все отрицательны.

40 сурет - Биохимиялық идентификацияға арналған АРІ тест-жүйелері. Интернет желісінен алынған.

Жұмыстың орындалу барысы

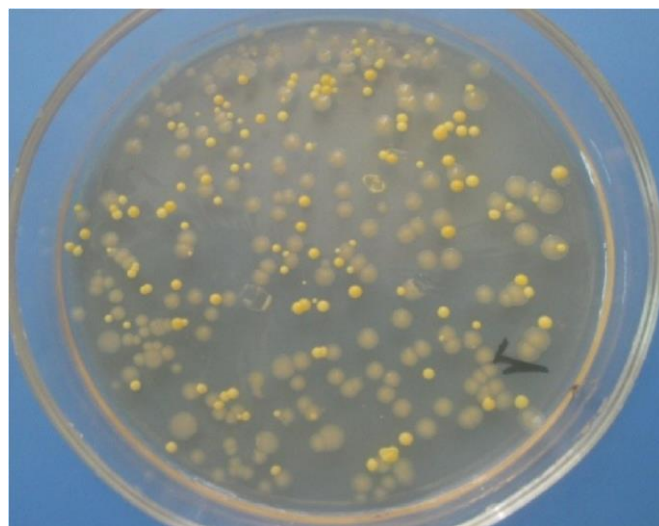
Таза дақылды бөліп алу процесі төрт кезеңнен тұрады және кем дегенде 4 (немесе одан да көп) күнді алады:

I кезең - зерттелетін материалдан (бактериялар қоспасынан) микропрепаратты дайындау, оны Граммен бояу, микроскопия, қоспаның құрамы туралы болжамды түсінік және қажетті қоректік ортаны таңдау туралы шешім қабылдау. Бактерияларды механикалық ажырату және оқшауланған колонияларды алу мақсатында Петри табақшасында (үлкен аумақ) тығыз ортаға зерттелетін материалды себу.

II кезең - қоректік ортадағы колонияның өсу сипатын зерттеу (41 сурет). Бактериялардың морфологиялық және тинкториялық қасиеттерін зерттеу үшін жағынды оқшауланған колониялардан дайындалады, Грамм әдісімен бояйды, микроскопиялайды. Колонияның қалдығын қиғаш ЕПА-ы бар пробиркаға таза дақылын алуға себеді. Себіндіні 18-24 сағат бойы 37°C температурада термостатқа қояды.

III кезең - қиғаш агардағы таза дақылды макроскопиялық және микроскопиялық (грам бойынша бояу) тексереді, егер дақыл таза болса, онда ол сахаролитикалық және протеолитикалық қасиеттерін зерттеу үшін Гисс және ЕПС дифференциалды диагностикалық орталарына себіледі.

IV кезең - биохимиялық зерттеулердің нәтижелері бағаланады. Гисс орталарында көмірсулардың ыдырауы мен газдың пайда болуының қышқыл өнімдерінің болуын белгілейді. ЕПС өсу сипатына назар аударады, ақуыз гидролизі өнімдерінің (күкіртсутегі мен индол) болуын атап өтеді. Бөлінген таза дақылдардың қасиеттерін зерттеу нәтижелері бойынша Берджи бактерияларының халықаралық детерминантын қолдана отырып, микроорганизмдердің түрлері анықталады.



41 сурет - Аэробтардың таза дақылын бөлудің II кезеңі. Бактериялар қоспасының өсуі. Интернет желісінен алынған.

№6 хаттама

Аэробтың таза дақылын бөліп алу.

Күні	Тексеруге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1 день	Пробиркадағы физиологиялық ерітіндідегі бактериялардың қоспасы.	1. Жағынды, грамм бойынша бояу, бактериоскопия; 2. Голд әдісі бойынша Петриыдысындағы ЕПА ілмекпен егу; 3. Себіндіні 24 сағатқа 37°C термостатқа орналастырады.	
2 день	Петри табақшасындағы ЕПА-дағы колониялардың өсуі.	1. Колониялардың өсуінзерттеу және сипаттау (схема бойынша) 2. Оқшауланған колонияларды іріктеу, жағынды, грамм бойынша бояу, микроскопия. 3. Колониялардың бір бөлігінқисайтылған ЕПА-ға себу; 4. Дақылдарды 24 сағатқа 37°C термостатқа орналастыру.	

3 день	Қиғаш ЕПА-ғы дақыл өсімі	1. Өсімді зерттеу жәнесипаттау. 2. Таза дақылды тексеру жағынды, Грамм бойынша бояу, микроскопия; 3. Түрлі-түсті қатарға себу(орта Гисс), ЕПС	
4 день	Гисс және ЕПС ортасындағы өсім	1. Ферментативті қасиеттердіесепке алу. 2. Бөлінген дақыл туралықорытынды.	

Материалдар мен жабдықтар: пробиркадағы физиологиялық ерітіндідегі бактериялардың қоспасы, спиртовка, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза заттық шынылар, препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар табақша, сүзгіш қағаз, шыны бойынша қарындаш (шыны график), дезинфекциялық ерітінді, ЕПА бар Петри табақшасы, термостат, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, Грамм бойынша бояғыштар жиынтығы, Гисс ортасы таза және себілген, пробиркадағы ЕПС, қисайтылған пробиркадағы ЕПА, индол мен күкіртсутекке арналған индикаторлық жолақтар.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 46-54.

2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Акад өңдеген. РФА в. В. Зверева мен проф. М. Н. Бойченко, ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 66-69.

1.7Зертханалық жұмыс №7

Тақырыбы: Анаэробтардың таза дақылын бөліп алу

Мақсаты: Анаэробтардың таза дақылын бөліп алу әдістерін игеру

Студент білуі керек:

1. Анаэробты жағдайлар жасау әдістері мен облигатты анаэробтарды өсіру принциптері

Студент жасай білу керек:

1. Перетц әдісі бойынша Китт-Тароцци ортасына және Вилсон-Блер ортасынаматериалды себу.

2. Бекітілген микропрепаратты дайындау және оны Грамм бойынша бояу.

3. Микроскоптың иммерсиялық жүйесімен микроскопиялық зерттеу.

4. Микропрепараттағы микроорганизмдерді морфологиялық және тинкториалды қасиеттеріне қарай ажырату.

Негізгі теориялық ақпараттар

Тыныс алу түрі бойынша аэробты және анаэробты микроорганизмдер ажыратылады.

Облигатты анаэробтар – ферментативті метаболизм арқылы энергия алады және оттегі ауасы бар жағдайда өспейтін микроорганизмдер. Сондықтан облигатты анаэробтардың таза дақұлын бөліп алу және анықтау үшін анаэробты жағдайлар жасау қажет. Сонымен қатар зерттеу материалын қоректік ортаға мүмкіндігінше жылдам себу керек.

Облигатты анаэробтарға арнайы тотығу-тотықсыздану потенциалы төмен яғни -10нан -40 мВ-ға дейін қоректік орталар дайындайды. Бұндай қоректік орталарға редуцирлеуші заттар цистеин, глюкоза, аскорбин қышқылы және тағы басқалар қосылады.

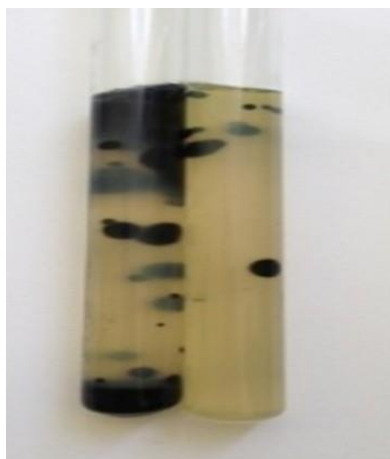
Тыныс алудың анаэробты түрі аэробтарға қарағанда өнімділігі бірнеше есе аз, сондықтан анаэробтар үшін қоректік орталар қоректік субстраттар мен дәрумендерге әлдеқайда бай болуы керек. Практикалық зертханаларда келесі орталар жиі қолданылады:

1. **Китт-Тароцци ортасы** – Хоттингер сорпасы негізінде 0,5% глюкоза және сиыр бауыры немесе тартылған ет бөліктерін қосып (ортада еріген оттегін сіңіру үшін) дайындалып, пробиркаларға құйылады. Себу алдында қоректік ортаны қайнатады (регенерациялайды), онда еріген ауаны кетіреді, 45С-қа дейін тез суытады, себеді және ауадан оттегінің диффузиясын болдырмас үшін 1 см қабатта стерильді вазелин майымен құяды (42 сурет).



42 Сурет - Бактериялық өсімі бар Китт-Тароцци ортасы

2. **Вильсон-Блер ортасы** – қоректік агарға 1% глюкоза, 0,08% темір хлориді, 1% натрий сульфиті қосылады. Сульфитті редуцирлеуші анаэробтардың, мысалы, клостридиялар бұл қоректік ортада қара түсті колониялар түрінде Na_2SO_3 -тің Na_2S -ке қалпына келтіру арқылы өседі және, оның $FeCl_2$ -мен әрекеттесу нәтижесінде қара түс FeS түзеді (43 сурет).

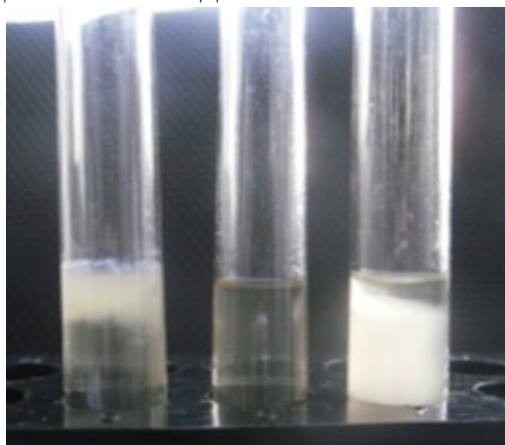


43 сурет - *Cl. Perfringens* өсімі бар Вильсон-Блер ортасы. Интернет желісінен алынған.

3. **Анаэробты қанды агар – эритрит агарына 199** ортасын, гемин, твин 80, менадион қосылады.

4. **Қант агары** – 1% глюкоза қосылған эритрит агарын негіз ретінде қолданылады.

5. **Тиогликоль ортасы немесе стерилділікті бақылау ортасы** – құрамы пептон, глюкоза, натрий хлориді, натрий тиогликолаты, натрий сульфиті және натрий гидрокарбонатынан, 0,7% агар-агардан тұрады. Бұл қоректік ортада аэробтар өскенде үстіңгі бөлігінде бұлыңғыр болады (44 сурет). анаэробтар төменгі бөлігінде (оң жақтағы пробирка, пробирка ортасында - бақылау). Бұған ортаның жартылай сұйық күйін қамтамасыз ететін агар-агар мен пробирка түбінде анаэробты жағдайды сақтайтын натрий тиогликолаты арқасында қол жеткізіледі.



Ортадағы пробирка-бақылау, сол жағындағы-аэробтар өсімі, оң жағындағы-анаэробтар өсімі

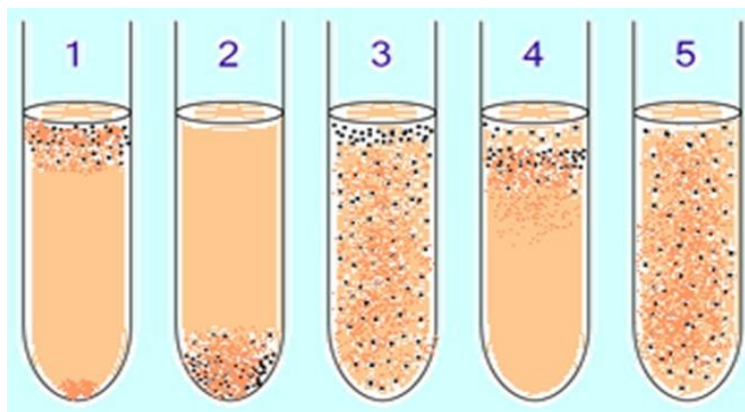
44 сурет - Тиогликоль ортасы. Интернет желісінен алынған.

Анаэробты бактерияларды жағдай жасау үшін оған физикалық, химиялық және биологиялық әдістерді дайындалған және қолданады.

Анаэробты жағдайларды құру әдістері Физикалық әдістер

1. Тығыз немесе жартылай сұйық ортаның жоғары бағанасында өсіру. Биік бағанды дайындау үшін қоректік орта түтіктің көлемінің 3/4 бөлігін алатындай етіп, кем дегенде 10 мл мөлшерінде түтікке құйылады. Себінді бағанаға егу арқылы жүзеге асырылады, ал облигатты аэробтар түтіктің жоғарғы жағында, оттегі көп жерде, ал облигатты анаэробтар төменгі жағында, тотығу – тотықсыздану потенциалы төмен жерде өседі.

Факультативті анаэробтар негізінен жоғарғы бөлігінде шоғырланады (тотығу фосфорлануы гликолизге қарағанда энергетикалық жағынан тиімді), бірақ олар O_2 -ге тәуелді емес болғандықтан ортаның барлық жерінде өседі (45сурет).



1 аэробтар; 2 облигатты анаэробтар; 3 факультативті анаэробтар;

4 микроаэрофилдер; 5 аэротолерантты бактериялар

45 сурет - Жартылай сұйық қоректік агардың жоғары бағанындағы өсім сипаттамасы. Интернет желісінен алынған.

Микроаэрофильдер оттегінің төмендетілген концентрациясын қажет етеді және пробирканың жоғарғы жағында өседі.

Аэротолерантты анаэробтар оттегі концентрациясына әсер етпейді және пробиркада біркелкі таралады.

2. Сұйық қоректік орталардың регенерациясы себу алдында 15-20 минут қайнату арқылы тез 45Сқа дейін жылдам суытады және зерттеу материалын себеді. Себуден кейін ортаға, ауадағы оттегінің диффузиясын болдырмас үшін, 1 см қабатта стерильді вазелин майымен құйылады.

3. Механикалық әдіс - ол герметикалық жабылған ыдыстардан (анаэроостаттар) вакуумдық сорғыны пайдалана отырып, ауаны шығарудан, кейіннен оны инертті газбен (азот, аргон, гелий) немесе табиғи газбен ауыстырудан тұрады (46 сурет).



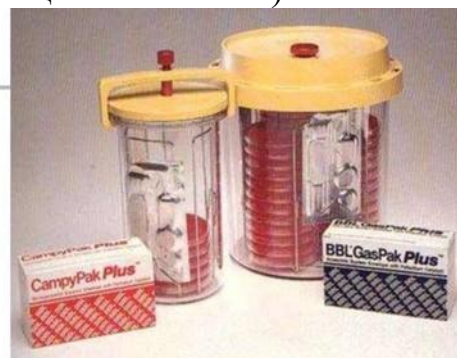
46 сурет – Анаэростат. Интернет желісінен алынған.

Химиялық әдістер

1. **GasPak типті газ генерациялайтын жүйелер** анаэробизм жағдайын жасау үшін H_2 және CO_2 түзілуіне байланысты және оттегі сіңіргіш ретінде пирогаллолдың сілтілі ерітіндісі, натрий дитиониті, металл темірі, натрий гидросульфиті және басқа реактивтер қолданылады (47 сурет). Анаэробизм дәрежесін бақылау үшін арнайы индикатор бар.

Мысалы, GasPak Anaerocult-A жүйесі Clostridium, Bacteroides, Fusobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus тектес анаэробты бактерияларды өсіруге анаэробты жағдай жасайды. GasPak Anaerocult-C жүйесі CO_2 8-10%, O_2 5-6% концентрациясы бар микроаэрофильді жағдайлар жасайды. Мұндай атмосфера Neisseria, Campylobacter, Haemophilus, Legionella, Lactobacillus, Bifidobacterium тектес бактерияларды өсіру үшін қажет.

2. 2. Тотығу-тотықсыздану потенциалын төмендету үшін **қоректік ортаға редуцирлейтін заттарды қосу** (глюкоза және басқа қанттар, тиогликоль қышқылы, натрий құмырсқа қышқылы және т.б.).

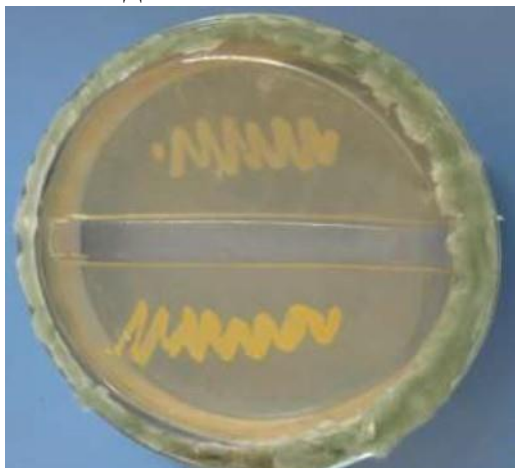


GasPak — система химическим путем обеспечивает постоянство газовой смеси приемлемой для роста большинства анаэробных микроорганизмов. В герметично контейнере, в результате реакции воды с таблетками бикарбоната натрия образуется водород и углекислый газ. Водород затем реагирует с кислородом газовой смеси на катализаторе с образованием воды.

47 сурет - GasPak типті газ түзуші жүйелер. Интернет желісінен алынған.

Биологиялық әдістер

1. **Фортнер әдісі** негізі қоректік ортада анаэробтар мен аэробтар біріктіріп дақылдандыру. Ол үшін қоректік ортаны (қанды агар) Петри табақшасында стерильді шпательмен агар ортасына жолақ жасап екіге бөледі. Бір жартысына аэробты дақыл, екіншісіне анаэробты дақыл себіледі (48 сурет). Екі жарты табақшаны пластилин, балауыз, парафиннің көмегімен герметикалық жауып, термостатта инкубациялайды. Бірінші, аэробтардың өсуі орын алады, олар жабық кеңістіктен оттегімен қамтамасыз етілгеннен кейін анаэробтардың өсуі басталады.



48 сурет - Фортнер әдісі. Интернет желісінен алынған.

2. Қоршаған ортадағы оттегінің адсорбциясы үшін **жануарлардың тіндерін** (бауыр, бүйрек және басқа ішкі мүшелердің бөліктері) **қоректік ортаға қосу** (мысалы, Китт-Тароцци ортасындағы бауыр бөліктері).

Облигатты анаэробтардың таза дақылдарын бөліп алу әдістері.

Цейссер әдісі.

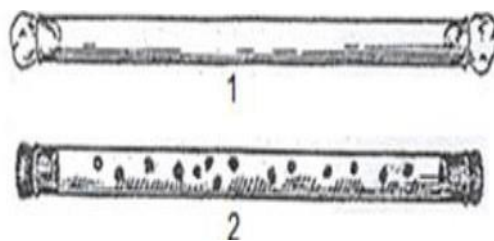
Зерттелетін материал анаэробтарға арналған тығыз қоректік ортаның (қант, қан агары және т.б.) бетіне штрихтармен себіледі және анаэробтар немесе GasPак типті жүйеге орналастырылады. Өскен колониялардың таза дақылды алу үшін және оны зерттеу үшін тиогликоль қоректік ортасына немесе КиттТароцци ортасына ауыстырады.

Вейнберг әдісі.

Себу қант агарының биік бағанасына егу арқылы жүргізіледі, облигатты анаэробтардың өсуі пробирканың түбінде орналасады.

Вейон-Виньял әдісі.

Еріген және 45°C дейін салқындатылған қоректік агарға зерттелетін материал себіледі, араластырылады және егілген агар 30x0,5 см стерильденген шыны түтікке сорылады. Түтіктің екі ұшы тығындармен жабылып, термостатқа орналастырылады. Егер себінді тым қалың болмаса, онда ортада бактериялардың сырттан айқын көрінетін колониялары өседі, оларды қажетті колония орнында түтікшені кесу арқылы алуға болады (49-сурет).



49 сурет - Вейона-Виньял әдісі. Интернет желісінен алынған.

Перетц әдісі.

Зерттелетін материалды 10-15 мл тығыз қоректік ортада (қант агары, Вильсон-Блер ортасы) ерітеді және 45С дейін суытады, араластырады және стерильді Петри табақшасына құяды, оның түбіне стерильді екі шыны немесе ағаш таяқша заттық шыны қояды. Пробирканың ішіндегісін әйнек астынан шыны мен Петри табақшасының түбінің арасын толтырып, одан ауаны түгел шығаратындай етіп құяды (50 сурет). Табақша қақпақпен жабылып, термостатқа салынады. Анаэробтар колониялары шыны астындағы қоректік ортаның қалыңдығында өседі. Содан кейін әйнек алынып, таза дақылды бөліп алу үшін жеке колонияларды Китт-Тароцци ортасында себеді.



50 сурет - Перетц әдісі. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың барысы:

Анаэробтардың таза дақылдарын бөліп алу 4 күнді алады.

1-күн – материалдың жинақталуы. Зерттелетін материал Китт-Тароцци қоректік ортасына себіледі, себу алдында 20 минут қайнатылады және салқындатылады. Себінді вазелин майымен құйылады. Материалды сепкеннен кейін вегетативті флорасын жою үшін ортаны 80 градусқа 15 минут қыздыруға болады; анаэробтардың споралары жойылмайды. Себіндісі бар пробиркалар термостатқа орналастырылады.

2-күн – бір күннен кейін ортада лайлану байқалады, кейде онда газ көпіршіктері көрінеді. Жағындылар жасалады, Грам бойынша боялады, ірі споралы және спорасыз грам-оң таяқшалар кездеседі. Әрі қарай Китт-Тароцци ортасынан тығыз қоректік ортаға (қант агары, Вильсон-Блер ортасы және т.б.) көшіру әртүрлі әдістермен (Цейслер, Вейнберг, Перетц және т.б.) жүзеге асырылады.

3-күн

- а) дақылдарды қарау, оқшауланған колонияларды белгілеу, микроскопия жүргізу және таза дақылды бөліп алу үшін Китт-Тароцци ортасына оқшауланған колонияларды қайта себу. Себінді вазелин майымен құйылады;
б) термостатта инкубациялау (37°C).

4-күн

- а) Китт-Тароцци ортасынан жағынды дайындап таза дақылын тексеру үшін микроскопиялайды (кемінде 40 көру өрісінде зерттеледі);
б) бөлініп алынған таза дақылдың басқа қасиеттерін зерттеу.

ХАТТАМА №7 Анаэробтардың таза дақылын бөліп алу

Күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	Физиологиялық ерітіндідегі топырақ	1. Китт Тароцци ортасына топырақ суспензиясын себу. 2. Термостатта 37 с 24 сағат	
	суспензиясы	инкубациялау	
2	Китт-Тароцци ортасындағы өсу	1. Өсімнің сипатын зерттеу жәнесипаттау. 2. Жағынды дайындау, Грам бойынша бояу, микроскопиялық зерттеу, суретін салу. 3. Перетц әдісі бойынша Вильсон-Блерортасына себу. 4. Термостатта 37 та 24 сағатқа дейін инкубациялау.	
3	Перетц әдісі бойынша Вильсон-Блер ортасының қалыңдығындағы колониялардың өсуі	1. Колонияларды зерттеу және сипаттау. 2. Оқшауланған колониялардан жағындыдайындау, Грам әдісімен бояу, микроскоппен зерттеу, суретін салу. 3. Оқшауланған колонияларды КиттТароцци ортасына себу. 4. Термостатта 37та 24 сағатқа дейін инкубациялау.	
4	Китт-Тароцци ортасындағы өсу	1. Өсімнің сипатын зерттеу жәнесипаттау. 2. Өсімнің тазалығын тексеру үшін жағынды дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскопиялық зерттеп, суретін салу. 3. Бөлініп алынған дақыл туралы қорытынды жасау.	

Материалдар мен жабдықтар: спирт шамы; бактериологиялық ілмек; пробиркаларға арналған штатив; стерильді 0,9% NaCl ерітіндісі бар пробирка; Грам әдісі бойынша бояғыштар жиынтығы; жуғыш; таза заттық шынылар; бояуға арналған препараттарға арналған шыны «көпір» бар науа; фильтрленген қағаз; шыныда сызуға арналған қарындаш (әйнекграф); дезинфекциялық ерітінді; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық майы; таза және егілген Китт-Тароцци ортасы бар пробиркалар; топырақ суспензиясы бар пробирка; балқытылған және 45С Вильсон-Блэр ортасына дейін салқындатылған пробирка; Перетц әдісі бойынша себу үшін шыны сырғымалы стерильді Петри табақшасы; Перетц әдісі бойынша ВильсонБлэрдің ортасындағы колониялардың өсімімен табақша, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 54-60.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 69-71.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.47-54.

1.8. Зертханалық жұмыс №8

Тақырыбы: Гемагглютинация реакциясы арқылы тауық эмбрионындағы вирустың индикациясы

Мақсаты: вирустық гемагглютинация реакциясын есепке алу және жасау әдісін меңгеру

Студент білуі керек:

1. Облигатты жасушаішілік паразиттер ретінде вирустарды дақылдандыру ерекшеліктері;
2. Тауық эмбрионында, жасуша дақылдарында және сезімтал жануарлар организмдерінде вирустарды индикациялау әдістері мен принциптері.

Студент білуі керек:

1. Аллантоис сұйықтығымен гемагглютинация реакциясын қою және оның нәтижесін дұрыс интерпретациялау.

Негізгі теориялық ақпараттар

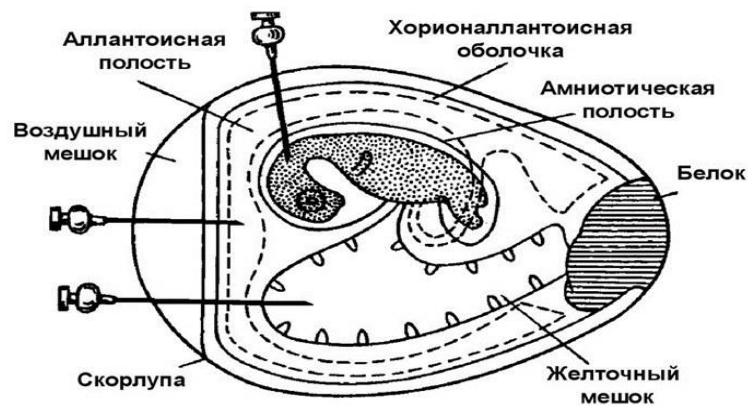
Тауық эмбрионының тіндерінде (51 сурет) адам мен жануарлардың көптеген патогенді вирустар көбеюге қабілетті.

Бұл вирусты дақылдандыру әдісінің артықшылықтары:

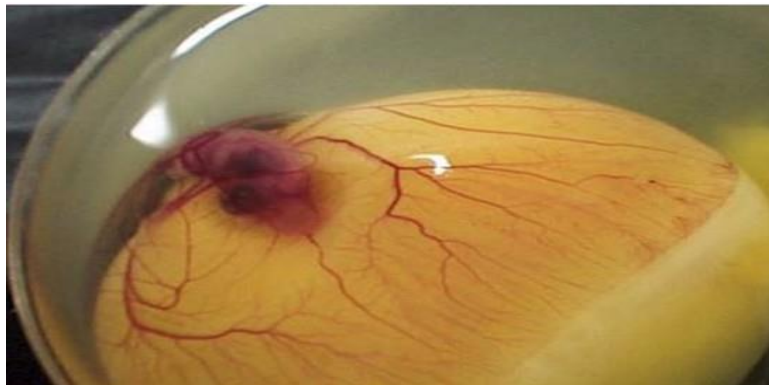
- тауық эмбриондары стерильді және қабығы оларды микроорганизмдердіңенуінен сенімді қорғайды;
- эмбриондар адамның көптеген патогендік вирустарына сезімтал;
- құрамында вирусы бар материалдың көп мөлшерін алуға болады;- әдіс қарапайым және кез-келген вирусологиялық зертханада қол жетімді.

Әдістің кемшіліктері:

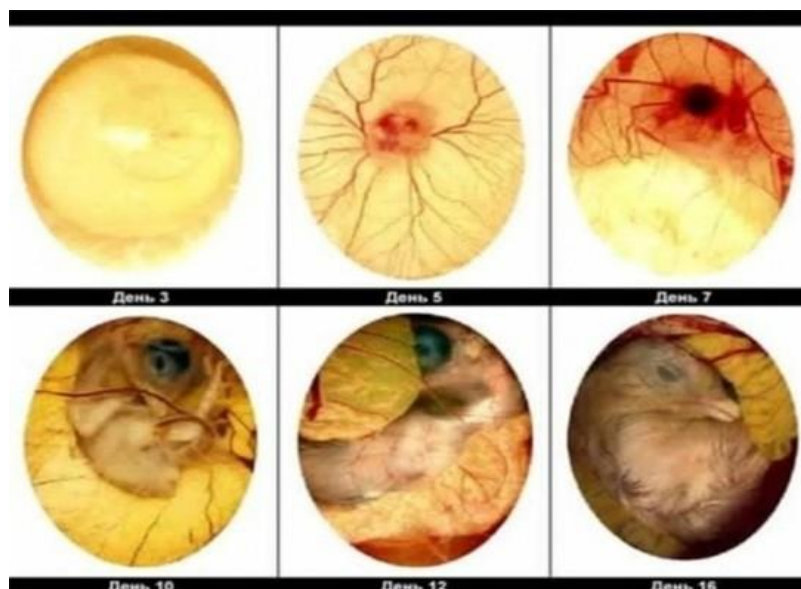
- барлық вирустар тауық эмбрионында көбейе алмайды;
- тауық эмбрионы жабық жүйе болып табылады, сондықтан инфекциядан кейін патологиялық өзгерістерді байқау қиын;
- жұқтырған тауық эмбриондарын аутопсиялау кезінде көрінетін өзгерістер жиі байқалмайды және вирусты анықтау үшін гемагглютинация реакциясы және басқа әдістер қолданылады.



51 сурет - Тауық эмбрионының құрылысы. Интернет желісінен алынған.

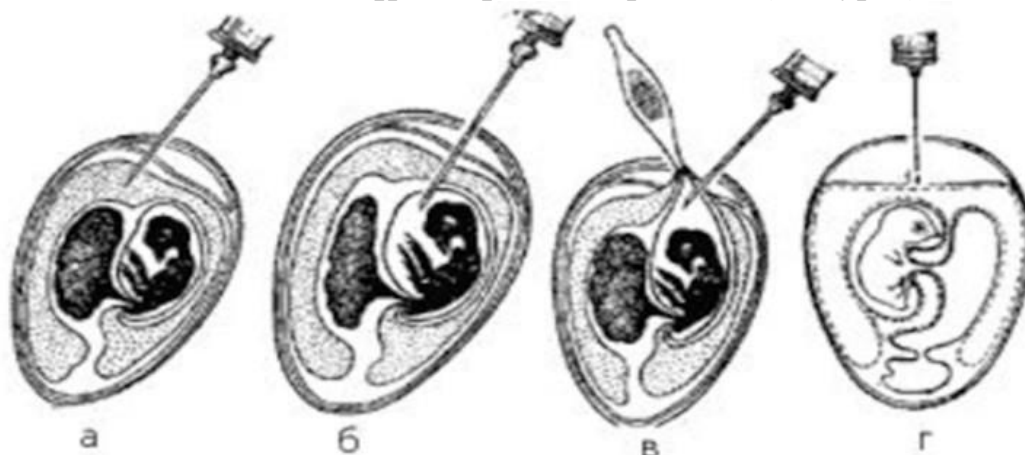


52 сурет - Тауық эмбрионының 10 күнгі инкубациясы. Интернет желісінен алынған.



53 сурет - Тауық эмбрионының дамуы (күндік). Интернет желісінен алынған.

Вирусологиялық зерттеулер үшін 7-12 күндік тауық эмбриондары қолданылады (52, 53-сурет). Вирустың тропизмі мен биологиялық қасиеттеріне байланысты инфекция амниотикалық және аллантоистық қуыста, сарыуыз қапшығында, тауық эмбрионының хорион-аллантоистық қабығында ашық немесе жабық түрде жүзеге асырылады (54-сурет).



а- аллантоис қуысында; б- амнионға жабық жолмен; в- амнионға ашық жолмен; г- хорионаллантоистық қабыққа

54 сурет - Тауық эмбриондарына вирусты жұқтыру әдістері. Интернет желісінен алынған.

Гемаагглютинация реакциясы (ГАР) - гемагглютининдері бар кейбір вирустардың әр түрлі жануарлардың, құстардың, адамдардың эритроциттерінің желімденуін тудыру қабілетіне негізделген және вирустарды тауық эмбриондарында индикациялау үшін қолданылады (55 сурет). Тұмау вирустарымен эритроциттердің агглютинациялану құбылысын алғаш рет 1941 жылы Г.Хёрст сипаттаған.

ГАР кезеңдері:

- Вирустық гемагглютинин мен эритроциттердің рецепторларының өзара әрекеттесуі арқылы эритроциттерге вирустың адсорбциясы.
- Эритроциттердің желімденуі;
- Элюция (вирустық ферменттердің әсерінен эритроциттердің рецепторларының бұзылуы және эритроциттердің бетінен вирустың ажырауы).



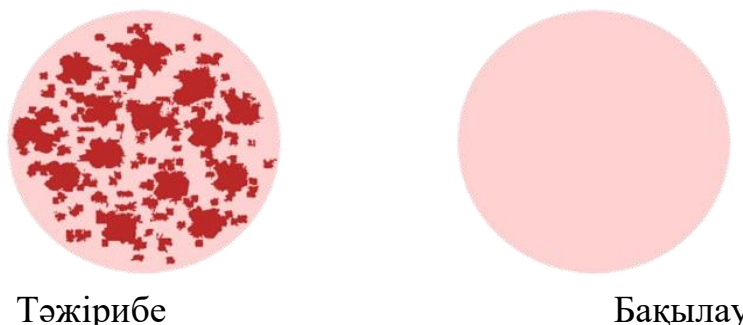
55 сурет - Вирустық гемагглютинация механизмі. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың барысы:

ГАР қою үшін қажет:

- құрамында вирусы бар материал (бұл жағдайда аллантоикалық сұйықтық);
- изотониялық NaCl ерітіндісіндегі эритроциттердің (тауық, адам) 5% суспензиясы;
- NaCl изотоникалық ерітіндісі (электролит).

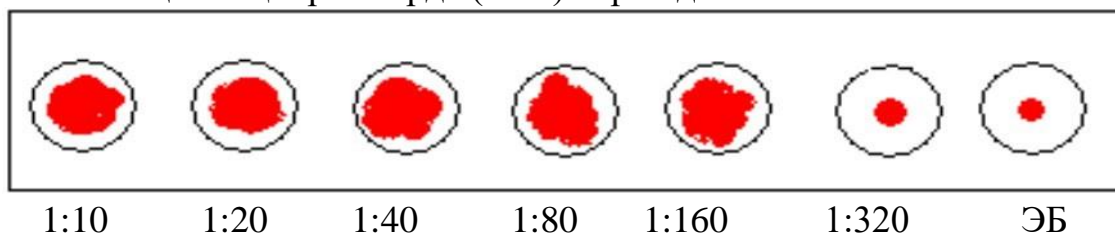
Заттық шыны үстіне аллантоис сұйықтықтың бір тамшысын (тәжірибе) және NaCl изотоникалық ерітіндісінің (бақылау) тамшысын тамызады. Екі тамшыға да эритроциттердің 5% суспензиясын қосып, араластырады. 3-5 минуттан кейін реакцияны есепке алады. Егер реакция оң болса, онда тәжірибелік тамшы мөлдірленеді (ашық түске ауысады), оның ішінде эритроциттердің түйіршікті тұнбасы пайда болады (56 сурет). Егер вирус жоқ болса немесе гемагглютинин болмаса, екі тамшы да түйіршікті шөгіндісіз лайланып қалады.



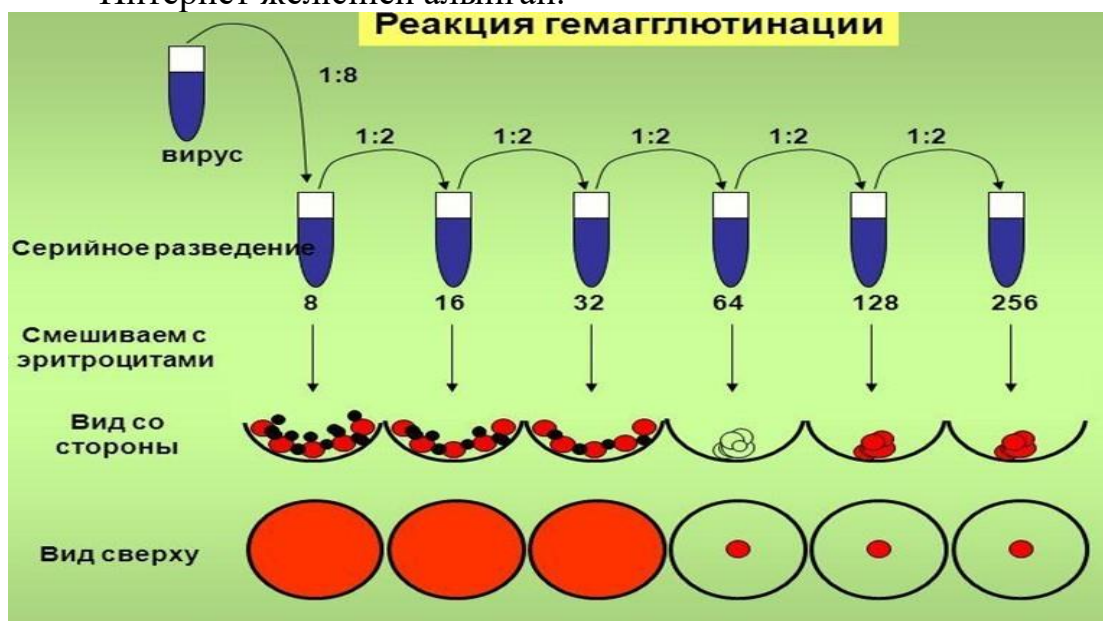
56 сурет - Вирустық гемагглютинация реакциясының оң нәтижесі. Интернет желісінен алынған.

ГАР вирустарды индикациялау үшін ғана емес, олардың санын (титрін) анықтау үшін де қолданылады (57 сурет). Вирус титрі-бұл эритроциттердің стандартты суспензиясын толығымен агглютинациялайтын вирусы бар

материалдың максималды сұйылтуы (58-сурет). Вирустың титрі
гемагглютинациялық бірліктерде (ГАБ) көрінеді.



57 сурет - Вирустың гемагглютинация титрін анықтау. Бұл жағдайда 1:160.
Интернет желісінен алынған.



Бұл жағдайда - 1:32

58 сурет - Вирустың гемагглютинация титрін (ГАР) анықтау. Интернет
желісінен алынған.

№8 ХАТТАМА

**Тақырыбы: «Гемагглютинация реакциясының көмегімен тауық
эмбрионындағы вирусты анықтау»**

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	Вирус жұқтырылған тауық эмбрионының аллатоис сұйықтығы	1. Тауық эритроциттерінің 5% суспензиясымен гемагглютинация реакциясын (ГАР) жүргізу 2. Нәтижені ескеру, суретін салу 3. Қорытынды жасау	

Материалдар мен жабдықтар: спирт шамы; бактериологиялық ілмек; пробирка үшін штатив; стерильді физиологиялық ерітіндісі бар пробирка; таза эйнектер; шыны «көпір» бар науа; сүзгі қағаз; шыныдағы қарындаш (стеклограф); дезинфекциялық ерітінді; аллантаикалық сұйықтығы бар пробирка, тауық эритроциттерінің 5% суспензиясы бар пробирка.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Оқу құралы // Редакциялаған профессор В.Б.Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - GEOTAR-Media, - 2012, - б.281-295.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық жаттығуларға нұсқау. Редакциялаған акад. РАС В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, - GEOTARMedia, - 2012, - б.87-94.
3. Микробиологиядағы зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Редакциямен проф. ФУНТ. Борисов, - Мәскеу «Медицина»

1.9. Зертханалық жұмыс №9

Тақырыбы: Фагтардың трансдукциясы бойынша тәжірибесі

Мақсаты: трансдукция тәжірибесін қою әдісін меңгеру және оның нәтижесін интерпретациялау

Студент білуі керек:

1. Бактериялар мен вирустардың геномының ерекшеліктерін;
2. Микроорганизмдердегі мутациялар мен генетикалық рекомбинациялардың түрлері мен механизмдері.

Студент жасай білуі керек:

1. Трансдукциялық тәжірибенің нәтижесін дұрыс интерпретациялау.

Негізгі теориялық ақпараттар

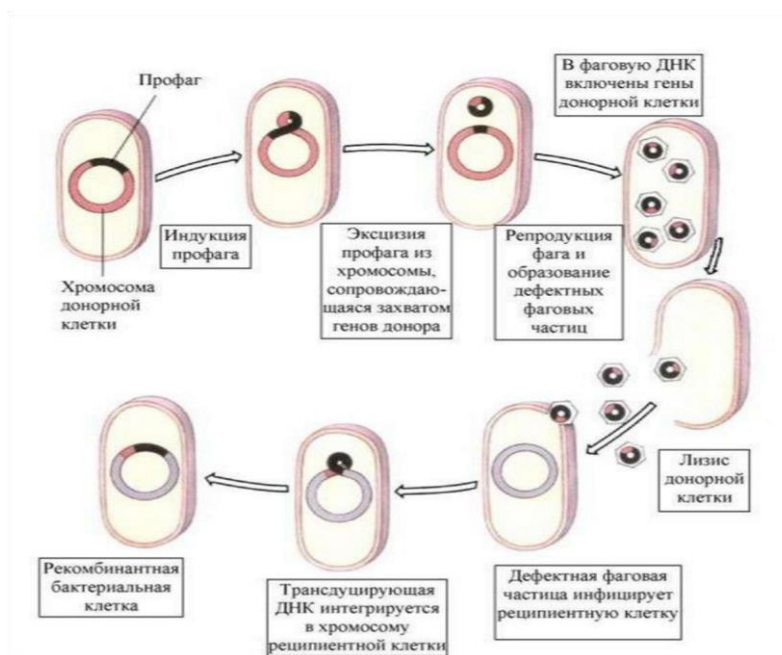
Генетикалық ақпаратты донор-бактериядан реципиент-бактерияға фаг көмегімен көшіру трансдукция деп аталады. Трансдукция бактерияларда фагтардың көбеюі процесінде фагтық ДНҚ-мен бірге немесе оның орнына бактериялық ДНҚ фрагменттері болатын фаг бөлшектерінің түзілуі мүмкін екендігіне негізделген. Мұндай фаг бөлшектерін трансдукцияланушы деп атайды. Жаңа жасушаларды жұқтырған кезде мұндай фагтар реципиент бактерияларға донордың генетикалық материалын тасымалдайды. Кейбір фагтар бактериялардың әртүрлі гендерін (спецификалық емес трансдукция), ал кейбіреулері қатаң белгілі бір бактерияның (спецификалық трансдукция) тасымалдайтыны анықталды.

Спецификалық трансдукция кезінде вирус бактериялардың ДНҚ фрагментін өз геномына енгізеді және оны реципиент бактерияларды лизогендеу арқылы тасымалдайды.

Спецификалық трансдукцияның ең танымал мысалы - λ фаг арқылы жүзеге асырылатын. Әлсіз фаг λ бактериялардың лизогенизациясы кезінде сайт спецификалық рекомбинация (ДНҚ жіпшелерінің үзілуі және айқас қайта қосылуы) нәтижесінде бактериялардың хромосомасының bio және gal локустарының арасындағы аймағына тіркеледі. Профаг индукциясы кезінде фаг ДНҚ-ның хромосомадан шығуы сайт спецификалық рекомбинация механизмі бойынша да жүзеге асырылады, бірақ профаг шыққан кезде миллионға бір рет жиілікпен ол жақын орналасқан gal немесе bio учаскелерін алады (59-сурет). Нәтижесінде бактериялық геномның профагқа іргелес аймағы бактериялық хромосоманың құрамынан алынып, бос фаг геномының құрамына енеді. Профаг геномының ілмектегі орналасуына сәйкес аймақ бактериялық хромосомада қалады.



1. Әлсіз бактериофагтың ДНҚ-ның донорлық жасуша хромосомасының белгілі бір аймағына интеграциясы. 2. - хромосомадан шыққан кезде көрші бактерия гендерін (мысалы, ламбда фагында «гал» немесе «био») ұстау 59 сурет - Негізгі кезеңдері. Интернет желісінен алынған.



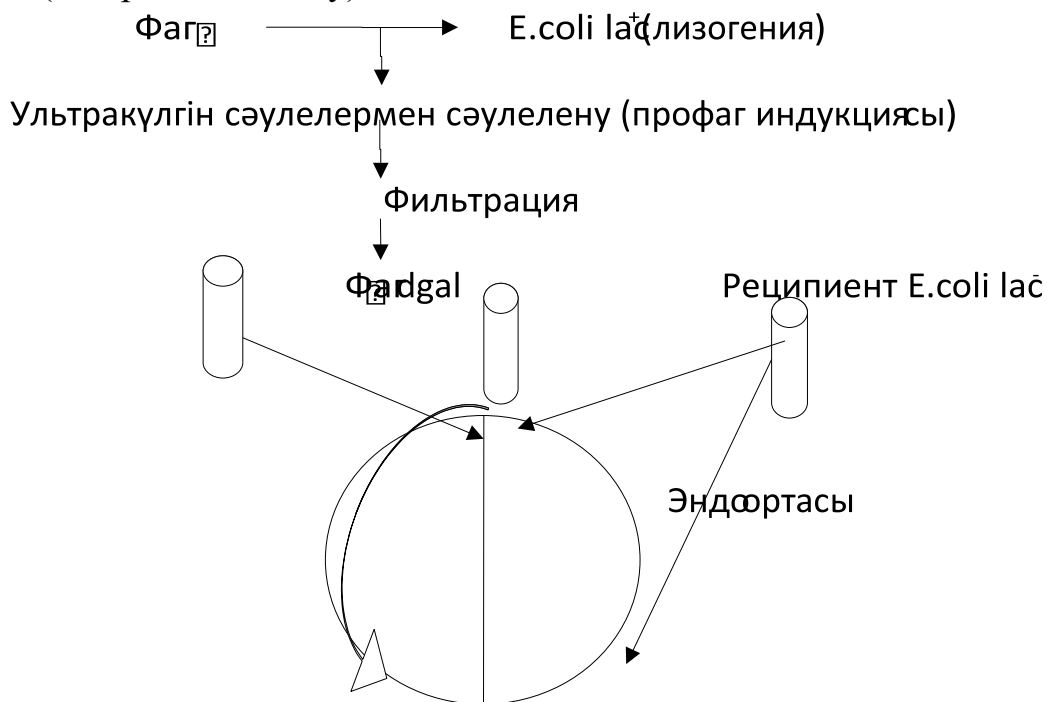
60 сурет - Спецификалық трансдукция механизмі. Интернет желісінен алынған.

Профаг λ индукциясы кезінде құрамында gal локусының гендері бар ақаулы бөлшектердің жиі түзілетіні анықталды. Мұндай ақаулы бөлшектер λ dgal (λ фаг, defective, gal) деп аталады. Егер λ фаг геномында биотин синтезіне жауапты ген болса, онда ол λ dbio. Сондықтан, егер реципиент жасушаларды био– немесе гал– донорлық бактерияларды құрамында ақауы бар бөлшектері бар фаг λ жұқтырғаннан кейін алынған фаголизатпен өндесе, 10^{-5} – 10^{-6} жиілікте био + немесе гал өткізгіштер түзіледі.

Осылайша, спецификалық трансдукция жасалу үшін донорлық бактерияларды алдын ала лизогенизациялау және одан кейін жасушалардан профагты индукциялау қажет (60 сурет). Пайда болған ақаулы трансдукциялық фаг бөлшектері реципиент штаммының жасушаларын зақымдайды, олар лизогенизацияланады және донордың бактериалды геномының бір бөлігімен профаг реципиент хромосомасына енгізіледі.

Трансдукция бойынша тәжірибенің барысы:

Лактозаны ыдыратпайтын ішек таяқшасының реципиенттік культурасы (*E. coli* lac-) Петри табақшасындағы $\frac{1}{2}$ Эндо ортасына себіледі - «бақылау». Фаголизатты (орташа бактериофаг dgal арқылы *E. coli* lac+ лизисі өнімі) реципиент дақылымен араластырып, 37°C термостатта 60 минут ұстайды және Эндо ортасының екінші жартысына себіледі– «тәжірибе» (61 сурет). Себіндіні термостатқа 37° С бір тәулікке қояды. Нәтижелерді есепке алу кезінде Петри табақшасының секторларында микробтардың өсу сипаты мен болуы анықталады (тәжірибе, бақылау).



61 сурет - Трансдукция бойынша экспериментті қою схемасы. Интернет желісінен алынған.

Ескерту

Эндо ортасының құрамында ЕПА, лактоза, фуксин және натрий сульфиті бар. Дайын қоректік орта бозғылт қызғылт түсті болады. Лактозаны Эшерихия ыдыратқанда, натрий сульфитімен әрекеттесіп, фуксиннің азаюына әкелетін ацетилальдегидтің түзілуі нәтижесінде рН қышқыл жағына ауысады. Сондықтан эндо ортасындағы ішек таяқшасының лактоза-оң штамдары металл жылтырлығы бар қара-қызыл колонияларды құрайды. Лактоза-теріс ішек таяқшалары бозғылт қызғылт колониялар түзеді (62 сурет).



62 сурет - Эндо ортасындағы лактоза-оң (оң) және лактоза-теріс (солжақта) колониялар. Интернет желісінен алынған.

Хаттама №9

Фагтардың трансдукциясы бойынша тәжірибесі

Күні	Зерттелетін материалдар	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	1. E.coli Іасштаммреципиент 2. λ dgal трансдукцияла нушы фаг	1. Петри табақшасындағы Эндо ортасының 1/2 бөлігінде реципиент штаммын ілмекпен себу. 2. 1 мл стерильді физиологиялық ерітіндісіне реципиент штаммының 1 ілмегі және λ dgal трансдукцияланушы фаг бар пробиркаға қосыңыз 3. Фаг пен реципиент бар пробирканы 60 минутқа термостатқа салу, содан кейін одан Эндо ортасының екінші жартысына себу. 4. Себілген Эндо ортасы бар табақшаны 37°C температурада бір тәулікке термостатқа салу.	
2	Эндо ортасындағы өсу	1. Колонияның өсу нәтижелерін есепке алу. 2. Хаттаманы тіркеу. 3. Қорытынды.	

Материалдар мен жабдықтар: спирт шамы; бактериологиялық ілмек ; пробиркаларға арналған шта штат; 1 мл стерильді физиологиялық ерітіндісі бар пробирка; реципиент E.coli lac⁻ культурасы бар пробирка; λdgal трансдуцирлеуші фагпен пробирка; таза Эндо ортасы бар Петри табақшасы; Колония өсімі бар эндо орта; шыныдағы қарындаш (стеклограф); дезинфекциялық ерітінді, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Оқулық // Редакциялаған профессор В.Б.Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - GEOTAR-Media, - 2012, - б.70-74
2. Микробиология, вирусология. Практикалық жаттығуларға нұсқау. Редакциялаған акад. РАС В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012 ж.
3. Микробиологиядағы зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Редакциямен проф. ФУНТ. Борисов, - Мәскеу «Медицина»

1.10. Зертханалық жұмыс №10

Тақырыбы: **Тіс жұғындысын микроскопиялық зерттеу.**

Мақсаты: Тіс жұғындысынан микропрепарат дайындау техникасын игеру және оны микроскопиялық зерттеу игеру.

Студент білуі керек:

1. Ауыз қуысы микрофлорасының сапалық және сандық құрамының ерекшеліктері.

Студент істей білуі керек:

1. Тіс жұғындысынан бекітілген микропрепарат дайындау және микроскоп арқылы микроорганизмдерді морфологиялық және тинкториалды қасиеттеріне қарай ажырату.

Негізгі теориялық ақпараттар

Ауыз қуысы микроорганизмдер үшін қоректік заттардың және оңтайлы температура мен ылғалдылықтың болуына байланысты қолайлы орта болып табылады. Сілекейде олардың саны 1 мл-де 5 миллионнан 5 миллиард, тіс жұғындысында 1 миллионнан 1 миллиардқа дейін жетеді. Әртүрлі зерттеушілердің пікірінше, ауыз қуысында табылған бактерия түрлерінің саны 400-ден 700-ге дейін жетеді. Түрлердің әртүрлілігі адамның жасына, оның өмір салтына, гигиеналық әдеттеріне, тістердің күйіне, тұқым қуалаушылыққа, тамақтану сипатына және т. б. байланысты.

Ауыз қуысының микрофлорасы резидентті (тұрақты) және факультативті (кездейсоқ) болып бөлінеді. Ауыз қуысының резиденттік микрофлорасы негізінен облигатты анаэробты бактериялармен (барлық микробтық түрлердің

3/4 бөлігі), қалған түрлері факультативті анаэробтар мен аэробтармен ұсынылған.

Ауыз қуысы микрофлорасының маңызды өкілдерінің сипаттамасы (1 кесте).

Staphylococcus туыстастығы. Стафилококктар – жүзім тәрізді грам оң кокктар, сау адамның ауыз қуысында стафилококктар орта есеппен 30% жағдайда кездеседі. Дені сау адамдардың тістері мен қызыл иектерінде негізінен *Staphylococcus epidermidis* кездеседі. Кейбір адамдардың аузында *Staphylococcus aureus* болуы мүмкін, ауыз қуысының іріңді-қабыну ауруларын тудыруы мүмкін.

Streptococcus туыстастығы. Стрептококктар ауыз қуысының негізгі тұрғындары болып табылады (1 мл сілекейде 10^8 – 10^{11} стрептококкқа дейін). Боялған жағындыларда стрептококктар тізбек түрінде орналасады, грам-оң. Олардың көпшілігі факультативті анаэробтар немесе микроаэрофильдер, бірақ қатаң анаэробтар да бар (мысалы, пептострептококктар). Айтарлықтай ферментативті белсенділікке ие стрептококктар көмірсуларды сүт қышқылының түзілуімен ашытады, сүт қышқылының ашытуын тудырады. Ашыту нәтижесінде пайда болатын қышқылдар ауыз қуысында кездесетін бірқатар шіріткіш микробтардың өсуін тежейді. Ауыз қуысында 100% жағдайда *S. salivarius* және *S. mitis* болады. *S. sanguis* көп мөлшерде тістерде, ал *S. salivarius* негізінен тіл бетінде кездеседі. Ауыз қуысында тек тіс шыққаннан кейін ғана *S. mutans* және *S. sanguis* анықталды. Тіс жегісінің дамуында *S. mutans* тобындағы оральді стрептококктар жетекші рөлді атқарады.

Veillonella туыстастығы – топтасып, жұптасып немесе қысқа тізбекте орналасқан ұсақ анаэробты грам-теріс кокктар. Биохимиялық белсенділіктің ерекшеліктеріне байланысты вейлонеллалар сірке, пирожүзім және сүт қышқылдарын жақсы ыдыратады, яғни басқа бактериялардың қышқылдық алмасу өнімдерін бейтараптандырады және кариесогенді стрептококктардың антагонистері болып табылады, тіс жегісінің дамуын болдырмайды.

Neisseria туыстастығы. *Neisseria* - грам-теріс бұршақ тәрізді диплококктар. Қатаң аэробтар. Нейссерия әрқашан сау адамдардың ауыз қуысында көп мөлшерде кездеседі (1 мл сілекейге 1–3 миллионға дейін), онда олар резидентті бактерияларды тұрақтандырғыштық түр ретінде маңызды рөл атқарады.

Enterococcus туыстастығы. грам-оң сопақша кокктар, жұп немесе қысқа тізбекте орналасқан. Факультативті анаэробтар. Көбінесе одонтогендік инфекция, стоматит, периодонтит кезінде кездеседі.

Fusobacterium туыстастығы адам мен жануарлардың ауыз қуысынан оқшауланған 10-нан астам түрі кіреді. Фузобактериялар грам-теріс анаэробты таяқшалар, мөлшері мен пішіні бойынша бірдей емес, әсіресе патологиялық материалда, олар кокктарға, таяқшаларға, ұзын жіптерге ұқсауы мүмкін. Дақылдарда олар түзу немесе қисық таяқшаларға, үшкір ұштары бар қысқа

жіптерге ұқсайды. Трепонемалармен бірге ойық жаралы некротикалық стоматит пайда болады.

Leptotrichia (Leptotrichia туыстастығы) ұштары үшкір немесе ісінген әртүрлі қалыңдықтағы ұзын жіпшелердің сыртқы түрі бар, тығыз өрім береді және түйіршікті таяқшалар түрінде жұптасып орналасуы мүмкін. Грам теріс анаэробтар.

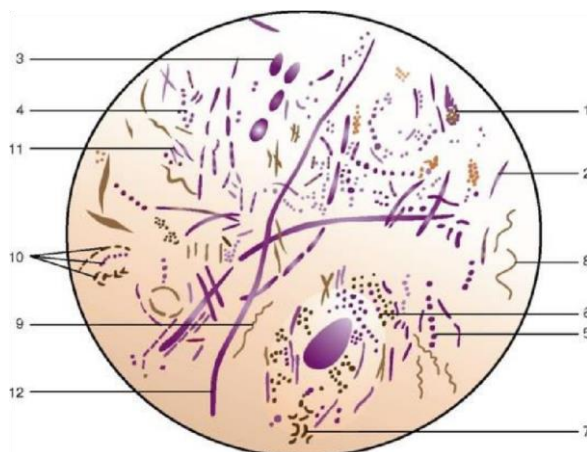
Актиномицеттер (Actinomyces) - жасушалары әдетте ұзын және тармақталған жіп тәрізді болады, кейбір жағдайларда біржасушалы саңырауқұлақтардың мицелийіне ұқсайды, бірақ таяқша тәрізді және коккты формалар да кездеседі. Мицелиалды жіптердің ұзындығы 100–600 мкм, қалыңдығы 0,2–1,2 мкм. Грам бойынша боялуы оң. Тіс кариесінің, периодонтиттің, актиномикоздың дамуына қатысады.

Lactobacillus туыстастығы (Lactobacillus casei, Lactobacillus fermenti, Lactobacillus brevis) – грам-оң таяқшалар, көбінесе тізбектей орналасады, облигатты анаэробтар, сүт ашытуды тудырады және сүт, сірке қышқылдары, спирт, көмірқышқыл газын түзеді. Тісжегісі кезінде ауыз қуысында лактобактериялардың саны артады және кариозды зақымданулардың мөлшеріне байланысты. Сондай-ақ лактобактериялар ауыз қуысының микробиоценозының қалыптасуында маңызды тұрақтандырғыш рөл атқарады, өйткені бактероидтар мен фузобактериялар сияқты басқа микроорганизмдердің өсуіне қажетті В және К топтарының витаминдерін синтездейді.

Bacteroides туыстастығы – ұсақ грам-теріс таяқшалар мен кокобактериялар, облигатты анаэробтар, спора түзбейді, қозғалмайды, қызыл иектің қалтасында мекендейді.

Treponema туыстастығы – қозғалмалы иірімделген микроорганизмдер, грам-теріс, анаэробтар, қызыл иек қалтасының тұрғындары. Олар пародонт ауруларының қоздырғыштары болып табылады.

Candida саңырауқұлақтар туыстастығы псевдомицелий түзетін грам-оң сопақша бүршіктенетін жасушалар. Иммундық тапшылық жағдайында олар белсендіріледі және шырышты қабаттардың кандидозын, висцеральды кандидозды және тіпті сепсисті тудырады.

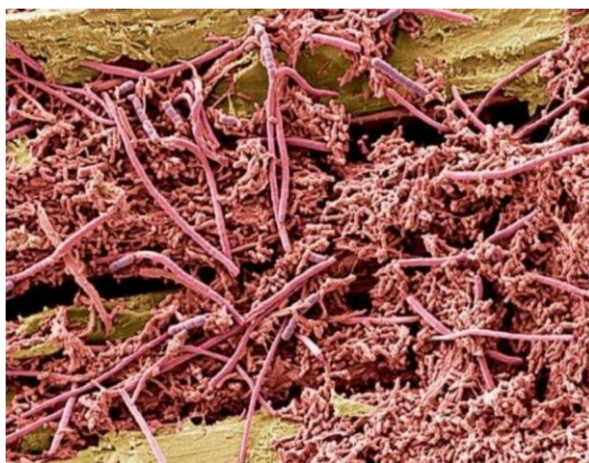


1 - вейлонелла; 2 - фузиформды бактериялар; 3 - Candida

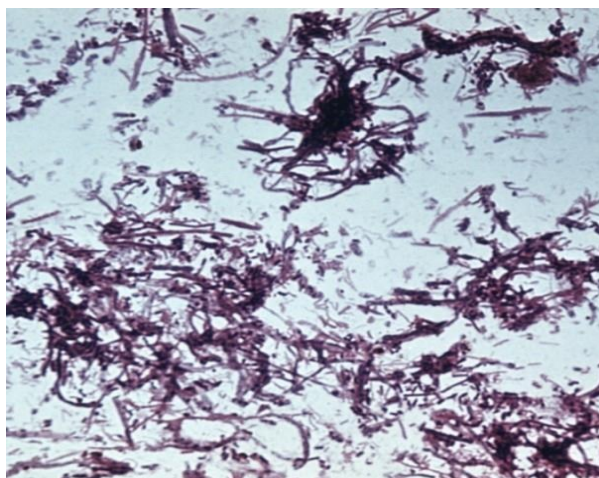
саңырауқұлақтары; 4 - микрококктар; 5 - стрептококктар; 6 - стафилококктар; 7 - вибриондар; 8 - спириллар; 9 - спирохеттер; 10 - лактобактериялар; 11 бактериоидтар; 12 – лептотрихтар
67 сурет - Тіс жұғындысының жағындысы (Грам бойынша). Интернет желісінен алынған.

Кесте 1 – Ауыз қуысының микроорганизмдердің сандық және сапалық құрамы

Микроорганизмдер	Сілекейде		Тіс-қызыл иек қалталарында анықтау жиілігі
	Анықтау жиілігі, %	1 мл-дегі мөлшері	
Аэробтар және факультативті анаэробтар			
<i>S. mutans</i>	100	$10^5 - 10^6$	80
<i>S. salivarius</i>	100	10^7	100
<i>S. mitis</i>	100	$10^6 - 10^8$	70
Сапрофитті нейссериялар	90	$10^3 - 10^4$	70
Лактобактериялар	90	$10^3 - 10^4$	70
Стафилококктар	80	$10^3 - 10^4$	50
Дифтероидтар	80	вариабельді	50
Гемофилдер	50	вариабельді	50
Пневмококктар	30	вариабельді	30-ға жуық
Сапрофитті микобактериялар	50	$10^2 - 10^4$	30-ға жуық
Актиномицеттер	60	вариабельді	50
Ашытқы саңырауқұлақтар	50	$10^2 - 10^3$	70
Микоплазмалар	50	$10^2 - 10^3$	30-ға жуық
Облигатты анаэробтар			
Вейлонеллалар	50	$10^2 - 10^3$	70
Анаэробты стрептококктар	50	$10^3 - 10^4$	30
Бактероидтар	30	$10^2 - 10^3$	100
Фузобактериялар	75	$10^2 - 10^3$	100
Лептотрихиялар	100	$10^2 - 10^4$	100
Актиномицеттер және анаэробты дифтероидтар	100	вариабельді	100
Спириллалар және вибриондар	70	$10^3 - 10^4$	100
Спирохеталар	80	$10^2 - 10^4$	100



64 сурет - Тіс жұғындысы(электрондық микроскопия). Интернет желісінен алынған.



65 сурет - Тіс жұғындысының жағындысы (Грам бойынша боялған). Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

Тіс жұғындысын тіс аралық саңылаулардан немесе тіс мойнынан тіс жұғындысы стерильді тіс тазалағыштын көмегімен алады және алдын-ала жағылған 1-2 тамшы физиологиялық ерітіндіге майсыздандырылған заттық шыны бетіне жағады. Содан кейін тіс жұғындысын физиологиялық ерітіндіге ілмекпен араластырылады, біртекті суспензия дайындалады және шыны бетіне біркелкі таратады. Спирт шам жалынының үстіне кептіргеннен кейін жағынды бекітіледі және Грам бойынша боялады (65 сурет).

Микроскоппен иммерсия жүйесін қолдана отырып (63 сурет), тіс микробиотасының тән өкілдерін анықтайды және альбомға сурет салады.

ХАТТАМА № 10 Ауыз қуысының микрофлорасы

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
------	-------------------	----------------	--------

1	Тіс жұғындысы	1.Стерилді тіс шұқығышпен материалды алу. 2.Жағынды, Грам бойынша бояу, микроскопия. 3.Суретін салу. 4.Қорытынды.	
---	---------------	--	--

Материалдар мен жабдықтар: стерилді тіс шұқығыштар, спирт шамы, сірінке, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив; стерилді физиологиялық ерітіндісі бар пробирка; Грам бойынша бояуға арналған анилинді бояғыштардың жұмыс ерітінділерінің жиынтығы; жуғыш; таза заттық шынылар; микропрепараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа; сүзгі қағаз; шыны бойынша қарындаш (стеклограф); дезинфекциялау ерітіндісі бар ыдыс; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық май.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 54-60.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 80-87.
- 3.Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б.47-54.

1.11. Зертханалық жұмыс № 11

Тақырыбы: Ауаның жалпы микробтық санын (ЖМС) седиментациялық әдіспен анықтау

Мақсаты: Жабық бөлмелердің ауасының ЖМС анықтау үшін седиментациялық әдісті игеру.

Студент білуі керек:

1. Жабық бөлмелердің ауасының санитарлық-көрсеткіш микроорганизмдерінің микрофлорасы мен тізбегін;
2. Жабық бөлмелердің ауасының санитарлық-микробиологиялық зерттеу әдістерінің анықталатын көрсеткіштері мен мәнін. **Студент жасай білуі қажет:**

1. Ауаны тұндыру әдісімен егу;
2. Омелянский формуласы бойынша ауаның жалпы микробтық санын (ЖМС) есептеу;
3. Нәтижелерді түсіндіру.

Негізгі теориялық ережелер

Ауа микроорганизмдер үшін қолайсыз орта болып табылады, бұл олардың тұрақты мекендейтін ортасы емес, тек микроорганизмдердің

уақытша болуы немесе тасымалдануы үшін қажет, алайда олардың саны айтарлықтай көп болуы мүмкін. Ауада қоректік заттар жоқ, тұрақты қолайлы температура болмайды, көбінесе ылғал болмайды, күн сәулелері микробтарға зиянды әсер етеді. Микроорганизмдер ауаға негізінен шаң немесе тамшылар арқылы топырақ бетінен, өсімдіктерден, жануарлардан, көліктерден, су бетінен түседі. Ауа әсіресе шаң-тозаңдар мен адамдардың көп жиналуы жағдайында микроорганизмдермен қатты ластанады. Ауадағы микробтар біркелкі таралмайды. Әртүрлі көлемдегі бөгде қосындылар тазартылмаған ауада суспензияланады: 0,03-0,30 мкм – вирустар, бактериялар; 10,0-100,0 мкм – шаң бөлшектері; 30,0-200 мкм – талшықтар, шаштар. Бактериялар ауада аэрозоль түрінде болады, бөлшектердің өлшеміне қарай фазаларға бөлінеді: а) үлкен тамшы немесе тез тұнбалы фаза – диаметрі 100 мкм-ден жоғары тамшылар; б) кіші ядролық фаза – диаметрі 10 мкм кем тамшылар мен бөлшектер. Олар ұзақ уақыт өлшеулі күйде болады, ал кейбіреулері тұнбаға дейін кеуіп кетеді («бактериалды шаң»).

Жабық бөлмелердің ауасының микрофлорасы тұрақты және өтпелі болып табылады. Резидентті микрофлора негізінен сапрофиттермен ұсынылған: липохромды пигменті бар бактериялар (сарциндер, микрококктар, сапрофитті стафилококктар және т.б.), спора түзетін таяқшалар (бациллалар), зең және ашытқы тәрізді саңырауқұлақтар. Өтпелі патогенді және шартты бактериялар, вирустар негізінен ұсынылған: алтын түстес және эпидермиялық стафилококк, коринобактериялық дифтерия, туберкулездық микобактерия, көк ірің таяқшасы, энтеробактерия) клебсиелла, протей, серрация және т.б.); қызылша, тұмау және т.б.

Ішкі ауаның микробтармен ластануы екі көрсеткішпен анықталады:

1) микробтардың жалпы саны – 1 м³ ауадағы МАФанМ мөлшері (жалпыбактериялық ластану). МАФанМ - қарапайым қоректік агарда өсуге қабілетті мезофильді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдер.

2) 1 м³ ауада санитарлық-индикативті микроорганизмдерді (алтынстафилококк және гемолитикалық стрептококк) анықтау арқылы анықталатын ауа микрофлорасының сапалық құрамы. Ауада СКМ анықтау биологиялық ластануды көрсетеді, оның дәрежесі анықталған СКМ санына тікелей пропорционалды.

Атмосфераның микроорганизмдермен ластануын зерттеудің бірнеше әдістері ұсынылды. Ең қарапайым әдіс – микроорганизмдердің тығыз қоректік ортаның бетіне шөгуі (Кохтың седиментациялық әдісі).

Седиментациялық әдіс практикалық жұмысқа өте ыңғайлы. Ол жалпы санитарлық жағдайды немесе бөлмені желдету мен тазалаудың тиімділігін анықтау міндетін қойғанда, әртүрлі бөлмелердегі ауаның ластану дәрежесін анықтау үшін кеңінен қолданылады. Арнайы орталарды пайдалана отырып, бұл әдіс арқылы микроорганизмдердің әртүрлі топтары мен түрлері бойынша ауаның ластануын анықтауға болады. Әдіс микроорганизмдердің ауырлық күшінің әсерінен және ауа қозғалысының әсерінен (шаң бөлшектерімен және

аэрозоль тамшыларымен) ашық Петри табақшаларында қоректік ортаның бетіне шөгу қабілетінен тұрады. Әдіс өте қарапайым, бірақ әлсіз сезімтал және сенімсіз. Сонымен қатар, ортаның бетінде тек ірі дисперсті аэрозоль фракциялары шөгеді; көбінесе колониялар бір жасушадан емес, микробтардың жинақталуынан түзіледі; қолданылатын қоректік ортада ауа микрофлорасының бір бөлігі ғана өседі. Сонымен қатар, бұл әдіс атмосфералық ауаның бактериялық ластануын зерттеуге мүлдем жарамсыз.

Дұрыс сынама алу, кез келген объектіні зерттеудегі сияқты ең жауаптысы болып табылады. Сынаманы дұрыс таңдау зерттеудің дәлдігін қамтамасыз етеді. Жабық бөлмелерде сынама алу нүктелері әрбір 20 м² аумаққа белгіленеді - конверттің түріне сәйкес бір ауа сынама: бөлменің бұрыштарында 4 нүкте (қабырғалардан 0,5 м қашықтықта) және 5-ші нүкте - орталығында. Ауа сынамалары еденнен 1,6-1,8 м биіктікте – тұрғын үй-жайларда тыныс алу деңгейінде алынады. Сынамаларды күндізгі уақытта (адамның белсенді қызметі кезеңінде), ылғалды тазалаудан және бөлмені желдеткеннен кейін алу керек. Ауа сынамасын алу кезінде ауаның да қоректік ортаға бір мезгілде себілетініне назар аудару керек. Жалпы микробтық ластануды анықтау кезінде ет-пептонды агары бар табақшаларды 5-10 минут немесе одан да көп уақыт ашық қалдырады. Санитарлық-көрсеткіш микробтарды анықтау үшін қанды агар, (гемолитикалық стрептококктарды анықтау үшін), сүт-тұзды немесе сарытұзды агар (алтын стафилококкты анықтау үшін), сусло агары немесе Сабуро ортасы (ашытқылар мен саңырауқұлақтарды анықтау үшін) қолданылады. . Санитарлық-көрсеткіш микроорганизмдерді анықтау кезінде табақшаларды 4060 минут ашық қалдырады.

Экспозиция аяқталғаннан кейін барлық табақшалар жабылады, термостатқа 24 сағат 37⁰С орналастырылады, содан кейін пигмент түзетін микроорганизмдер пигменттің пайда болуы үшін 48 сағатқа бөлме температурасында қалдырылады.

Табақшалардағы колониялар саны, орташа арифметикалық мәні есептеледі және 1 м³ (яғни 1000 л) ауадағы микроорганизмдер саны В.Л.Омельянский формуласы бойынша қайта есептеледі, ол формула бойынша 10 литр ауадағы микробтардың мөлшері 100 см² аумаққа 5 минутта шөгетініне сүйенген болатын.

МАФанМ мөлшері жазда 1500 КҚБ/м³, қыста 4500 КҚБ/м³ (КҚБ – колония құраушы бірлік), ал гемолитикалық стрептококктар мен стафилококктар 1м³-ге 16-дан аспаса, тұрғын үй-жайлардағы ауа таза деп саналады.

Аспирация әдісі дәлірек әдіс болып табылады. Аспирация әдісі микроорганизмдерді ауадан тығыз қоректік ортаның бетіне немесе ұстайтын сұйықтыққа мәжбүрлі тұндырудан тұрады. Ауа сынамасын алу диаметрі 1,4 мкм дейінгі бөлшектердің өлшемі бар биологиялық аэрозольді таңдауды қамтамасыз ететін әртүрлі конструкциядағы сынамаларды іріктеу құрылғыларымен (импакторлар мен импинжерлер) жүзеге асырылады.

Импакторлар – ауадан микробтарды қоректік орта беткейіне мәжбүрлік шөктіруге арналған қондырғылар (сынама алу құрылғысы СҚ-1Б, Кротов аппараты, бактериологиялық аэрозоль сынамасы БАС-1, БАС-2 және т.б.).

Импинджерлер – сұйықтық арқылы ауа өтетін құрылғылар тобы (қоректік сорпа, стерильді су, тұзды ерітінді, вирустарды анықтайтын 199 орта), нәтижесінде онда микроорганизмдер сақталады және оларды анықтауға болады (Речменский бактериоұстағыш және т.б.).

СҚ-1Б сынама алу құрылғысы. Қазіргі уақытта бұл құрылғы (66 сурет) ішкі ауаны зерттеуде кеңінен қолданылады. Оның жұмыс істеу принципі аппараттың қақпағындағы саңылаулар арқылы сорылған ауаның қоректік ортаның бетіне түсуіне, ал шаң мен аэрозоль бөлшектері және олармен бірге ауадағы микроорганизмдерде ортаға жабысуына негізделген. Аппараттың айналмалы үстеліне жұқа қоректік орта қабаты бар Петри табақшасы орнатады, бұл оның бетінде бактериялардың біркелкі таралуын қамтамасыз етеді. Құрылғы электр қуатымен жұмыс істейді. Белгілі бір экспозициямен сынама алынғаннан кейін табақша алынып, қақпақпен жабылады және 48 сағатқа термостатқа орналастырылады. Әдетте, сынама алу 200 л/мин жылдамдықпен 0,5-5 минут ішінде жүргізіледі. Осылайша, микрофлора 100-1000 литр ауада анықталады. Жабық бөлмедегі ауадағы бактериялардың жалпы санын анықтау үшін екі сынама (әрқайсысы 100 литр) **СҚ-1Б** көмегімен ЕПА бар Петри табақшаларына алынады.

Кротовтың құрылғысы - алынбалы қақпағы бар цилиндр, оның ішінде орталықтан тепкіш желдеткіші бар электр қозғалтқышы бар (66 сурет). Құрылғының жұмыс істеу принципі аэрозоль бөлшектерінің қоректік ортаның бетіне инерциялық шөгуіне негізделген. Зерттелетін ауа құрылғының қақпағындағы сына тәрізді ойық арқылы 20-25 л/мин жылдамдықпен сорылып, тығыз қоректік ортаның бетіне шөгіп, оның ылғалды бетінде микробтар сақталады. Микробтарды біркелкі себу үшін қоректік ортасы бар Петри табақшасын 1 секундта 1 айналым жылдамдығымен айналатын стендке қояды. Ауаның сорылу жылдамдығы құрылғының микрометрмен (реометрімен) реттеледі. Ауаның айтарлықтай ластануы бар сынаманың жалпы көлемі 40-50 литр, шамалы болса - 100 литрден жоғары болуы керек. Аспирацияның ұзақтығы 2-5 минут. Таңдалған үлгілерді 37°C температурада 1-2 күн бойы инкубациялаудан кейін бөлінген микроорганизмдерге байланысты өскен колониялар есептеледі (67 сурет). Алынған ауа үлгісінің көлемін ескере отырып, 1 м³ ауадағы микробтардың саны есептеледі. СКМ анықтау кезінде 35% қан агары бар екі Петри табақшасы (гемолитикалық стрептококктар үшін), сонымен қатар сүт-сары-тұз ортасы бар екі Петри табақшасы (алтын стафилококкты анықтау үшін) қолданылады. Бұл ретте аппарат арқылы 250 литр ауа өткізіледі. Термостатта бір күн инкубациялағаннан кейін және бөлме температурасында тағы бір күн сақтағаннан кейін колонияларға макро- және микроскопиялық зерттеу жүргізіледі, жалпы қабылданған сынақтар бойынша бактериялардың патогенділігі анықталады, ал 1 м³-ғы СКМ мөлшері анықталады.

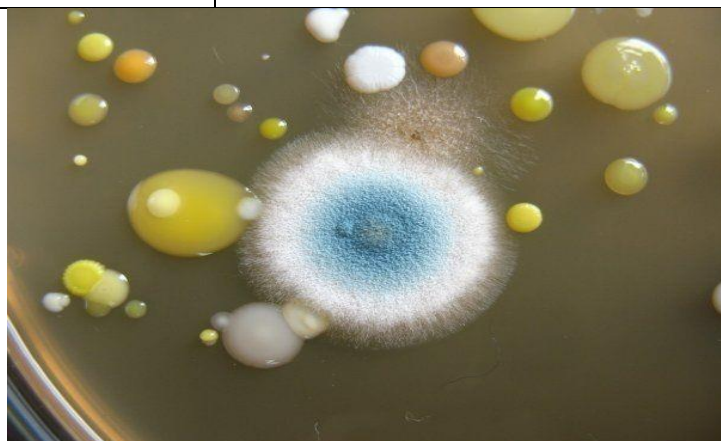


66 сурет - Кротовтың құрылғысы және СҚ-1Б сынама алу құрылғысы.
Интернет желісінен алынған.

2 кесте - Функционалдық мақсатына қарай медициналық мекемелердің үйжайларының ауа ортасының бактериялық ластануының рұқсат етілген деңгейлері

Тазалық классы	Орналасқан жайының атауы	1 м ³ көгеру ашытқы саңырауқұлақтарының саны		Микроорганизмдердің жалпы саны, ЦФУ/м ³		Staphylococcus aureus колонияларының саны, ЦФУ/м ³	
		Жұмыс алдында	Жұмыс кезінде	Жұмыс алдында	Жұмыс кезінде	Жұмыс алдында	Жұмыс кезінде
Өте таза	Операциялық залдар, босандыру бөлмелері, гематологиялық, күйікпен ауыратын науқастарға арналған асептикалық қораптар, шала туған нәрестелерге арналған палаталар, дәріханалық асептикалық қораптар, стерильдеу қораптары, баклаборатриялық қораптар	Болмауы керек	Болмауы керек	200-ден артық емес	500ден артық емес	Болмауы керек	Болмауы керек
Таза	Процедуралық, таңу, операция алдындағы, реанимациялық, балалар бөлімшелері, толтыру дәріханалары, бактериологиялық және клиникалық зертханалар	Болмауы керек	Болмауы керек	500-ден артық емес	750ден артық емес	Болмауы керек	Болмауы керек

Шартты түрде таза	Хирургиялық бөлімшелердің камералары, тексеру кабинеттері, жұқпалы аурулар бөлімшелерінің қораптары мен палаталары, интерн бөлмелері, таза зығыр қоймалары	Болмауы керек	Болмауы керек	750-ден артық емес	1000нан артық емес	Болмауы керек	Болмауы керек
Лас	Әкімшілік ғимараттардың дәліздері мен үйжайлары, емдеудиагностикалық ғимараттардың баспалдақтары, дәретханалар, лас кір жуатын бөлмелер және т.б.	Стандартталмаған					



67 сурет - Ауадан ЕПА-ға микробтардың колонияларының өсімі. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың барысы

1. Лабораториядағы үстелдердің үстіне ЕПА-ы бар табақшаларды ашыққалдырады: 4 табақша бөлменің бұрыштарына және біреуін ортасына 5-10 минутқа. Содан кейін табақшаларды жабыңыз және термостатқа 37°C 24 сағатқа қояды және бөлме температурасында тағы 48 сағат ұстайды, өйткені ауа микрофлорасының кейбір өкілдері бөлме температурасында жақсы өседі.

2. Әрбір ЕПА-ы бар табақшалардағы барлық колониялардың санын есептейді. Санау Петри табақшаларын ашпай жүргізеді. Әрбір тірі жасушадан колония пайда болады деп есептеледі.

3. Содан кейін орташа арифметикалық мән есептеледі, Омелянский формуласына қойылады және зертханалық ауаның жалпы микробтық саны есептеледі.

4. Алынған мәліметтер бойынша қорытынды жасау және қажет болған жағдайда зертханада санитарлық режимді сақтау бойынша ұсыныстар беру. Бұл ауада неғұрлым көп микроорганизмдер табылса, оның патогендік микроорганизмдермен ластану ықтималдығы соғұрлым жоғары болады деген болжамға негізделген, яғни. Ауаның ЖМС оның эпидемиологиялық қауіптілік дәрежесі туралы түсінік береді (2 кесте).

Хаттама № 11

Седиментациялық әдіспен ауадағы ЖМС анықтау

Күн і	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Зертханадағы ауа	1.«Конверт» әдісі бойынша МПА бар 5 Петри табақшасын 5-10 минутқа зертханалық үстелдерде ашық қалдырыңыз.	
		2. Дақылдарды 24 сағат бойы 37 ⁰ температурасында термостатқа салып, бөлме температурасында тағы 48 сағат ұстаңыз.	
2.	Табақшалардағы МПА үшін өсу	1. Әр пластинадағы өскен колониялардың санын есептеп, орташа мәнін есептеңіз арифметикалық саны. 2. Омелянский формуласы бойынша ЖМС есептеу $a \times 100 \times 1000 \times 5$ $b \times 10 \times t$ a - колониялардың орташа арифметикалық саны, c - Петри табақшасының ауданы $S = \pi r^2$, t – ауа себу уақыты. 3. Зертханалық ауаның микробтықластану дәрежесі туралы қорытынды.	

Материалдар мен жабдықтар: МПА бар Петри табақшалары; Колониялардың өсімімен ЕПА-ы бар Петри табақшалары; калькулятор, стеклограф.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 268-270.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 95-101.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б. 84-86.

1.12. Зертханалық жұмыс №12

Тақырыбы: **Кефирдың микрофлорасы**

Мақсаты: кефирды микроскопиялық зерттеу әдістемесін меңгеру

Студент білуі керек:

1. Ашыған сүт өнімдерінің спецификалық микрофлорасының құрамы және оны зерттеу әдістері

Студент жасай білуі қажет:

1. Кефирнан бекітілген микропрепарат дайындау;
2. Биологиялық микроскоптың иммерсиялық жүйесін қолданып микроскопиялау;
3. Микропрепараттағы бактерияларды морфологиялық және тинкториалдық әсіеттеріне қарай ажырату.

Негізгі теориялық ережелер

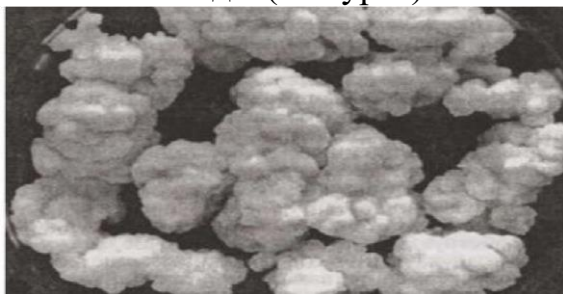
Сүт және қышқыл сүтті сусындар ең көне азық-түлік өнімдерінің бірі болып табылады және қазіргі уақытта ең кең таралған және қолжетімді болып табылады. Ашыған сүт өнімдерінің негізгі емдік әсері шіріткіш микрофлораның өмірлік белсенділігін басу болып табылады. Ашыған сүт өнімдерінің құрамындағы микрофлора адамның ішегінде тамыр алады және патогендік микробтар үшін «бәсекелес» болып табылады. Толық сүтті ашыту В тобындағы витаминдердің, әсіресе В2, А, Е, Д витаминдерінің, кальций, магний, фосфордың жоғарылауына әкеледі. Ашыған сүт өнімдерінде алмастырылмайтын амин қышқылдарының мөлшері жаңа піскендерге қарағанда 7-10 есе жоғары.

Қазіргі уақытта өнеркәсіптік ауқымда көп компонентті симбиотикалық микрофлорасы бар бір ғана ашытылған сүт өнімі шығарылады - бұл айран.

Айран – айран дәндерімен (саңырауқұлақтар) дайындалған ашытқыны қолдану арқылы аралас (сүт қышқылы және спирт) ашыту арқылы алынатын ашытылған сүт өнімі.

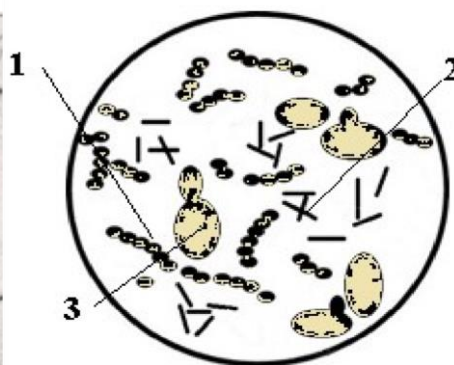
Айранның отаны - Солтүстік Кавказ. Кавказ халықтары айранның денсаулық пен күш-қуат беретін сусын екенін бұрыннан біледі және оны «аспан сыйы» деп санаған. Қартаю ағзаны уландыратын ішектегі шіріткіш бактериялармен байланысты екені белгілі. Ал айран көптеген зиянды бактерияларды жоятын тамаша құрал. Сондықтан айран «ұзақ өмір сусыны» деп аталады. Сонымен қатар, айранды үнемі тұтыну адамның иммундық жүйесін нығайтады, сонымен қатар ұйқының бұзылуынан арылтады. Бұл өнімді құрайтын барлық дерлік қоректік заттар оңай сіңеді, сондықтан айран әсіресе екі жастан асқан балаларға, қарт адамдарға, әлсіреген науқастарға пайдалы. Айран эпилепсия болған кезде, сүт протеиніне, нәрестелерге жеке төзімсіздік жағдайында (өнімдегі этил спиртінің төмен болуына байланысты) қолдануға болмайды.

Айранды жасау үшін қолданылатын айран дәндері (саңырауқұлақтар) ашытқы, сүт қышқылы және сірке қышқылы бактерияларының тұрақты симбиозының мысалы болып табылады (68 сурет).

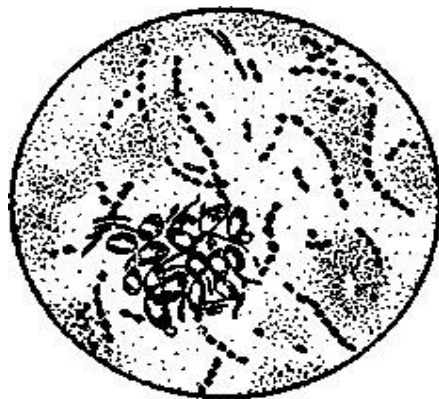


68 сурет - Айран дәні. Интернет желісінен алынған.

Айран дәндерінің құрамына бірқатар сүт қышқылды бактериялар кіреді: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* түрінің мезофильді сүтқышқылды стрептококктары; *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc dextranicum* түрінің хош иістендіргіш бактериялары; *Lactobacillus* тектес сүт қышқылы таяқшалары; сірке қышқылы бактериялары; ашытқылар. Айранның микрофлорасы тек сүт қышқылы микроорганизмдерінің 46 түрлі штамдарын және ашытқылардың 23 штамдарын қамтиды (69, 70 сурет). Айран саңырауқұлағының кесінділерін микроскопиялық зерттеу кезінде микроорганизмдердің қалған бөлігін ұстайтын саңырауқұлақтың стромасын құрайтын таяқша тәрізді жіптердің тығыз тоғысқандығын анықтайды.



1 - сүт қышқылды стрептококктар, 2 - лактобациллалар, 3- ашытқылар 69 сурет - Айран микрофлорасы. Интернет желісінен алынған.



70 сурет - Микроскоптағы айран ашытқысы. Интернет желісінен алынған.

Айран дәндерінің микрофлорасының жеке өкілдерінің сипаттамасы мен маңызы

Мезофильді сүт стрептококктары белсенді қышқыл түзілуін және тромб түзілуін қамтамасыз етеді. Дайын өнімдегі олардың саны 1 см^3 -де 10^9 -ға жетеді. Олар диаметрі 1-2 мкм-ге жететін сфералық немесе сопақша жасушалар, қысқа тізбектерде немесе жұпта орналасады.

Хош иісті стрептококк сүтті және кілегейлі стрептококктарға қарағанда баяу дамиды. Олар хош иісті заттар мен газ түзеді. Олардың кефирдағы саны 1 см^3 -де 10^7 - 10^8 . Хош иісті стрептококктардың жасушалары (*Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*) сүт және кілегейлі стрептококктардың (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*) жасушаларынан кішірек (74 сурет), ал термофильді стрептококктардың (*Streptococcus cremoris*) жасушалары ең үлкені (73 сурет) болып табылады.

Лактобактериялар. Айрандағы сүт қышқылды таяқшаларының саны 1 см^3 -де 10^7 - 10^8 -ге жетеді. Лактобактериялар (4-10 x 0,5-0,6) мкм өлшемді жұптар мен тізбектермен жалғанған таяқшалар, дара болып келеді. Олар қозғалмайды, споралар мен капсула түзбейді, Грам бойынша оң боялады. Сүт өнеркәсібінде *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* қолданылады (71 сурет). Бета-бактериялар тармағына таяқшалардың 11 түрі кіреді, олардың ең көп зерттелгендері - *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*. Бета бактериялары ең кішкентай және ең жұқа жасушаларға ие (72 сурет).

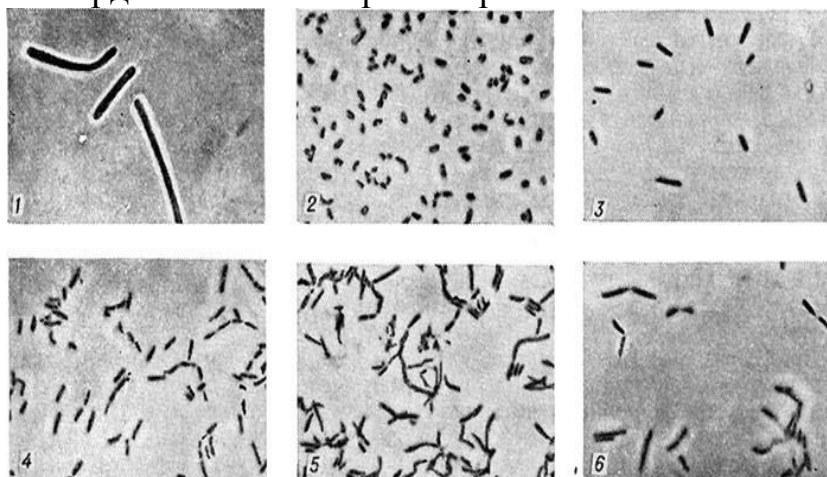
Ашытқылар сүт қышқылды бактерияларға қарағанда әлдеқайда баяу дамиды, сондықтан олардың санының көбеюі өнімнің пісуі кезінде байқалады және 1 см^3 -ге 10^6 құрайды. Айран ашытқыларының ішінде лактозаны ашытпайтын топ басым, бірақ лактозаны ашытатын ашытқылар да бар, ал спирттің мөлшері мен ашытқысының антибиотиктік белсенділігі көбіне соңғысына байланысты.

Сірке қышқылы бактериялары одан да баяу дамиды және айранның құрамында 1 см^3 -де 10^4 - 10^5 болады. Сірке қышқылы бактериялары сүт қышқылы бактерияларымен симбиозды болып кефирда кездеседі (75 сурет). Олар энергия көзі ретінде сүт қышқылын пайдаланады және сол арқылы ашытқының қышқылдығын төмендетеді және бірқатар аминқышқылдары мен витаминдерін, соның ішінде B_{12} витаминінің көп мөлшерін синтездейді, бұл сүт қышқылы бактерияларының дамуына қолайлы жағдай жасайды.

Айранды ашыту және жетілу процесі 20 - 22°C температурада 10 - 12 сағат бойы жүргізіледі.

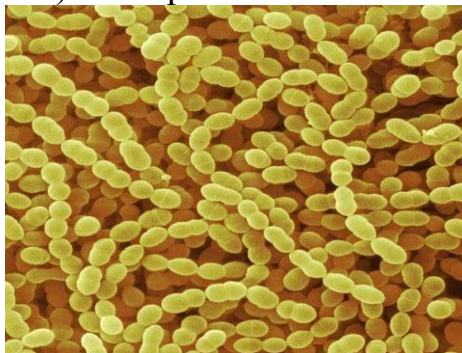


71 сурет - *Lactobacillus plantarum* (таза дақыл, Грам бойынша бояу) және лактобакагардағы колониялар. Интернет желісінен алынған.

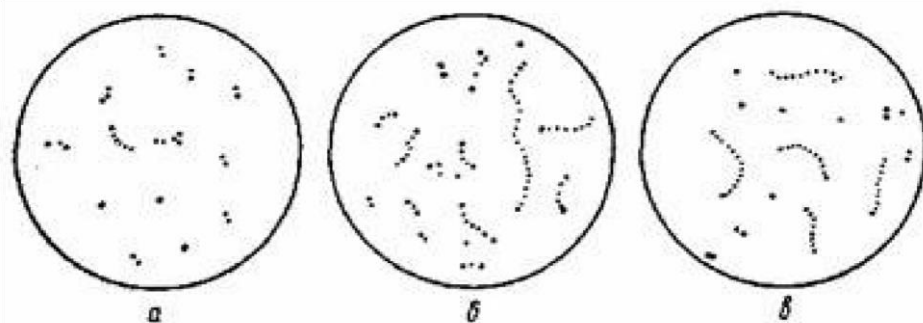


1 - *L. acidophilus*; 2 - *L. fermenti*; 3 - *L. plantarum*; 4 - *L. casei*; 5 - *L. buchneri*; 6 - *L. brevis*; X 1680

72 сурет - Сүт қышқылы бактерияларының кейбір түрлерінің жасушалары, сорпа дақылы (96 сағат). Интернет желісінен алынған.

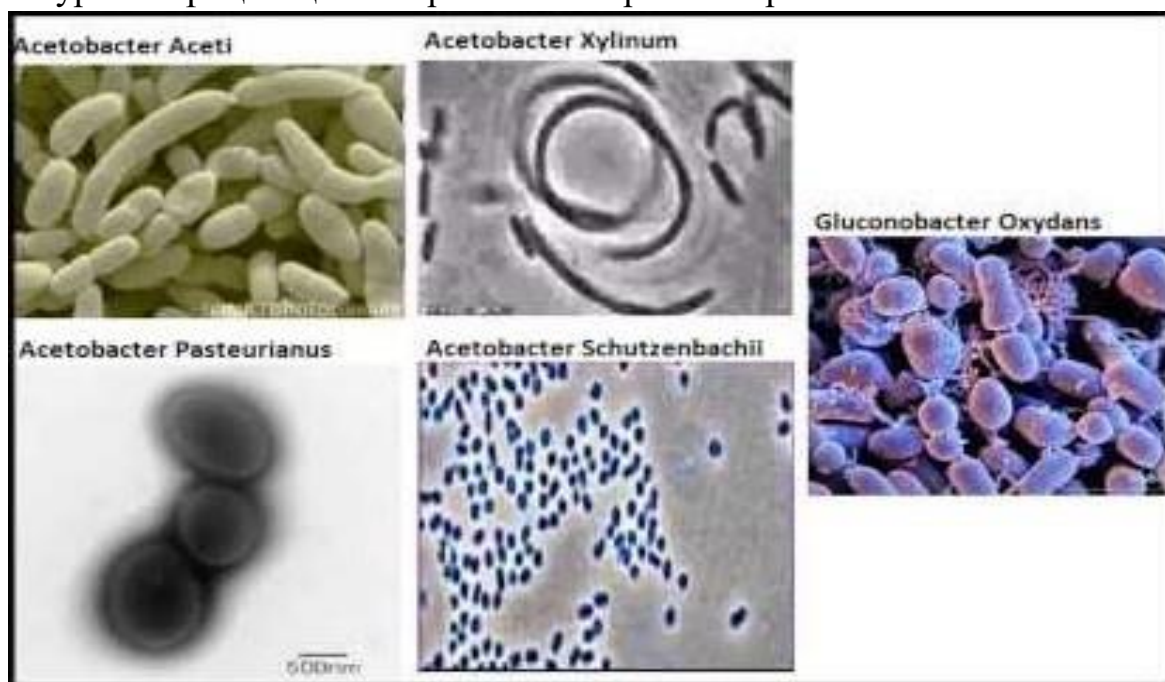


73 сурет - Термофильді стрептококк. Интернет желісінен алынған.



а - *Str.lactis*; б - *Str.cremoris*; в - *Str. Diacetylactis*

74 сурет - Сүт қышқылы стрептококктары. Интернет желісінен алынған.



75 сурет - Сірке қышқылы бактериялары, түрлері. Интернет желісінен алынған.

Ашытылған сүт өнімдерінің өндірісін микробиологиялық бақылау технологиялық процесті бақылауды, өндіріс жағдайлары мен дайын өнімді санитарлық-гигиеналық бақылауды жүзеге асырудан тұрады.

Дайын ашытылған сүт өнімдерінің сапасын анықтау үшін:

1) метилен көгінің сулы ерітіндісімен боялған айран жағындысына микроскопиялық зерттеу жүргізу. Қатерсіз айраннан алынған жағындыларда сүтті стрептококктар, таяқшалар, ашытқылар кездеседі. Сүт қышқылды стрептококктар таяқшаларына қарағанда басым: олар жалпы микрофлораның 94-95%, таяқшалар - 4-6%, ашытқылар - 1% құрайды.

2) ашыту титрін анықтау.

ІТТБ 0,1 см³ айран, сүзбе, йогурт, ацидофильді ашытқы сүті және басқа ашытылған сүт сусындарына рұқсат етілмейді. Қаймақта, 20% және 25% майлы ІТТБ 0,01 см³, сүзбеде - 0,001 г табылмауы керек. Ал алтын стафилококктың құрамы сүзбеде де нормаланған (0,01 г рұқсат етілмейді). Ашыған сүт өнімдерінің барлық түрлерінің 25 см³ (г) мөлшерінде патогендік микроорганизмдердің, соның ішінде сальмонеллалардың болуына жол берілмейді.

Зертханалық жұмыстың барысы

1. Тұзды ерітіндінің бір тамшысын күйдірілген ілмекпен майсыздандырылған заттық шыныға салады.
2. Ілмек немесе зарарсыздандырылған тамшуыр арқылы тұзды ерітіндіге 1 тамшы айран құйып, араластырғаннан кейін жағындыны шыны бетіне жұқа қабатпен жағады.
3. Ауада құрғатады және жағындыны спирт шамының жалынына бекітеді.
4. Микропрепаратты Грам бойынша бояйды.
5. 10 көру өрісінде батыру объектісін (x90) пайдаланып микроскопиялайды.
6. Кефирдің спецификалық микрофлорасының өкілдерінің болуын атап, олардың альбомға суреттеніз.
7. Нәтижелер бойынша қорытынды жасалады.

Хаттама № 12 Айранның микрофлорасы

Күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1 день	Кефир	<ol style="list-style-type: none">1. Айраннан бекітілген микропрепарат дайындап, Грам бойынша бояңыз.2. Кем дегенде 10 көру өрісін батыру жүйесімен микроскопиялаңыз.3. Айранның спецификалық микрофлора өкілдерінің болуына және сандық қатынасына назар аударыңыз.4. Суреттеп, қорытынды жасаңыз	

Материалдар мен құрал жабдықтар: спирттік шам; бактериологиялық Ілмек; пробиркаларға арналған штатив; айран қосылған пробирка; стерильді физиологиялық ерітіндісі бар пробирка; грам бойынша бояуға арналған анилинді бояғыштардың жұмыс ерітінділерінің жиынтығы; шаю; таза заттық шынылар; препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа; сүзгіш қағаз; шыны бойынша қарындаш (шыны график); дезинфекциялау ерітіндісі; иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық май.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 275-276.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 95-101.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б. 91-92.

1.13. Зертханалық жұмыс №13

Тақырыбы: Температураның бактериялардың вегетативті және споралық формаларына әсері

Мақсаты: температураның бактериялардың вегетативті және споралық формаларына әсерін зерттеу

Студент білуі керек:

1. Бактериялардың өсу температурасына қатысты бөлінуі;
2. Жоғары температураның жойқын әсеріне негізделген зарарсыздандыру әдістері;
3. Температураның бактериялардың вегетативті және споралық формаларына әсер ету ерекшеліктерін. **Студент жасай білуі қажет:**

1. Бактериялардың дақылдарын термиялық өңдеуді жүргізе білу және алынған нәтижелерді интерпретациялау.

Негізгі теориялық ережелер

Микроорганизмдерге жоғары температураның зиянды әсері белоктардың денатурациясы, цитоплазманың дегидратациясы және жасуша құрылымдарының зақымдануы болып табылады. Стерилизацияның термиялық әдістеріне мыналар жатады:

- автоклавтау (қысыммен бумен зарарсыздандыру);
- құрғақ стерилизация;
- сұйық бумен бөлшектеп зарарсыздандыру;- отқа қыздыру арқылы зарарсыздандыру.

Зарарсыздандыру әдісін таңдау зарарсыздандырылатын заттың физикалық, химиялық және биологиялық ерекшеліктеріне байланысты.

Бактериялардың вегетативті және споралық формаларының жоғары температурасына әр түрлі сезімталдық байқалады. Вегетативті формалар 30 минут ішінде 60⁰ С дейін, 100⁰ С дейін қыздырғанда – 1-2 минут ішінде өледі. Споралар жоғары температураға әлдеқайда төзімді, мысалы, сібір жарасы бацилласының споралары 30 минут қайнатуға төтеп бере алады, ал ботулизм клостридиясының споралары 6 сағат. Осы себепті қайнату бактериялардың вегетативті формаларын жою үшін ғана қолданылады және зарарсыздандыру әдісі болып саналмайды. Спораларды жою үшін 120-134⁰с (автоклав) немесе 160-180⁰с (құрғақ пеш) температурасы қажет.

Автоклавтау - атмосфералық қысымнан жоғары қаныққан су буының әсеріне негізделген зарарсыздандырудың ең тиімді және сенімді әдісі, судың қайнау температурасы көтеріледі және сәйкесінше бу пайда болады. Бұдың артық қысымы 0,5 атм болған кезде оның температурасы 111-112⁰ С, 1 атм – 121⁰ С, 1,5 атм – 127⁰ С, 2 атм – 134⁰ С. зарарсыздандыру уақыты 15-30 минут.

Сұйық бумен бөлшектеп зарарсыздандыру 100⁰С-тан жоғары қызған кезде нашарлайтын объектілер үшін қолданылады. Зарарсыздандыру 100⁰С-та 30-60 минут ішінде 24 сағат аралықпен 3 күн бойы жүргізіледі, оның барысында материал термостатта немесе бөлме температурасында сақталады, осылайша споралар өніп, кейіннен қызған кезде өледі.

Қыздырудан кейін үшінші рет заттың стерильділігіне қол жеткізіледі.

Құрғақ жылумен зарарсыздандыру (құрғақ қыздырылған ауа) зертханалық ыдыстарды, металл құралдарды және басқа ыстыққа төзімді заттарды зарарсыздандыру үшін қолданылады. Ауа стерилизаторларында (Пастер пештерінде) 160⁰с температурада 150 мин, 180⁰С - 60 мин құрғақ жылумен зарарсыздандыруды жүзеге асырады.

Отқа қыздыру (фламбирлеу) өте жылдам (5-7 сек) және металл бұйымдарына (бактериологиялық ілмектер, дәрілік инелер, пинцеттер, скальпельдер және т.б.) қолданылатын сенімді зарарсыздандыру әдісі.

Жұмыстың жасалу барысы

1. Петри табақшасындағы қоректі агарды 4 секторға бөлу.
2. Сорпа дақылындағы *E. coli* мен көк ірің таяқшасын ілмекпен қоректік агардың ¼ бөлігіне себу.
3. Су моншасында дақылдарды 100⁰ С температурада 5 минут қайнату.
4. Термиялық өңделген дақылдарды ЕПА-дын қалған ¼ бөлігіне табақшаға себу.
5. Дақылдарды 37⁰С температурада 24 сағат бойы термостатқа салыңыз, содан кейін ЕПА секторларында өсімнің болуын немесе болмауын белгілеп, қорытынды жасау.

Хаттама №13

Температураның бактериялардың вегетативті және споралық формаларына әсері

Күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
-------------	-----------------------------	-----------------------	---------------

1	1.ЕПС-дағы шөп таяқшасының споралары 2.ЕПС-да E. coli	1.Әр дақылдарды Петри ыдысына ¼ ілмекпен себу. 2.Су моншасында пробиркада культураны қайнату 5 минут 3.Термиялық өңделген дақылдарды табақшаға ¼ ЕПА бос жерге себіңіз.	
		4.Термостатты 24 сағат ішінде 37°C қойыңыз.	
2	1.Петри ыдысындағы ЕПА-да бактериялардың өсуі	1.Нәтижелерді есепке алу 2.Қорытынды	

Материалдар мен құрал жабдықтар: ЕПА-да көк ірің таяқшасы бар түтік, ЕПА-да E. coli, ЕПА-мен бірге стерильді Петри ыдысы, спирттік шам, бактериологиялық ілмек, су моншасы, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 92-101.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 115-121.
- 3.Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б. 36-42.

1.14. Зертханалық жұмыс №14

Тақырыбы: Диск әдісімен бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау.

Мақсаты: бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтаудың дискодиффузиялық әдісін игеру

Студент білуі керек:

1. Антибиотиктердің негізгі механизмдері, белсенділігі және әсер ету спектрі;
2. Микробтардың антибиотиктерге сезімталдығын анықтаудың дискодиффузиялық әдісінің принципі мен механизмі.

Студент жасай білуі қажет:

1. Диско-диффузиялық әдіспен бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау;
2. Диско-диффузиялық әдіспен антибиотикке сезімталдықты анықтау нәтижелерін дұрыс түсіндіру.

Негізгі теориялық ережелер

Тиімді антибиотикалық терапия жүргізу үшін бөлінген микробтың антибиотиктерге сезімталдығын білу қажет.

Микроорганизмдердің антибиотикке сезімталдығын бағалау бойынша зерттеулер жүргізу міндеттері:

1. Белгілі бір науқаста оңтайлы жеке антибиотикалық терапияны тағайындау негіздемесі.

2. Нақты аймақтарда немесе емдеу-алдын алу мекемелерінде (ЕПМ) айналымда болатын микроорганизмдердің антибиотикке төзімділік деңгейіне эпидемиологиялық мониторинг деректері негізінде эмпирикалық антибиотикалық терапияны негіздеу.

Дәрілік сезімталдықты анықтау үшін патогеннің таза дақылын қолдану оңтайлы болып табылады, оны антибиотиктермен емдеуді бастамас бұрын бөліп алу керек.

Микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығын зерттеу әдістері:

1. Сериялық сұйылту әдісі (келесі зертханалық жұмысты қараңыз).
2. Микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығын анықтауға арналған автоматтандырылған жүйелер.

WalkAway-40, WalkAway-96 ATV-expression; Sceptor және т.б. Автоматты бактериологиялық анализаторлар: тұрақты температура мен ылғалдылықты сақтайтын Автоматты анализатормен; компьютермен; бағдарламалық жасақтамамен; штрих-кодтарды қолдануға арналған принтермен; нәтижелерді басып шығаруға арналған принтермен; лайлануды стандарттауға арналған құрылғымен жабдықталған (76 сурет).

Әдістің кемшіліктері:

Автоматтандырылған жүйе β -лактамық антибиотиктерге гетерорезистентті микроорганизмдерді жіктеуде қате нәтижелер бере алады; резистенттіліктің индуктивті механизмдері бар; гендердегі мутацияның жоғары жылдамдығымен ерекшеленеді, сезімталдықты бақылайды; стандартты өкілдерінен бірқатар биохимиялық сипаттамаларында ерекшеленеді.



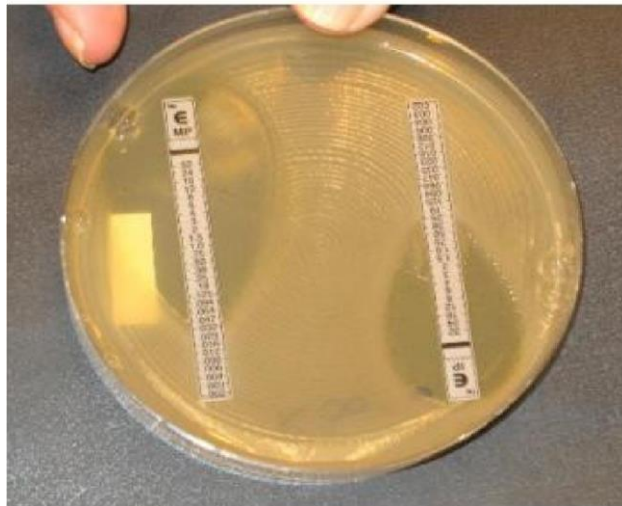
76 сурет - Биохимиялық сәйкестендіруге және микроорганизмдердің антибиотикке сезімталдығын анықтауға арналған анализаторлар. Интернет желісінен алынған.

3. Агардағы диффузия әдісі (диффузиялық) – Бактерияға қарсы препараттың (АБП) тығыз қоректік ортаға диффузиясына және АБП концентрациясы ең аз басатын концентрациядан (МИК) асып түсетін аймақта бактериялардың өсуін тежеуге негізделген.

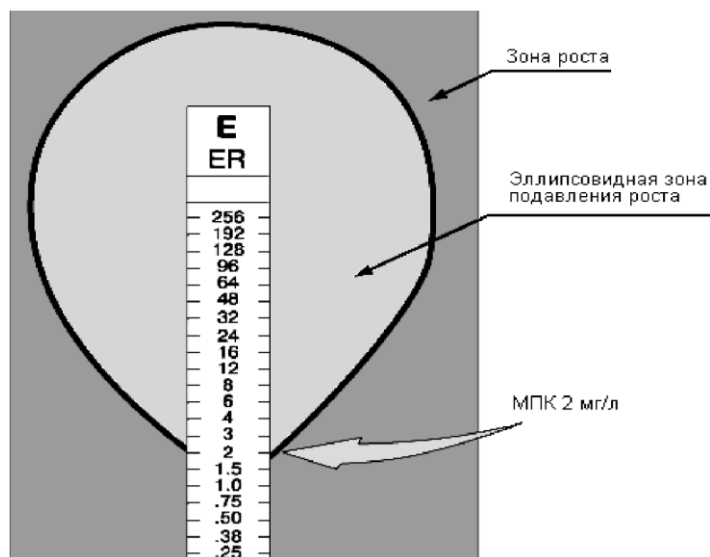
Диффузиялық әдістің 2 түрі бар: **диско-диффузиялық** және **Е-тест**.

Е-тест әдісі.

Е-тест мөлшері 5x50 мм болатын антибиотик концентрациясының градиенті бар пластикалық жолақ (препаратқа байланысты 0,002-32, 0,016-256 немесе 0,063-1024 мг/л). Бұл әдіс антибиотиктердің агарға таралуына негізделген және МИК мәнін анықтауға мүмкіндік береді. Е-тест жолағының айналасындағы микроорганизмнің өсуін басу тасымалдаушыдан таралатын Бактерияға қарсы препараттың концентрациясы МИК жоғары болатын аймақта ғана жүреді; бұл ретте тамшы тәрізді тежелу аймағы қалыптасады (77 сурет). Е-сынақ жолағының айналасындағы микроорганизмнің өсуінің тежелуі жолақтан қоректік ортаға таралатын бактерияға қарсы препараттың концентрациясы МИК-ден жоғары аймақта ғана жүреді; бұл өсуді тежейтін тамшы тәрізді аймақ түзеді. МИК мөлшері өсуді басу аймағының шекарасы тасымалдаушыға жақын жерде ескеріледі (78-сурет).



77 сурет – Е-тест. Интернет желісінен алынған.



78 сурет - E-тест әдісімен микробтардың антибиотиктерге сезімталдығын анықтау. Интернет желісінен алынған.

Әдістің кемшіліктері: сезімталдықты жартылай сандық бағалау баяу өсетін микроорганизмдерді (*M. tuberculosis*) және баяу таралатын антибиотиктерді (полипептидтер) сынау үшін қолайсыз.

Диско-диффузиялық әдіс.

Бұл әдіс антибиотиктердің сіңдірілген қағаз дискілерінен қоректік ортаға таралу қабілетіне негізделген, агар бетіне себілген микроорганизмдердің өсуін тежейді (79-сурет). Дискінің айналасында пайда болатын өсудің тежелу аймағының мөлшері бактериялардың берілген антибиотикке сезімталдық дәрежесіне тікелей пропорционалды.

Сезімталдықты бағалау үшін тек осы мақсат үшін арнайы жасалған орталарды қолданады (Мюллер-Хинтон агары, АГВ ортасы және т.б.), олар шыныаяқтарға 4 мм біркелкі қабатпен құйылады, өйткені өсу тежелу аймағының мөлшері мен формасы қоректік орта қабатының тереңдігі мен біркелкілігіне байланысты.



79 сурет - Антибиотиктер бар дискі құтылары. Диско-диффуздық әдіс. Интернет желісінен алынған.

Сезімталдықты анықтау үшін тек стандартталған сапалы дискілерді пайдалану керек. Әрбір дискіде антибиотиктің орташа емдік дозасы бар, ол антибиотиктердің емдік концентрациясына және патогендік бактериялар үшін

МИК орташа мәндеріне сүйене отырып анықталады. Препараттың атауы әр дискіде көрсетілген.

Диско-диффузиялық әдісті (ДДӘ) қою кезінде арнайы қоректік ортаға Макфарланд стандарты бойынша 0,5 тығыздығына сәйкес келетін және шамамен $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл-ден тұратын бактериялардың стандартты қоспасымен себінді жасалады (80 сурет). **Ескертпе**

1907 жылы Джозеф МакФарланд суспензиядағы бактериялардың санын тиісті лайылықтың ерітіндісімен салыстыру үшін барий сульфаты ерітінділерінің сериясын жасады. Микробиологияда Макфарланд стандарттары бактериялы суспензияның бұлдырлығын реттеу үшін анықтама ретінде қолданылады, осылайша бактериялардың саны микробиологиялық тестілеуді стандарттау үшін белгілі бір диапазонда болады, мысалы антибиотикке сезімталдықты анықтау. Егер қолданылатын бактериялардың суспензиясы тым қалың немесе тым сұйылтылған болса, зерттелетін антибиотик үшін қате нәтиже (жалған қарсылық немесе жалған сезімталдық) алынуы мүмкін.

Макфарланд стандарттары барий хлоридінің сулы ерітіндісіне 1% күкірт қышқылының ерітіндісін қосу арқылы дайындалады, реакция нәтижесінде барий сульфатының ақ преципитатының суспензиясы пайда болады. Бұл суспензияның бұлдырлығы бактериялық суспензияның белгілі бір концентрациясына сәйкес келетін шама болып табылады. Макфарландтың ластану стандарттары-барий сульфатының концентрациясы жоғарылаған пробиркалар жиынтығы.

Бұлыңғыр стандартын стерильді тұзды ерітіндідегі қоректік сорпаны немесе бактериялардың суспензиясын спектрофотометр көмегімен жақсырақ салыстырады. Егер бактериялық суспензия тым бұлыңғыр болса, онда ол сұйылтылады. Егер суспензия жеткіліксіз болса, бактериялар көбірек қосылады.

Ингредиенттер	Лайлану стандарты				
	0,5	1	2	3	4
1,175% BaCl ₂ ертіндісі, мл	0,5	0,1	0,2	0,3	0,4
1% H ₂ SO ₄ ертіндісі, мл	99,5	9,9	9,8	9,7	9,6
1 мл жасушадағы бактерияның концентрациясы	$1,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$



80 сурет - Макфарланд бойынша лайлану стандарттарының жиынтығы (0,5-тен 4-ке дейін). Интернет желісінен алынған.

Агар дақылынан бактериялар қоспасын дайындау үшін бірнеше бір типті селективті емес тығыз қоректік ортада өскен оқшауланған колониялар таңдалады. Ілмекпен материалдың аз мөлшерін колониялардың жоғарғы жағынан алып стерильденген тұзды ерітіндісі бар немесе қоректік сорпасы бар

пробиркаға ауыстырады, спектрофотометрдің көмегімен немесе лайлану стандартын қолдана отырып, Макфарланд стандарты бойынша тығыздығын 0,5-ке жеткізеді (80 сурет).

Сонымен қатар бактерияның 5-6 сағаттық сорпалық дақылын қолдануға болады. Бактериялардың қоспасын дайындағаннан кейін 15 минут ішінде қоректік агарға себінді жасау қажет. Себінді жасауға екі әдісті қолданады:

- стерильді мақта тампонымен штрих қозғалыстарымен;
- тамшуырман 1-2 мл суспензия алынады, қоректік ортаның бетіне жағылады және оған шпательмен біркелкі таратылады.

Себінді жасалғаннан кейін 15 минуттан кешіктірмей антибактериалды препараттары бар дискілер (АБП) қоректік ортаның бетіне стерильді пинцетпен қойылады. Пинцет спирттің жалынында зарарсыздандырылады. Дискілер агардың бетімен біркелкі жанасуы керек, ол үшін оларды пинцетпен ақырын басу керек. Дискілер табақша шеттерінен және бір-бірінен кемінде 15-20 мм қашықтықта орналасуы керек, яғни диаметрі 100 мм болатын бір шыныаяққа 6 дискіден артық емес орналастыру керек. Содан кейін Петри табақшалары термостатта төңкеріліп, 35-37°C температурада 18-24 сағат немесе одан да көп (бактериялардың түріне байланысты) инкубацияланады.

Нәтижені есепке алу үшін табақша төңкеріліп қойылады және өсудің тежелу аймақтарының диаметрі 1 мм дәлдікпен мөлдір сызғышпен өлшенеді. Антибиотикке сезімталдықты бағалау нәтижелерін түсіндіру зерттелетін микроорганизмді үш категорияның біріне жатқызу болып табылады (81 сурет): ■ **S "сезімтал"** - белгілі бір штамм ұсынылған дозалау режимдерінде адамның ағзалары мен тіндерінде пайда болатын АБП концентрациясы кезінде басылады. Осы санатқа жататын микроорганизм тудырған инфекцияны емдеу, әдетте, АБП ұсынылған дозаларда қолданғанда тиімді;

■ **I "аралық"** - АБП МИК осы санаттағы штаммдарға қатысты сезімтал штаммдарға қарағанда жоғары, бірақ ұсынылатын мөлшерлеу режимдерінде қол жеткізуге болатын шектерде болады. Осы санатқа жататын микроорганизм тудырған инфекцияны емдеу АБП-ды жоғары дозаларда қолданғанда не физиологиялық ерекшеліктеріне байланысты АБП-тын жоғары концентрациясы құрылатын ағзаларда немесе тіндерде инфекция ошағын оқшаулау кезінде тиімді болуы мүмкін;

■ **R "тұрақты"** - штамм ұсынылған дозалау режимдерінде ағзалар мен тіндерде пайда болатын АБП концентрациясы кезінде басылмайды. Тұрақты штамдар белгілі бір қарсылық механизмдерінің болуымен сипатталады. Микроорганизм есебінен болған инфекцияны емдеу ең тиімсізі болып табылады.



81 сурет - Диско-диффузиялық әдіс нәтижелерін бағалау. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың барысы

1. Дайындалған бактериялық суспензияны АГВ ортасына стерильді тампонменнемесе тамшуырманмен себу.
2. Пинцетті спирттің жалынына қыздырып, флаконнан антибиотик дискісіналып, дискіні агарға салыңыз, дискінің беті агардың бетімен біркелкі байланыста болатындай етіп аздап басыңыз.
3. Әр түрлі антибиотиктермен 2 рет қайталаңыз (бір табақшаға 6 дискіденартық емес).
4. Антибиотик дискілері бар себілген табақшаны термостатқа 37⁰С температурада 18-24 сағатқа қойыңыз.
5. Бактериялардың өсуінін кешігу аймақтарының диаметрін сызғышпен 1 ммдәлдікпен өлшеп, алынған мәліметтерді түсіндіріңіз (3-кесте). Егер өсудің тежелу аймағы болмаса және бактериялар дискіге жақын өссе, онда дискінің диаметрі өлшенеді.

ХАТТАМА №14 Бактериялық культураның антибиотиктерге сезімталдығын дискодиффузиялық әдіспен анықтау

Күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже

1	1.Макфарланд бойынша тығыздығы 0,5 тұзды ерітіндідегі бактериялардың суспензиясы (инокулюм). 2.Антибиотиктері бар дисклер жинағы.	1.Петри ыдысындағы АГВ ортасына инокулумды тампонмен немесе тамшуырманмен себіңіз. 2.Антибиотикалық дискілерді егілген ортаға пинцетпен салыңыз, оларды агарға ақырын басыңыз. 3.Термостатқа тәулікке 37°С қойыңыз.	
2	Антибиотик дискілері бар табақшада АГВ ортасына бактериялардың көбеюі.	1.Нәтижені ескеріңіз. 2.Антибиотикограмманы сызыңыз. 3.Қорытынды жасаңыз.	

Кесте 3 - Антибиотиктерге сезімталдықты диско-диффузиялық әдіспен түсіндіруге арналған көрсеткіштер

Антибиотик	Аймақтың диаметрі өсудің тежелу аймағы (мм)		
	Тұрақты (R)	Аралық (I)	Сезімтал (S)
Препараттардың атаулары			
Пенициллиндер Бензилпенициллин: стафилококктарды сынау кезінде; басқа бактерияларды сынау кезінде.	≤20 ≤10	21-28 11-16	≥29 ≥17
Ампициллин: стафилококктарды сынау кезінде; грам-теріс бактериялар мен энтерококктарды сынау кезінде.	≤20 ≤9	21 - 28 10 - 13	≥29 ≥14
Карбенициллин (25 мкг)	≤14	15 – 18	≥19
Карбенициллин (100 мкг) Pseudomonas аеругинасы сынау кезінде	≤11	12 - 14	≥15
Метициллин	≤13	14 - 18	≥19
Оксациллин (10 мкг)	≤15	16 - 19	≥20
Азлоциллин (Pseudomonas аеругинасы үшін)	≤13	14 - 16	≥16
Пиперрациллин (Pseudomonas аеругинасы үшін)	≤17	-	≥18
Азтреонам	≤15	16 - 21	≥22
Цефалоспорины	≤14	15 – 18	≥19
Жаңа бета-лактама Имипенем*	≤13	14 – 15	≥16
Меропенем*	≤13	14 - 15	≥16

Хинолондар	Ципрофлоксацин	≤15	16 - 20	≥21
Офлоксацин		≤12	13 – 16	≥17
Налидикс қышқылы		≤12	13 - 17	≥18
Аминогликозидтер				
Стрептомицин		≤16	17 – 19	≥20
Канамицин		≤14	15 - 18	≥19
Гентамицин		≤15	15 - 18	≥16
Тетрациклиндер, макролидтер, линкозамидтер				
Тетрациклин		≤16	17 – 20	≥22
Доксициклин		≤15	16 - 19	≥20
Эритромицин		≤17	18 – 21	≥22
Азитромицин		≤13	14 - 17	≥18
Хлорамфеникол (левомецетин)		≤15	16 - 18	≥19
Фузидий қышқылы		≤15	17 –20	≥21
Рифампицин		≤16	13 – 15	≥16
Полимиксин		≤12	12 - 14	≥15
Ванкомицин:				
стафилококктар үшін;		≤11	-	≥12
энтерококктар үшін.		≤14	15 – 16	≥17
Ристомицин		≤9	10 – 11	≥12

Материалдар мен құрал жабдықтар: макфарланд бойынша тығыздығы 0,5 тұзды ерітіндідегі бактериялар суспензиясы (инокулум), құтыдағы антибиотиктері бар дискілер жиынтығы, стерильді мақта тампоны, 1 мл-ге арналған стерильді шыны тамшуыр, пинцет, спирттеу, дезинфекциялық ерітіндісі бар ыдыс, сіріңкелер, АГВ таза ортасы бар Петри тостағаны, антибиотиктер дискілері мен бактериялардың өсімі бар АГВ ортасы бар Петри табақшасы, шыны график.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 80-90.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 123-131.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б. 75-78.

1.15 Зертханалық жұмыс №15

Тақырыбы: Сериялық сұйылту әдісімен бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау

Мақсаты: сериялық сұйылту әдісімен микроорганизмдердің антибиотикке сезімталдығын анықтау интерпретациялау принциптерін игеру

Студент білуі керек :

1. Микроорганизмдердің антибиотикке сезімталдығын анықтау үшін сериялық сұйылту әдісінің принциптері мен механизмі.

Студент жасай білуі тиіс :

1. Сұйық қоректік ортада сериялық сұйылту әдісі арқылы антибиотикке сезімталдықты анықтау нәтижелерін дұрыс интерпретациялау.

Негізгі теориялық ережелер Антибиотикке сезімталдықты анықтауға арналған сериялық сұйылту әдісі

Әдіс бактерияға қарсы препараттың биологиялық белсенділігін сипаттайтын негізгі сандық көрсеткішті анықтауға негізделген, яғни оның минималды ингибирлеуші концентрациясының шамасы (МИК)-зерттелетін микроорганизмнің өсуін басатын ең аз концентрация (82-сурет). МИК үлкейген сайын антибиотикке сезімталдығы төмендейді.

Бұл әдісті қою нұсқалары:

-сұйық қоректік ортада (сорпада) антибиотикті сериялық сұйылту әдісі; - антибиотикті тығыз ортада сериялық сұйылту әдісі.

Әдістің артықшылықтары: дәлдік, ақпараттылық, сезімталдықты сандық бағалау, көптеген дақылдарды бір уақытта зерттеу мүмкіндігі.

Әдістің кемшіліктері: қағаз дискілері әдісімен салыстырғанда анағұрлым көп материалдар қажет етеді және жасау қиындау. Негізі ғылыми зерттеулер үшін қолданылады.

Сериялық сұйылту әдісі антибиотиктің концентрациясын максимумнан минимумға дейін (мысалы, 64 мкг/мл-ден және т.б. 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл және 0,125 мкг/мл-ге дейін) екі реттік сұйылтуды қолдануға негізделген. Бұл жағдайда әртүрлі концентрациядағы антибиотик сұйық (сорпа) немесе тығыз қоректік ортаға енгізіледі. Содан кейін белгілі бір концентрациядағы бактериялық суспензия антибиотикпен қоректік ортаға орналастырылады. 37 °С температурада инкубациядан кейін 24 сағат ішінде алынған нәтижелерді есепке алу жүргізіледі.

Сорпада (лайлану) немесе агардағы колонияларда микроорганизмнің өсуінің болуы оның тіршілік етуін басу үшін антибиотиктің концентрациясы жеткіліксіз екенін көрсетеді. Антибиотик концентрациясы жоғарылаған сайын микроорганизмнің өсуі нашарлайды. Антибиотиктің бірінші ең төменгі концентрациясы (қатарынан сұйылту сериясынан), онда бактериялық өсу көзбен анықталмайды және ең төменгі ингибиторлық (басым) концентрация (МИК/МПК) болып саналады. МИК мкг/мл өлшенеді.

Антибиотикке сезімталдықты бағалау нәтижелерін түсіндіру зерттелетін микроорганизмді үш категорияның біріне жатқызу болып табылады:

■ **S** «сезімтал» - адам мүшелері мен тіндерінде жасалатын ұсынылған мөлшерлеу режимдерінде АБП концентрациясында белгілі бір штамм басылады. Осы санатқа жататын микроорганизм тудырған инфекцияны емдеу әдетте АБП ұсынылған дозаларда қолданғанда тиімді болады;

■ **I "аралық"** - АБП МИК осы санаттағы штамдарға қатысты сезімтал штамдарға қарағанда жоғары, бірақ ұсынылатын мөлшерлеу режимдерінде қол жеткізуге болатын шектерде болады. Осы санатқа жататын микроорганизм тудырған инфекцияны емдеу АБП-ды жоғары дозаларда қолданғанда не физиологиялық ерекшеліктеріне байланысты АБП-нің жоғары концентрациясы құрылатын ағзаларда немесе тіндерде инфекция ошағын оқшаулау кезінде тиімді болуы мүмкін;

■ **R "тұрақты"** - штамм ұсынылған дозалау режимдерінде ағзалар мен тіндерде пайда болатын АБП концентрациясы кезінде басылмайды. Тұрақты штамдар белгілі бір қарсылық механизмдерінің болуымен сипатталады. Осы санатқа жататын микроорганизм тудырған инфекцияны емдеу тиімсіз болуы мүмкін.



82 сурет - сериялық сұйылту әдісімен МИК анықтау. Интернет желісінен алынған.

4 кесте - Enterobacteriaceae тұқымдасының өкілдерінде АБП-ге сезімталдықты анықтау нәтижелерін түсіндіру критерийлері (сериялық сұйылту әдісі)

АБП	МИК (мг/л)		
	Тұрақты	Аралық	Сезімтал
Ампициллин	≥32	16	≤8
Цефазолин	≥32	16	≤8
Цефтриаксон	≥64	16-32	≤8
Имипенем	≥16	8	≤4
Гентамицин	≥16	8	≤4
Пефлоксацин	≥8	4	≤1
Тетрациклин	≥16	8	≤4
Хлорамфеникол	≥32	16	≤8

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

Зерттеу үшін қажет:

1. Зерттелетін микроорганизмнің оңтайлы өсу жағдайларын қамтамасыз ететін және құрамында антибиотикті инактивациялайтын заттар жоқ қоректік орта;
2. Антибиотиктердің бастапқы (жұмыс) ерітінділері;
3. Антибиотиктерге сезімталдыққа зерттелетін микроорганизмдердің дақылдары.

Жұмыс антибиотикті екі рет қатарынан сұйылту схемасы бойынша дайындаудан басталады (төменге қараңыз). Ол үшін 2 мл сұйық толыққанды қоректік орта стерильді түтіктердің қатарына құйылады. Бірінші пробиркаға антибиотиктің бастапқы (жұмыс) ерітіндісінің 2 мл (препарат концентрациясы – 200 мкг/мл) енгізеді және қоспаны мұқият араластырады. Осыдан кейін бірінші пробиркадан 2 мл сұйықтықты екінші пробиркаға ауыстырады, араластыруды қайталайды, содан кейін екінші пробиркадан 2 мл үшінші пробиркаға ауыстырады және т.б. соңғы пробиркадан 2 мл антибиотик ерітіндісі алынады. Бұл сұйылту әдісімен әр пробиркаға 2 мл антибиотик ерітіндісі болады және әрбір келесі пробиркада оның концентрациясы алдыңғыға қарағанда екі есе аз болады. Соңғы пробиркадағы ортада антибиотик жоқ және дақылдың өсуіне бақылау жасайды. Сұйылтуды дайындағаннан кейін барлық пробиркаларға 1 мл – де 10^5 - 10^4 жасуша болатындай есеппен бактериялардың 0,2 мл суспензиясы енгізіледі. Пробиркалар қатты араластырылып, оңтайлы температурада өсіру үшін термостатқа 18-20 сағатқа орналастырылады.

5 кесте - Антибиотикті екі реттік сұйылтуды дайындау схемасы

Ингредиенттер	Антибиотик концентрациясы мкг/мл								Бақылау
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	
Қоректік сорпа (мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Антибиотикті сұйылту 200 мкг/мл, (мл)	2,0	→ 2,0	→ 2,0	→ 2,0	→ 2,0	→ 2,0	→ 2,0	→ 2,0	-
Бактериялардың 0,2 КОЕ/мл, (мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	2×10 ⁸

2,0

Хаттама №15 Сериялық сұйылту әдісімен бактериялардың антибиотикке сезімталдығын анықтау

Күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	1. 2×10 ⁸ КТБ/мл зерттелетін	1.Схема бойынша антибиотик	

2	бактериялардың суспензиясы 2. Мюллер –Хинтон қоректік сорпасы бар пробиркалар. 3. Антибиотиктің бастапқы сұйылтылған пробиркасы 200 мкг/мл. Антибиотикті сұйырту мен егілген	сұйылтуды дайындаңыз. 2. Барлық сұйылтуларға және бақылау пробиркасына бактериялардың 0,2 мл суспензиясына енгізу . 3.Термостатқа күніне 37°С қойыңыз. 1.Нәтижені ескеріңіз. 2.Қорытындыны жазу.	
---	---	--	--

Нәтижелерді есепке алу: микроорганизмнің өсуінің болуын анықтау үшін дақылдары бар пробиркалар қоршаған ортаның лайлануы арқылы микроорганизмдердің өсуін анықтау үшін өтетін жарықта қаралады. Ортаның лайлылығы бактериялардың көп болуын көрсетеді (10^7 кл/мл-ден астам). Антибиотик микроорганизмдердің өсуін басу үшін жеткілікті концентрацияда болатын пробиркалардағы орта мөлдір болып қалады. Антибиотиктің ең аз концентрациясы, онда микроорганизмдердің көбеюі болмайды, ал түтіктердің мазмұны мөлдір болып қалады, зерттелетін микроорганизмге қатысты осы антибиотиктің ең аз басым концентрациясына (МИК) сәйкес келеді.

Материалдар және жабдықтар: спирт шамы, 2×10^8 КТБ/мл зерттелетін бактериялардың суспензиясы, 2 мл қоректік сорпасы бар 9 пробирка, антибиотиктің бастапқы сұйылтылған пробиркасы 200 мкг / мл, стерильді тамшуырлар 2 мл, пробиркаларға арналған штатив, дезинфекциялық ерітіндісі бар ыдыс, термостат, әйнек сызатын қарындаш.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы// профессор В.Б. Сбойчаков редакциясы, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 80-90.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. РАН В.В. Зверев және профессор М.Н. Бойченко редакциясы, - ГЭОТАР-Медиа, 2012,- б. 123-131.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. профессор. Л.Б. Борисов, - Москва «Медицина», - б. 75-78.

1.16. Зертханалық жұмыс № 16

Тақырыбы: Сілекейдегі лизоцимді титрлеу.

Мақсаты: Сілекейдегі лизоцимді титрлеу әдісін игеру.

Студент білуі керек:

1. Лизоцимнің макроорганизмдегі химиялық табиғаты мен рөлі, оның микробқа қарсы және иммуномодуляциялық әсер ету механизмі, лизоцимді медицинада қолдану спектрі

Студент жасай білуі тиіс:

1. Сілекейдің сұйылтуын дайындау және сілекейдегі лизоцим титрін анықтау

Негізгі теориялық ақпараттар

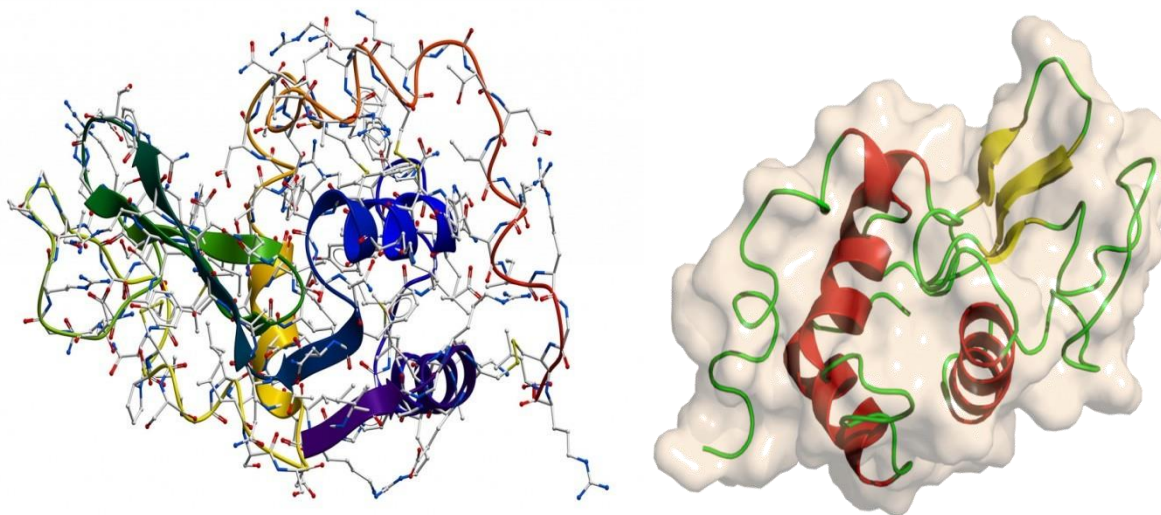
Лизоцим ферментін (мурамидаза, бета-глюкозаминидаза) ағылшын ғалымы А. Флеминг 1922 жылы ашқан. Адам ағзасында ол макрофагтар, нейтрофилдер, шеміршек тіндері, синовиальды мембраналардың жасушалары, сілекей және сүт бездері секреттейді. Лизоцим (83 сурет) жастың сұйықтығында (7000 мкг/мл), сілекейде (200 мкг/мл), мұрын және бронх секрециясында, асқазан және дуоденальды шырында, емшек сүтінде, қан сарысуында (2 мг/л), әртүрлі ұлпалар мен органдардан алынған сығындыларда болады. Әсіресе жануарлардың сілекейінде лизоцим көп, сондықтан олар жараларын жалайды. Лизоцим әйел сүтінде сиыр сүтіне қарағанда 100 мың есе көп. Көз жасында бұл қан сарысуына қарағанда 150 есе көп. Жаңа туған нәрестелердің қан сарысуында лизоцим деңгейі ең жоғары және 3 жылға дейін жоғары деңгейде сақталады, содан кейін төмендейді. Лизоцим сонымен қатар жұмыртқа ақуызында, әртүрлі балықтардың уылдырығында кездеседі. Лизоцимнің болуы өсімдіктердің едәуір бөлігінде (желкек, қырыққабат, шалғам және т.б.) Бұл төмен молекулалы (15 кД) сілтілі фермент бактериялардың жасуша қабырғасын (негізінен грам оң кокктарда) пептидогликан амин қанттары арасындағы β-гликозидті байланыстарды бұзады. Нәтижесінде протопластар пайда болады, олар тұрақсыз және лизиске ұшырайды. Грам оң бактериялар әсіресе лизоцим әсеріне сезімтал *Micrococcus lysodeikticus*, олар 1:40 000 сұйылту кезінде көз жасы сұйықтықпен жойылады.

Өсімдіктер мен жануарлар организмдеріндегі лизоцимнің биологиялық мақсаты түпкілікті анықталған жоқ. Лизоцимнің бактерияға қарсы қасиеттеріне сүйене отырып, зерттеушілердің көпшілігі оны түр (туа біткен) иммунитеттің гуморальды факторларының бірі ретінде қарастырады. Тәжірибелік зерттеулердің материалдары бойынша негізгі бактерияға қарсы әсерден басқа, лизоцим репаративті процестерге ықпал етеді, антиденелер синтезін, фагоцитозды және лейкоциттердің хемотаксисін белсендіреді. Лизоцим фрагменті Thr-Leu-Lys-Arg иммуномодуляциялық қасиеттерге ие деп саналады. Грам-теріс бактериялардан туындаған инфекция жағдайында лизоцим иммунитеттің басқа гуморальды факторымен – комплемент жүйесімен бірге әрекет етеді. Лизоцим сонымен қатар тіндік кедергілердің өткізгіштігін, ауыз қуысының жараларын қалпына келтіру және емдеу процестеріне қатысады. Көптеген патогендік бактериялар (мысалы, менингококктар) антицицимдік белсенділікке ие, бұл олардың патогендік факторы болып табылады. Лизоцимнің вирусқа қарсы қасиеттері де бар.

Тіндік дақылда лизоцим интерферон синтезін ынталандыру арқылы вирустардың көбеюін тежейді.

Интерферон вирустық РНҚ трансляциясын тежейтін ферменттер мен ингибиторлардың синтезін белсендіреді, осылайша көрші жасушаларды вирустық инфекциядан қорғайды. Интерферондардың арқасында жасушалар вирусқа қарсы иммунитетке ие болады. Лизоцимнің ұшық, қызылша, гепатит, полиомиелит және т. б. вирустарға қарсы вирусқа қарсы әсері зерттелді.

Сонымен қатар лизоцимнің ДНҚ мен РНҚ-ны байланыстыратын қасиеті де анықталды. Лизоцимнің нуклеин қышқылдарымен өзара әрекеттесуі әртүрлі әдістермен расталды (гельдік электрофорез, ферментативті белсенділікті анықтау, бірлескен тұндыру) және лизоцимнің дәл осы қасиеті оның АИТВ-1 және де басқа вирустардың репликациясына басым әсер ету қабілетінің негізінде жатыр деген тезисті тұжырымдауға мүмкіндік берді.



83 сурет - Лизоцим молекуласы және лизоцимнің үш өлшемді құрылымы. Интернет желісінен алынған.

Шырышты қабаттардың бетінде бола отырып, лизоцим ағзаның спецификалық емес төзімділігін арттырады және секреторлық IgA өндірісін арттыруға көмектеседі – шырышты иммунитеттің маңызды құрамдас бөлігі. Жас сұйықтықтағы лизоцим деңгейі шырышты иммунитеттің көрсеткіші болып табылады және жоғарғы тыныс жолдарының инфекцияларының даму қаупін болжай алады.

Лизоцим иммундық жүйеге оң ынталандырушы әсер етеді, бірақ иммундық жүйенің инфекцияға шамадан тыс реакциясының жағымсыз әсерін әлсіретеді.

Лизоцимді емдік мақсатта қолдану.

Лизоцим іріңді процестерді, үсіп қалған жерді, күйіктерді (батырмалар мен компресстер), конъюнктивитті, қабақтың эрозиясын (көз тамшылары), афтозды стоматитті (шаю, ауыз ванналары), синуситті, фарингитті, ларингитті (ингаляция) емдеуде тиімді (Сурет 84).

Препараты содержащие лизоцим



84 сурет - Лизоцимі бар препараттар. Интернет желісінен алынған.

Қан сарысуындағы және басқа биологиялық сұйықтықтардағы лизоцимді анықтаудың бірнеше әдісі бар. Ең дәл деп саналады:

1. Белгілі бір уақыт аралығында лизоцим әсерінен тест-микробтың лайланудәрежесінің төмендеуін анықтауға негізделген турбидиметриялық әдіс.
2. Агарға диффузия әдісі, тесіктерден таралатын лизоцим ерітіндісі агардатоктатылған сынақ микробын жояды және лизоцим саңылауларының айналасында мөлдір аймақтар пайда болады, олардың диаметрі зерттелетін субстраттағы лизоцим концентрациясына сәйкес келеді.
3. Иммуноферменттік талдау.

Сілекейдегі лизоцим деңгейін анықтау ауыз қуысындағы қабыну процестерін диагностикалаудың объективті өлшемі болып табылады. Стomatит, гингивит және пародонтоз аурулар кезінде лизоцим синтезі төмендейтіні анықталды.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

Зертханалық жұмыс бастапқы сілекей 1:50 сұйылтуын дайындаудан басталады. Ол үшін пробиркаға 4,9 мл стерильді физиологиялық ерітінді мен 0,1 мл сілекей енгізіліп, мұқият араластырылады. Алынған сұйылтудың 1 мл 1:50-ін бірінші бос пробиркаға және екінші пробиркаға 1 мл стерильді физиологиялық ерітіндіден енгізеді. Екінші пробирканың ішіндегісін мұқият араластырады және одан 1 мл стерильді физиологиялық ерітіндіден үшінші пробиркаға өткізеді, араластырады және 1 мл келесі пробиркаға ауыстырады және т.б. алтыншы пробиркадан 1 мл құйылады, өйткені тест-дақылдың өсуіне арналған жетінші бақылау пробиркасы және оған сілекей енгізудің қажеті жоқ. Содан кейін барлық пробиркаларға 1 млрд.микробтық денелер/мл бар *Micrococcus lysodeikticus* тест-дақылының 1 мл суспензиясынан енгізеді және осыдан кейін ғана 1:100-ден 1:3200-ге дейін сілекейдің түпкілікті сұйылтуын алады. Барлық пробиркалар термостатқа 37°C температурада 3-4 сағатқа орналастырылады, содан кейін нәтижені ескереді.

Сілекей сұйылтуды дайындау схемасы

Ингредиенттер	Сілекейді сұйылту						Бақылау
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
Стерильді - 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 физиологиялық ерітінді (мл)							
Сілекейді сұйылту 1:50, (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Бактериялар суспензиясы		→	→	→	→		
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> 2×10 ⁸ КТБ/мл, (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
							1,0

Нәтижелерді есепке алу: тәжірибелі пробиркалар кезекпен бақылаумен (лайланған) салыстырылады және тест-дақылының лизисі пайда болған сілекейдің ең көп сұйылтылуын табады, яғни пробирканың құрамы мөлдір болды. Бұл пробиркада сілекейдің сұйылту дәрежесі лизоцим титрі болады.

Хаттама №16 Сілекейдегі лизоцимді титрлеу

Зерт. күні	Зерттелетін материал	Жұмыс барысы	Нәтиже
1	1. Сілекей. 2. Стерильді физиологиялық ерітінді. 3. <i>Micrococcus lysodeikticus</i> тест – суспензиясы 1 млрд. микробтық денелер/мл	1. Схема бойынша сілекей сұйылтуды дайындаңыз. 2. Барлық сұйылтуларға және 1 мл тест-культура суспензиясынан енгізу керек. 3. Пробиркаларды термостатқа 37°C кезінде 3-4 сағатқа қою керек. 4. Нәтижені есепке алыңыз. 5. Қорытынды жазу.	

Материалдар мен жабдықтар: стерильді пробиркалары бар штатив, стерильді физиологиялық ерітінді, 1 мл стерильді пипеткалар, сілекей бар пробирка, *Micrococcus lysodeikticus* тест-дақылының суспензиясы 1 млрд. микробтық денелер/мл, термостат.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы / / профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 109-110.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған

нұсқаулық. Акад өндеген. РФА В. В. Зверева және проф. м. н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012.

3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л.Б. Борисов, - Мәскеу "Медицина", - Б. 104.

1.17 Зертханалық жұмыс №17

Тақырыбы: **Заттық шыныдағы агглютинация реакциясы**

Мақсаты: Заттық шыныға агглютинация реакциясын қою және есепке алу техникасын игеру.

Студент білуі керек :

1. Заттық шыныда агглютинация реакциясын қою механизмі мен ауқымы (бағдарлы).

Студент жасай білуі тиіс:

1. Заттық шыныға агглютинация реакциясын қою және есепке алу.

Негізгі теориялық ақпараттар

Иммунодиагностикалық (серологиялық) реакциялар – бұл антигендер мен антиденелер арасында жүретін реакциялар және бұл реакциялар спецификалы және жоғары сезімталдыққа ие.

Иммунодиагностикалық реакциялар медициналық тәжірибеде келесі мәселелерді шешу үшін кеңінен қолданылады:

- диагнозды растау үшін қоздырғыштың белгілі антигендері бойыншанауқастың қан сарысуындағы белгісіз антиденелерді анықтау (серодиагностика);

- диагностикалық сарысудағы белгілі антиденелер бойынша белгісізантигендерді анықтау. Бұл зерттеу науқастын материалынан бөлінген патогеннің таза дақылын анықтау үшін, сондай-ақ микробтардың антигендері мен олардың қандағы және басқа биологиялық сұйықтықтардағы токсиндері анықталған кезде жүргізіледі.

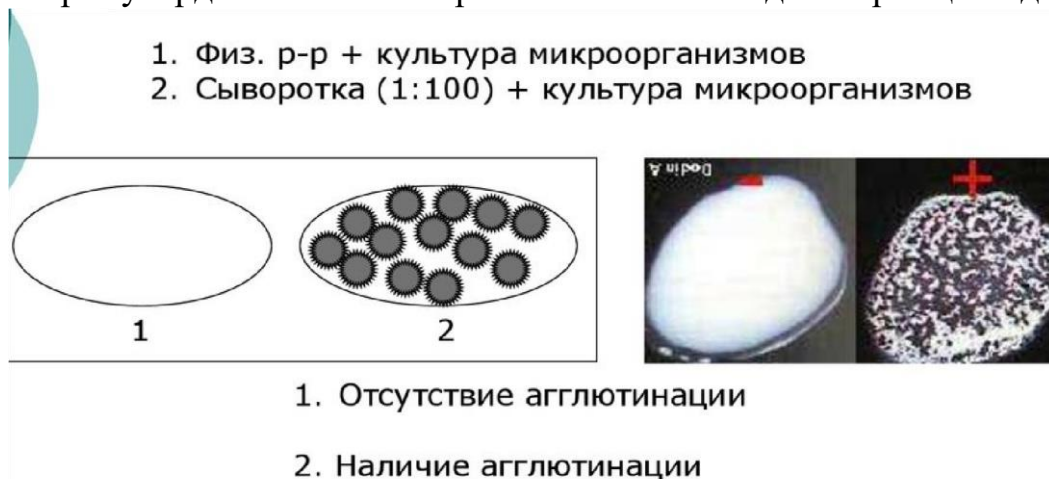
Агглютинация реакциясы - корпускулалық антигендердің (агглютиногендердің) антиденелермен (агглютининдермен) байланысуы жүретін иммунодиагностикалық реакция. Корпускулалық антигендер бактериялар, эритроциттер, оларда сіңірілген антигендері бар ерімейтін бөлшектер, макромолекулалық жүйелер бола алады. Антигендердің антиденелермен әрекеттесуі екі фазадан тұрады. Бірінші фаза – антигендік детерминанттың (эпитоптың) антидененің белсенді орталығымен (паратоп) жылдам байланысы болатын спецификалық фаза. Спецификалық фазадан кейін баяу – спецификалық емес фаза басталады, ол қарапайым көзбен көрінетін үлпектер немесе тұнбаға түсетін дән тәрізді пайда болады.

Реакция электролиттер болған кезде жүреді, мысалы, натрий хлоридінің 0,85% ерітіндісін қосқанда. Түзілген тұнба агглютинат деп аталады.

Қабыршақтардың пайда болуы антиденелердің екі белсенді орталығы бар, ал антигендер поливалентті, яғни бірнеше антигендік эпитопқа ие болуымен байланысты.

Агглютинация реакциясының әртүрлі нұсқалары қолданылады: (пробиркаларда), болжамды (заттық шыныда), жанама және т. б. ТОЛЫҚ

Агглютинацияның болжамды реакциясын науқастан бөліп алған қоздырғышты идентификациялау мақсатында, диагностикалық агглютинациялайтын сарысуды қолданып, яғни серотиптеу жүргізеді. Болжамды реакцияны заттық шыны үстінде жүргізеді. 1:10 немесе 1:20 сұйылтудағы диагностикалық агглютинациялаушы сарысудың тамшысына қоздырғыштың таза дақылын қосады. Қасына бақылау жүргізіледі: сарысудың орнына бір тамшы натрий хлориді ерітіндісі қолданылады, сонымен қатар таза дақылды енгізеді. Нәтижесінде реакция оң болған жағдайда сарысу мен микробтар бар тамшыда үлпек тәрізді тұнба түзілсе, пробиркаларға агглютинацияның толық реакциясы қойылады. Агглютинацияны үлпек тұнба мөлшері мен сұйықтықтың ағарту дәрежесі бойынша ескеріледі. Егер агглютинация диагностикалық сарысу титріне жақын сұйылтуда байқалса, реакция оң деп саналады (сурет 85). Бір уақытта бақылауды ескереді: натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісімен сұйылтылған сарысу мөлдір болуы керек, сол ерітіндідегі микробтардың суспензиясы біркелкі лайланған, тұнбасыз. Әр түрлі туыс бактериялар бірдей диагностикалық агглютинацияланған сарысумен агглютинациялануы мүмкін, бұл оларды анықтауды қиындатады. Сондықтан адсорбцияланған агглютинациялық сарысуларды пайдаланады, оларды туыс бактериялармен адсорбциялау арқылы олардан өзара айқаса әрекеттесетін антиденелер алынып тасталған. Мұндай сарысуларда тек осы бактерияға ғана тән антиденелер сақталады.



1-Бақылау; 2-агглютинат (үлпектер), оң реакция

85 сурет - Заттық шыныдағы агглютинация реакциясының схемасы. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

Майсыздандырылған заттық шыныға спецификалық адсорбцияланған сарысудың (тәжірибе) тамшысы және натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісінің (антигенді бақылау) тамшысын тамызады. Отқа қыздырылған ілмекпен бактериялар дақылын изотониялық ерітіндісіне тамшысын және сарысу тамшысына енгізеді, гомогенді қоспа болғанға дейін араластырады. Дақылды сарысудан изотоникалық ерітіндінің тамшысына ауыстыруға болмайды. Реакция бөлме температурасында 1-3 минут ішінде жүреді.

Нәтижелерді есепке алу. Агглютинацияның оң реакциясы агглютинаттың (үлпектердің) кем дегенде 3+ 3 минут ішінде пайда болуымен сипатталады, әсіресе қиғаш жарықтандыру кезінде қараңғы фонда байқалады. Бақылауда микробтық суспензиясының өздігінен агглютинациясы болмауы тиіс, әлсіз (+) түйіршікті болуына жол беріледі. Нәтижелерді есепке алу қараңғы фонда қиғаш жарықтандыру кезінде немесе 4 - крест жүйесі бойынша 5-7 есе үлкейтетін үлкейткіш әйнектің көмегімен жүзеге асырылады.

- 4+ - жақсы анықталған үлпектері бар сұйықтықтың толық ағартылуы;
- 3+ - жақсы анықталған үлпектері бар сұйықтықтың толық ағартылуы;
- 2+ - агглютинат лайланған сұйықтық аясында анық көрінбейді;
- 1+ - лайланған сұйықтық аясында агглютинаттың аз мөлшері. Агглютинаттың болмауы теріс нәтижеге сәйкес келеді.

Заттық шыныдағы агглютинация реакциясы көбінесе таза дақылдан алынған микроорганизмнің түрін (немесе сероварды) анықтау үшін қолданылады. Агглютинациялайтын адсорбцияланбайтын сарысуларды қолданғанда реакция болжамды болып табылады.

Хаттама №17 Заттық шыныдағы агглютинация реакциясы

Зерт күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	1.Қисайтылған ЕПА-дағы бактериялардың дақылы. 2. Агглютинациялайтын диагностикалық эшерихиозды сарысу. 3. Физиологиялық	1.Майсыздандырылған заттық шыныға агглютинациялық сарысудан тамшы енгізу(тәжірибе), қасына – физиологиялық ерітіндіден тамшы енгізу (бақылау). 2.Отқа күйдірілген бактериологиялық ілмекті бірінші бактерия дақылдан бақылауға енгізу, одан соң тәжірибиеге енгізіп араластыру. 3. 1-3 мин кейін реакцияны ескеріп және бояу.	
	ерітінді.	4.Бактериялардың қандай түрге жататыны туралы қорытынды жасау.	

Материалдар мен жабдықтар: қисайтылған ЕПА пробиркадағы бактериялардың таза өсіндісі, агглютинациялайтын диагностикалық

эшерихиозды сарысуы бар пробирка, физиологиялық ерітіндісі бар пробирка, таза заттық шынылар, сабын, әйнек сызуға арналған қарындаш, спирт шамы, бактериологиялық ілмек, "көпірі" бар лоток, сіріңкелер.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы / / профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - б.129-134.

2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық.

Акад өндеген. РФА В. В. Зверева және проф. м. н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012. , - б.143-150.

3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л.Б. Борисов, - Мәскеу "Медицина", - б.107-112.

1.18 Зертханалық жұмыс №18

Тақырыбы: **Толық агглютинация реакциясы.**

Мақсаты: толық агглютинация реакциясын орнату және есепке алу принциптерін меңгеру.

Студент білуі керек:

1.Толық агглютинация реакциясының механизмі және қолдану аймағы.

Студент жасай алуы тиіс:

1.Толық агглютинация реакциясының нәтижесін интерпретациясы.

Негізгі теориялық ережелер

Науқастың қанында антиденелердің болуын анықтау үшін толық агглютинация реакциясы жүргізіледі (86 сурет): науқастың қан сарысуының сұйылтуларына дианокум (өлтірілген микробтардың суспензиясы) қосылады және 37 °С бірнеше сағат инкубациядан кейін, ең жоғары сарысудың сұйылтуы (сарысу титрі) белгіленеді, бұл кезде агглютинация болғанда, яғни улпек тәрізді тұнба түзіледі (87 сурет). Агглютинацияның сипаты мен жылдамдығы антиген мен антиденелердің түріне байланысты. Мысал ретінде дианокумдардың (О- және Н-антигендер) спецификалық антиденелермен әрекеттесу ерекшеліктерін келтіруге болады. О-дианокуммен агглютинация реакциясы (қызумен өлтірілген, термотұрақты О-антигенін сақтайтын бактериялар) ұсақ түйіршікті агглютинация түрінде жүреді. Ндианокуммен агглютинация реакция (формалинмен өлтірілген, ыстыққа төзімді талшықты Н-антигенін сақтайтын бактериялар) ірі түйіршікті және жылдамырақ жүреді.

Бұл әдіс зерттелетін адамның қан сарысуындағы антиденелерді анықтау үшін жиі қолданылады (мысалы, бруцеллезбен – Райт реакциясы, іш сүзегімен

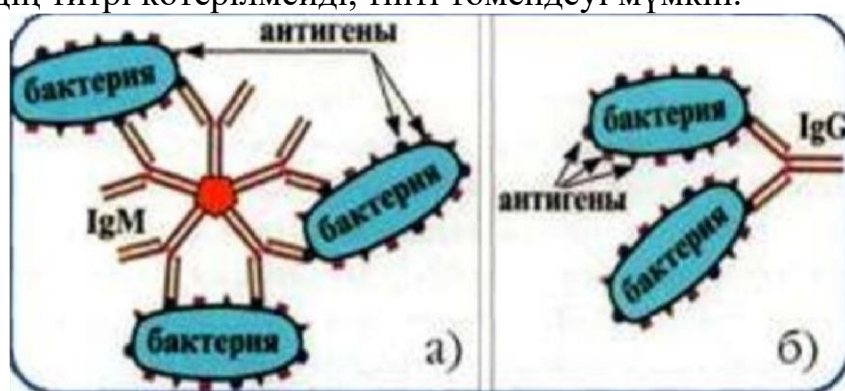
– Видаль реакциясы). Микроорганизмнің түрін (немесе сероварын) анықтау үшін толық агглютинация реакциясын қолдануға болады. Агглютинация реакциясын қоюдағы мүмкін қателер:

1. Спонтанды (өздігінен) агглютинация. Кейбір жасушалар, әсіресе R формасындағы микробтар біртекті (гомогенді) суспензия бермейді, тез тұнбаға түседі. Бұған жол бермеу үшін өздігінен агглютинацияланбайтын S- пішінді дақылдарын пайдаланыңыз.

2. Сау адамдардың қан сарысуында белгілі бір микроорганизмдерге қарсы антиденелер («калыпты антиденелер» деп аталады) болады. Олардың титрі жоғары емес, сондықтан 1:100 және одан жоғары сұйылтудағы реакцияның оң нәтижесі оның ерекшелігін көрсетеді.

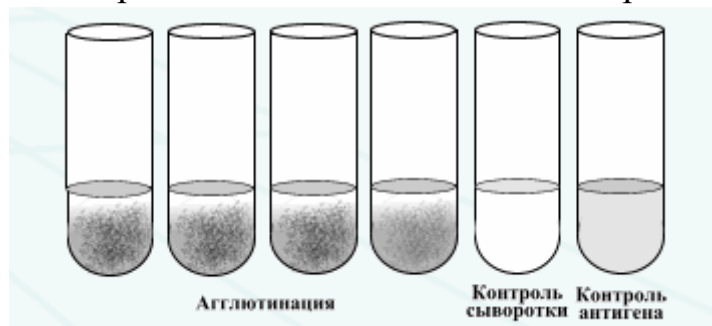
3. Антигендік құрылымы ұқсас микробтармен топтық реакция. Мысалы, ішсүзегімен ауыратын науқастың сарысуы да паратиф А және В бактерияларын агглютинациялауы мүмкін. Спецификалықтан айырмашылығы топтық әлде реакция төменгі титрлерде жүреді. Адсорбцияланған сарысулар топтық реакция бермейді.

4. Аурудан кейін және тіпті вакцинациядан кейін де спецификалық антиденелер ұзақ уақыт сақталуы мүмкін екенін атап өткен жөн. Олар анамнездік деп аталады. Оларды қазіргі ауру кезінде түзілген инфекциялық антиденелерден ажырату үшін реакцияны ауру динамикасында тексереді, яғни науқастың сарысуын зерттейді, 7-10 күннен кейін қайтадан алады. Антидене титрінің жоғарылауы аурудың болуын көрсетеді; анамнездік антиденелердің титрі көтерілмейді, тіпті төмендеуі мүмкін.



а - с IgM; б - с IgG

86 сурет - Агглютинация реакциясының механизмі. Интернет желісінен алынған.



87 сурет - Кенейтілген агглютинация реакциясы. Интернет желісінен алынған.

Агглютиноскоп (agglutinoscopum) — бұл құрылғы көмегімен агглютинация реакциясының нәтижелері анықталады және бүйірлік жарықтандыру кезінде реакция нәтижесінде пайда болған тұнбаны визуалды бағалау жүргізіледі (88 сурет).

Агглютиноскоп құйылған штативтен тұрады, оның жоғарғы жағында үш түтігі орналасқан, сонымен қатар пробиркалар үшін тесіктер бар. Көру саңылауының үстіндегі көлденең түтіктің үстінде көзілдірігі бар ұя бар, бұл зерттелетін объектіні үлкейту үшін қолданылатын құрылғы элементі, ол зерттеушінің көз алдында орналасуы керек. Окуляр екі томпақ фокустық линзасы бар қысқа түтік, линзаның ұзындығы 36 мм және зерттелетін объектінің бейнесін 7 есе арттырады.



88 сурет – Агглютиноскоп. Интернет желісінен алынған.

Штативтің төменгі жағында дөңгелек айна бекітілген шанышқы бар, оның функциясы жарықтың көру тесігіне бекітілген бағыты болып табылады. Айна жарық көру терезесіне түсетін етіп орнатылуы керек. Түтікке және қараңғылыққа орнатылады, оны реттеп, қажетсіз жарықты жоюға болады.

Көлденең түтіктегі тесіктерге (ұяларға) зерттеуге арналған сұйықтығы бар пробиркаларды енгізіңіз, содан кейін оңтайлы жарықтандыру деңгейін реттей отырып, айнамен және күңгіртпен жұмыс жасаңыз, содан кейін окуляр түтігін айналдыру арқылы кескіннің анықтығын реттеңіз. Агглютиноскоптың көмегімен микроскопиялық (ұсақ түйіршікті) агглютинация анықталады. Агглютиноскопта **агглютинат** зерттеледі – реакциядан кейін түзілген тұнба, шөгінді реакциялардың нәтижелері бағаланады.

Зертханалық жұмыстың барысы

- Сарысуды стерильді түрде шынтақ венасынан немесе саусақтан 1-2 мл мөлшерінде алынған қаннан алады.
- Реакцияны орнатпас бұрын сынақ сарысуының 1:50 бастапқы сұйылтуындайындайды, бұл үшін 0,1 мл тұтас сарысу 4,9 мл физиологиялық

ерітіндімен араластырылады. Алынған сарысуды сұйылту су моншасында 56 °С температурада 30 минут бойы қызады.

- Диагностикум (белгілі бактериялардың антигендері) реакция алдында шайқауарқылы мұқият араластырылады және 0,85% натрий хлориді ерітіндісімен 10 рет (10^9 КҚБ/мл дейін) сұйылтылады.

- Әрі қарай схемаға сәйкес пациенттің сарысуының сериялық сұйылтуларыдайындалады. Ол үшін 5 пробирканы алады, оған 1,0 мл 0,85% натрий хлориді ерітіндісін қосады. Содан кейін бірінші пробиркаға жұмыс сұйылтылған (1:50) 1,0 мл сарысу құйылады. Натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі мен сарысуды мұқият араластырып, қоспаны пипетка көмегімен, пробиркаға құяды (нәтижесінде бірінші пробиркада 1:100 сұйылту алынады). Бірінші пробиркадан 1,0 мл мөлшеріндегі қоспаны екінші пробиркаға құйып, 1:200 сұйылту алынады, екіншісінен үшіншіге және т.б. Бесінші пробиркадан 1,0 мл қоспа құйылады, өйткені барлық түтіктердің көлемі бірдей болуы керек.

Осылайша, сарысудың сериялық екі еселенген сериялық сұйылтулары алынады – 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600.

- Барлық түтіктерге 2 тамшы диагностикум суспензиясы қосылады. Түтіктердің мазмұны шайқау арқылы араласады.

- Алтыншы пробиркада қан сарысуын бақылау (1,0 мл сарысу 1:50), жетінші пробиркада диагностикалық бақылау (1,0 мл физиологиялық ерітінді + 2 тамшы диагностикум) дайындалады.

- Түтіктерді термостатта 37°C 2 сағат бойы инкубациялайды (алдын ала есепке алу), содан кейін келесі күнге дейін бөлме температурасында (16-22°C) ұстайды және реакцияның соңғы нәтижесін ескереді.

Агглютинацияның кеңейтілген реакциясын құру схемасы.

Ингредиенттер	Сарысуды сұйылту					КС	КД
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600		
Стерильді тұзды ерітінді (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Науқастың қан сарысуы 1:50, (мл)	1,0	→ 1,0	→ 1,0	→ 1,0	→ 1,0	1,0	-
Диагностикум (тамшы)	2	2	2	2	2	-	2

↓
1,0

Нәтижелер бақылау түтіктерінен бастап жазылады: сарысу абсолютті мөлдір, қабыршақсыз, антигенді бақылауда – біркелкі лайлы болуы керек (кейбір бактерия дақылдары өздігінен агглютинация бере алады, бұл жағдайда реакцияны есепке алу мүмкін емес). Реакцияның оң нәтижесімен пробирка түбінде жабысқақ бактериялардың тұнбасы пайда болады, пробиркадағы сұйықтық азды-көпті мөлдірленеді; түтікшені ақырын шайқағанда, тұнба үлпектерге айналады. Нәтижелер визуалды түрде немесе агглютиноскоптың

көмегімен (ұсақ түйіршікті агглютинациямен) 4-кресттік жүйе арқылы жазылады:

4+ - сұйықтықты жақсы анықталған үлпектермен толық ағарту;

3+ - сұйықтықтың толық анықталған қабыршақтары бар дерлік ағартылуы; 2+ - агглютинат бұлыңғыр сұйықтық фонында анық емес көрінеді; 1+ - лайлы сұйықтық фонында агглютинаттың аз мөлшері.

Агглютинаттың болмауы теріс нәтижеге сәйкес келеді.

Қан сарысуында және диагностикалық бақылауда спонданды агглютинация болмаған жағдайда АР кем дегенде 3+ бағаланған кезде оң деп саналады. Реакция титрі анықталады – оң реакция байқалатын сарысудың ең жоғары сұйылтуы.

ХАТТАМА №18 Кеңейтілген агглютинация реакциясы

Зерттеу күні	Зерттелетін материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Науқастың қан сарысуы 1:50	<p>1. Схема бойынша сарысудың сериялық сұйылтуларын дайындаңыз және оларға диагностикум қосыңыз.</p> <p>2. Түтіктерді термостатта 2 сағат 37⁰С -та инкубациялаңыз.</p> <p>3. Кеңейтілген агглютинация реакциясының алдын ала нәтижесін ескеру.</p> <p>4. Реакцияның нәтижесін салыңыз және қорытынды жасаңыз.</p>	

Материалдар мен жабдықтар:

Сынақ сарысуы, диагностикум, физиологиялық ерітінді, пробиркалары бар стеллаж, 1 мл пипеткалар, термостат, агглютиноскоп.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық зерттеулергенұсқаулық. Оқулық // Редакциялаған профессор В.Б.Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа,- 2012, - б.129-134.

2. Микробиология, вирусология. Практикалық жаттығуларға нұсқау.Редакциялаған акад. РАС В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012, - б.143-150.

3. Микробиологиядағы зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Редакцияменпроф. ФУНТ. Борисов, - Мәскеу «Медицина», - б.107-112.

1.19 Зертханалық жұмыс №19

Тақырыбы: Преципитация реакциясы

Мақсаты: пробиркада преципитация реакциясын орнату әдісін меңгеру.

Студент білуі керек:

1. Преципитация реакциясының микробиологиялық диагностикасында механизмі, қою әдістері және қолдану ауқымы;

Студент жасай алуы тиіс:

1. Пробиркадағы преципитация реакциясын қою және нәтижесін дұрыс түсіндіру.

Негізгі теориялық ережелер

Преципитация реакциясы

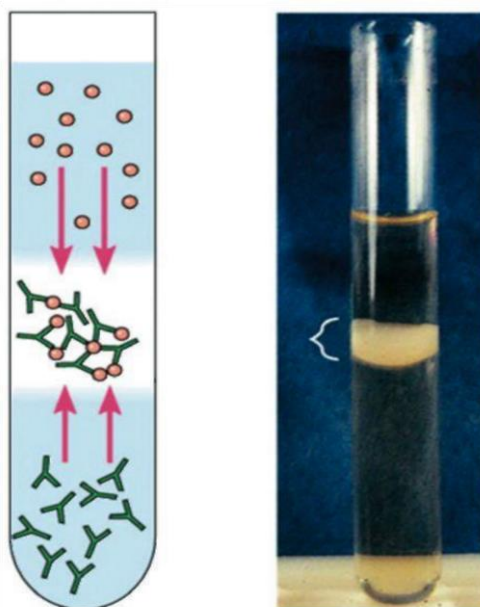
Бұл реакцияның мәні еритін жоғарыдисперсті антигеннің (преципитиноген) электролит ерітіндісіндегі (физиологиялық ерітінді) әсерінен тұнбаға түсуі болып табылады (преципитат). Преципитация реакциясын толыққанды антигендермен - ақуыздық сипаттағы заттармен де, төмен антигендермен гаптендермен де қоюға болады. Преципитация реакциясы өте жоғары сезімталдықпен сипатталады және антиген ақуызының шамалы мөлшерін анықтауға мүмкіндік береді (1:100 000 және одан жоғары сұйылтылғанға дейін).

Преципитация реакциясы жұқпалы ауруларды (оба, туляремия, сибір жарасы, шешек) диагностикалау үшін зертханалық тәжірибеде, сондай-ақ белоктардың түрлерін (қан дағы, шәует және т.с.с.) анықтау үшін сотмедициналық сараптамада қолданылады. Бұл реакцияны пайдалана отырып, санитарлық тәжірибеде балық және ет, ұн өнімдерін фальсификациялау, табиғи балға жасанды бал мен жануардың бір түрінің сүтін басқа түрдің сүтіне қосу анықтау болып табылады. Биологияда преципитация реакциясы әртүрлі жануарлар мен өсімдіктердің филогенетикалық байланысының дәрежесін анықтау үшін қолданылады.

Преципитация реакциясының негізгі әдістері сақиналы преципитация реакциясы және гельді преципитация реакциясы болып табылады. Сақиналы преципитация арнайы жіңішке пробиркаларда жүргізіледі, антигеннің дәйекті сұйылтулары пробиркалардағы диагностикалық сарысудың стандартты сұйылтуында қабаттастырылады, бұл ретте тұнба екі ортаның шекарасында сақина түрінде түзіледі (сақиналы преципитация). Реакция антигеннің максималды сұйылтуымен бағаланады, бұл кезде преципитация сақинасы визуалды түрде байқалады. Сонымен қатар, бұлыңғырлықты аспаптық әдістермен – нефелометриямен бекітеді

Жұмыс барысы

Сақиналық преципитация реакциясын орнату кезінде диаметрі аз пробиркаға 0,5 мл приципиттеуші сарысу құйылады, содан кейін пастер пипеткасының көмегімен сарысуға 0,5 мл еріген антиген мұқият қабатталады. Бұл жағдайда пробирканы көлбеу күйде ұстау керек, ал антигенді қабаттауды сұйықтықты қан сарысуымен араласпай, үстіңгі қабат түзетіндей етіп түтіктің қабырғасы бойымен абайлап түсіру арқылы жүргізу керек. Оның үстінде. антигенді қосқаннан кейін түтік абайлап тік күйге ауыстырылады және штативке орналастырылады. Оң нәтижемен екі ерітіндінің шекарасында бірден немесе 5-10 минуттан кейін мөлдір емес тұнбаның бұлтты сақинасы пайда болады (сурет 89).



89 сурет - Сақиналы преципитация реакциясы. Интернет желісінен алынған.

ХАТТАМА №19 Преципитация реакциясы

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	1. Еритін антиген	1. Пробиркаға 0,5 мл тұндырғыш	
күн	2. Тұндырғыш сарысу	сарысуды қосыңыз. 2. Антиген ерітіндісін пипеткамен абайлап қабаттаңыз. 3. Нәтижені ескеру, суретін салу. 4. Қорытынды жасаңыз.	

Материалдар мен жабдықтар: еритін антиген, тұндырғыш сарысу, пипеткалар, штатив, пробиркалар.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық зерттеулергенұсқаулық. Оқулық // Редакциялаған профессор В.Б.Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - б.129-139.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық жаттығуларға нұсқау. Редакциялаған акад. РАС В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, - ГЭОТАРМедиа, - 2012, - б.115-121.
3. Микробиологиядағы зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Редакцияменпроф. ФУНТ. Борисов, - Мәскеу «Медицина», - 1984, б.36-42.

1.20 Зертханалық жұмыс №20

Тақырыбы: **Комплементтің байланысу реакциясы**

Мақсаты: комплементті байланыстыру реакциясын орнату және есепке алу техникасын меңгеру.

Студент білуі керек:

1.Комплементті байланыстыру реакциясының зертханалық диагностикасында қолдану механизмі мен көлемі.

Студент жасай алуы тиіс:

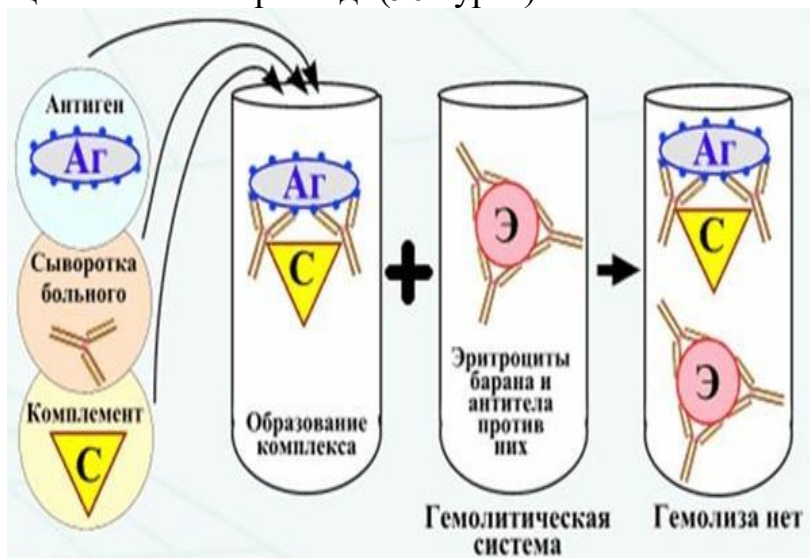
1.Комплементті байланыстыру реакциясының нәтижесін бағалау.

Негізгі теориялық ережелер

Комплементті байланыстыру реакциясы (КБР) бактериялық, риккетсия, вирустық және протозойлық инфекциялармен ауыратын науқастардың қан сарысуындағы антиденелерді анықтау үшін, сондай-ақ вирусологиялық зерттеу кезінде вирустарды анықтау және типтеу үшін кеңінен қолданылады. Мерезді диагностикалау үшін қолданылатын КБР Вассерман реакциясы, гонорея – оны осы ауруларды диагностикалау үшін қолдануды ұсынған микробиологтардың құрметіне Борде-Жангу реакциясы деп аталды. КБР деп (антиген, антидене және комплемент) басқа гемолитикалық (индикаторлық) жүйе де қатысатын, реакция нәтижесін ашатын күрделі серологиялық реакцияларды айтады.

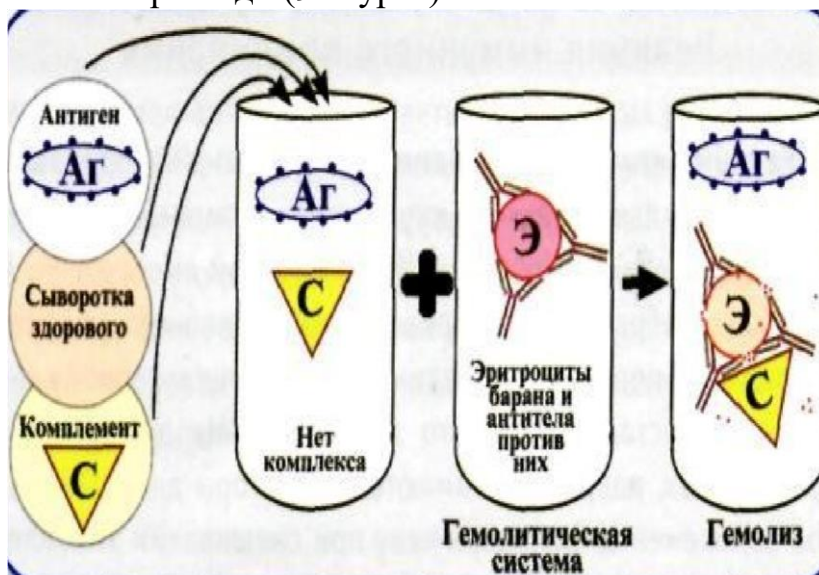
КБР екі фазада жүреді: біріншісі – антигеннің антиденемен комплементтің қатысуымен әрекеттесуі, екіншісі – гемолитикалық жүйе арқылы комплементтің байланысу дәрежесін анықтау. Бұл жүйе қой эритроциттерінен және зертханалық жануарларды (қояндарды) қой эритроциттерімен иммундау арқылы алынған гемолитикалық сарысудан тұрады. Эритроциттер өңделеді – оларға 37°C температурада 30 минут ішінде гемолитикалық сарысу қосу арқылы сенсбилизацияланады. Сенсбилизацияланған қой эритроциттерінің лизисі гемолитикалық комплемент жүйесіне қосылған жағдайда ғана жүреді. Комплемент болмаған кезде эритроциттердің лизисі болмайды.

КБР нәтижелері зерттелетін сарысуда антиденелердің болуына байланысты. Егер сарысуда реакцияда қолданылатын антигенге гомологиялы қажетті антиденелер болса, онда пайда болған антиген-антидене кешені комплементті байланыстырады. Гемолитикалық жүйені қосқанда, бұл жағдайда гемолиз болмайды, өйткені бүкіл комплемент антиген-антидене кешенімен белгілі бір байланысқа жұмсалады. Осылайша, гемолиздің болмауы КБР оң нәтижесін көрсетеді (90 сурет).



90 сурет - КБР механизмі (оң нәтиже). Интернет желісінен алынған.

Алайда, егер зерттелетін сарысуда қажетті антиденелер болмаса, онда АГАТ кешені түзілмейді, комплемент бос қалады, гемолитикалық жүйеге қосылады және мембраналық шабуыл кешенінің түзілуімен классикалық жолмен белсендіріледі, эритроциттерді бұзады. Яғни, гемолиздің басталуы КБР теріс нәтижесін көрсетеді. (91 сурет)



91 сурет - КБР механизмі (теріс нәтиже). Интернет желісінен алынған.

КБР орнату үшін келесі **компоненттер** қажет:

1. **Тексерілген сарысу** (өзінің комплементін жою үшін 56°C 30 минут қыздыру арқылы алдын ала инактивацияланады).

2. **Антиген** (өлген микробтардың суспензияларынан, микроб лизаттарынан, микробтардың жеке химиялық фракцияларынан, толық антигендерден, гаптендерден, ұлпа липидтерінің сығындыларынан жасалған). Антигенге қойылатын негізгі талап – комплемент белсенділігінің тежелуінің болмауы. Антигеннің бұл қасиетін ашу үшін реакцияда қолданылатын антигеннің қатысуымен комплемент қосымша титрленеді.

3. **Комплемент** (комплемент ретінде теңіз шошқасының жаңа қан сарысуы қолданылады, өйткені комплемент теңіз шошқасының қанында ең көп мөлшерде болады және үнемі болады немесе ампулада құрғақ комплемент). КБР тағайындау алдында комплемент 1:10 сұйылтылады және титр – осы реакцияда қолданылатын гемолиздік жүйемен біріктірілгенде эритроциттердің гемолизін беретін комплементтің ең аз мөлшері белгілеу үшін гемолиз реакциясында титрленеді. Антигеннің мүмкін болатын антикомплементарлық қасиеттерін ескере отырып, белгіленген комплемент титріне реакцияны орнату кезінде 20-30% арттыру жүргізіледі және комплементтің жұмыс дозасы алынады. Комплемент концентрациясы КБР үшін жұмыс дозасынан артық қабылдаса, комплемент иммундық кешенмен байланысқаннан кейін комплементтің бір бөлігі байланыссыз қалады және гемолизді тудырады (жалған-теріс реакция). Комплемент концентрациясын жұмыс дозасынан төмен болады, теріс реакция (жалған оң реакция) жағдайында да гемолиз болмайды.

Кесте 8 - Комплемент титрлеу схемасы

Ингредиенттер, мл	Пробиркалар											
	Тәжірибе										Бақылау	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Гемолитикалық жүйе	Эритроциттер
Изотониялық ерітінді	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Комплемент 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	-	0,5
Гемолитикалық жүйе	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		-
3% қой эритроциттерінің суспензиясы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Пробирки жақсылап шайқайды және 37°C-та 1сағ. бойы инкубациялайды												
Нәтижелер	Гемолиз жоқ		Гемолиз								Гемолиз жоқ	

Бұл мысалда комплемент титрі - 0,15 мл, жұмыс дозасы – 0,2 мл

4. **Гемолитикалық сарысу**, жануарларды иммундау арқылы алынатын, мысалға қой эритроциттерімен қоянды иммунизациялау. Гемолитикалық сарысуы бар

ампуланың жапсырмасында оның титрі, яғни комплементтің қатысуымен эритроциттердің толық лизисін тудыратын сарысудың максималды сұйылтуы көрсетілген. Реакцияны орнату кезінде сарысу үш есе титрде қолданылады. Мысалы, гемолитикалық сарысудың титрі 1:1200, ал жұмыс сұйылтуы (үштік титр) 1:400.

5. **Қой эритроциттерінің 3% суспензиясы.** Эритроциттер дефибринирленген қой қанынан натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісімен үш рет жуу арқылы алынады.
6. **Физиологиялық** **ерітінді** (0,9% **натрий**
хлоридінің **ерітіндісі**).

Жұмыс барысы

Реакцияны орнату үшін 4 пробирканы дайындау керек.

№1 пробиркаға (эксперименттік) 0,5 мл зерттелетін сарысуды, антигенді және комплементті қосады.

№2 пробиркаға (сарысуды бақылау) антигеннің орнына 0,5 мл зерттелетін сарысу, комплемент және физиологиялық ерітінді қосылады.

№3 пробиркада (антигенді бақылау) зерттелетін сарысудың орнына 0,5 мл комплемент, антиген және физиологиялық ерітінді қосылады.

№4 пробиркада үш титрдегі (1/600) 2 мл гемолитикалық сарысудан және қой эритроциттерінің 2 мл 3% суспензиясынан гемолитикалық жүйе дайындалады. Реакцияның 1 фазасын жүргізу үшін барлық пробиркаларды 37°C термостатқа 45-60 минут қояды.

2 фаза: гемолитикалық жүйесі бар 4 пробиркадан қалған 3 пробиркаға 1 мл гемолитикалық жүйеден енгізу, пробиркалардың ішіндегісін сілкі және оларды 37°C кезінде термостатқа 45-60 минутқа қою. Реакция нәтижесін ескеріп, қорытынды жасау (кесте 5).

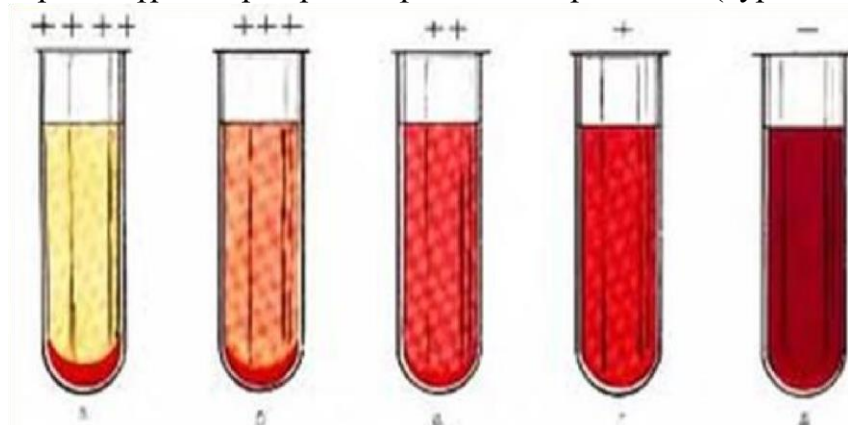
Кесте 9 - Комплемент байланысу реакциясын орнату схемасы

Реакция фазасы	Ингредиент саны	Реакцияға қатысатын ингредиенттер	Пробирка нөмірі		
			1 (тәжірибелік)	2 (бақылау I)	3 (бақылау II)
I	1	1:5 физиологиялық ерітіндімен сұйылтылған мл-де зерттелген сарысу	0,5	0,5	-
	2	Жұмыс дозасындағы антиген	0,5	0,5	0,5
	3	Жұмыс дозасында комплемент	0,5	0,5	0,5
	4	Физиологиялық ерітінді, мл	-	0,5	0,5
Термостатта 37°C-та 1 сағат.					

II	1	Гемолитикалық жүйе	1,0	1,0	1,0
Термостатта 37°C -та 1 сағат.					

Реакция нәтижелері гемолитикалық жүйеде эритроциттердің гемолизінің болуы немесе болмауымен ескеріледі. **Теріс реакция** кезінде эритроциттер жойылады, гемолиз байқалады («лак қан» - мәтінді оқуға болатын мөлдір қызыл сұйықтық). **Оң реакция** кезінде эритроциттердің суспензиясы (мәтінді оқуға болмайтын лайлы қызыл сұйықтық) немесе түйме түріндегі тесік түбінде эритроциттердің тұнбасы байқалады.

Нәтижелерді бағалау: оң нәтижеде әртүрлі дәрежедегі гемолиздің кешігуі байқалады, бұл шартты түрде төрт крест жүйесімен көрсетіледі (сурет 92).



4+ гемолиздің толық кешігуі (қатты оң нәтиже);

3+ оң;

2+ әлсіз оң;

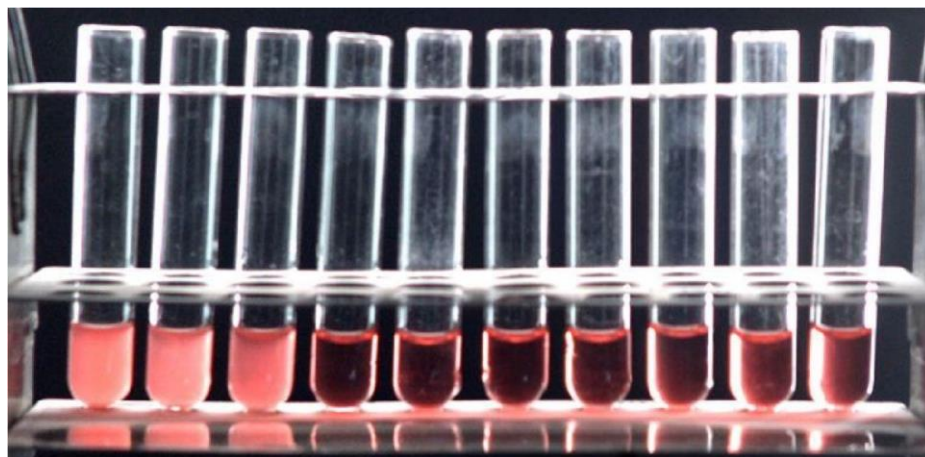
+-

күмәнді;

-- теріс

92 сурет – КБР нәтижесін бағалау. Интернет желісінен алынған.

КБР тұжырымының сандық нұсқасы бір тәжірибелік түтіктің орнына сынақ сарысуының әртүрлі сұйылтуларымен бірнеше дайындалады. КБР титрі сарысудың ең жоғары сұйылтуы болып саналады, яғни. Оң нәтиже жазылған соңғы түтік (сурет 93)



93 сурет - Комплемент байланыстыру реакциясы (сандық).

Интернет желісінен алынған.

Хаттама №20

Науқастың сарысуында комплемент байланыстыратын АТ анықтау.

Зерттелінетін материал	Жұмыс барысы	Нәтиже
1. Науқастың 1/5 сұйытылған сарысуы	<p>1 фаза: Схема бойынша тамшуырдың көмегімен ингредиенттерді 4 пробиркаға салыңыз: тәжірибелі, сарысуды бақылау, антигенді бақылау және гемолитикалық жүйе үшін. Пробиркаларды термостатқа 37°С кезінде 45-60 мин.</p> <p>2 фаза: Гемолитикалық жүйесі бар пробиркадан қалған 3 пробиркаға 1 мл, түтіктердің ішіндегісін шайқау және термостатқа 37°С температурада 45-60 минутқа қою.</p> <p>2. Нәтижені ескеріп, қорытынды жасау.</p>	

Материалдар мен жабдықтар: пробиркалар, штатив, зерттелетін сарысу, антиген, комплемент, физиологиялық ерітінді, 1 мл-ге арналған тамшуыр-дозаторлар, гемолитикалық сарысу, қой эритроциттерінің суспензиясы, термостат.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 137-138.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Акад өңдеген. РҒА в. В. Зверев пен проф. М. Н. Бойченко, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- С. 156-158.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов өңдеген - Мәскеу "Медицина",-1984, Б.118-122.

1.21. Зертханалық жұмыс №21

Тақырыбы: **Фагоцитозды зерттеу**

Мақсаты: туа біткен иммунитеттің жасушалық факторларын зерттеу

Студент білуі керек:

1. Фагоцитарлық жасушалардың сипаттамасы. Фагоцитоз кезеңдері.
2. Нейтрофильді фагоциттердің функционалдық белсенділігін бағалау.

Студент жасай алуы тиіс:

1. Фагоцитоз кезеңдерін анықтау

Негізгі теориялық ережелер

19 ғасырдың аяғында орыс биологы И.И.Мечников Пастер институтында (Париж) жұмыс істеген кезде иммундық реакцияларды жүзеге асырудағы жасушалардың рөлін зерттеді.

Фагоцитоз, бөгде затты жұту процесі, антидене синтезінің ерекшелігін қажет етпейтін қорғаныс реакциясы. Эволюция тұрғысынан бұл қарапайымнан бастап барлық тірі организмдерге тән ең ежелгі қорғаныс механизмі.

И.И.Мечников теңіз омыртқасыздарының (губкалар мен целентераттар) фагоцитозын зерттеп, қозғалғыш амебодты жасушалардың денеге түскен көмір бөлшектерін қалай сіңіретінін байқады.

И.И.Мечников ашқан құбылыс адамға да тән.

Фагоцитоз – организмнің табиғи төзімділігін қамтамасыз ететін маңызды реакциялардың бірі. Бұл хемотаксис, кейіннен фагосома түзілетін объектіні басып алу, фагосома мен лизосоманың фаголизосома түзілуімен бірігуі және сіңірілген объектінің протеолитикалық деградациясын қамтитын көп сатылы процесс.

Фагоцитоздың әртүрлі кезеңдеріндегі бұзушылықтар көптеген патологиялық жағдайлардың дамуына әкеледі.

Фагоцитозды жүзеге асыра алатын жасушаларды И.И. Мечников микрофагтар мен макрофагтарға бөлді. Микрофагтар (алғашқы сағаттарда, тәулікте), содан кейін макрофагтар (бірнеше күн ішінде) қабыну ошағына бірінші болып миграцияланады.

Микрофагтарға гранулоциттер, атап айтқанда перифериялық қан нейтрофилдері жатады. Олардың функционалдық белсенділігі мен сіңіру қабілетін бағалау үшін фагоцитоз сынағы қолданылады, ол фагоцитарлы индекс пен фагоцитарлы санды анықтауға мүмкіндік береді.

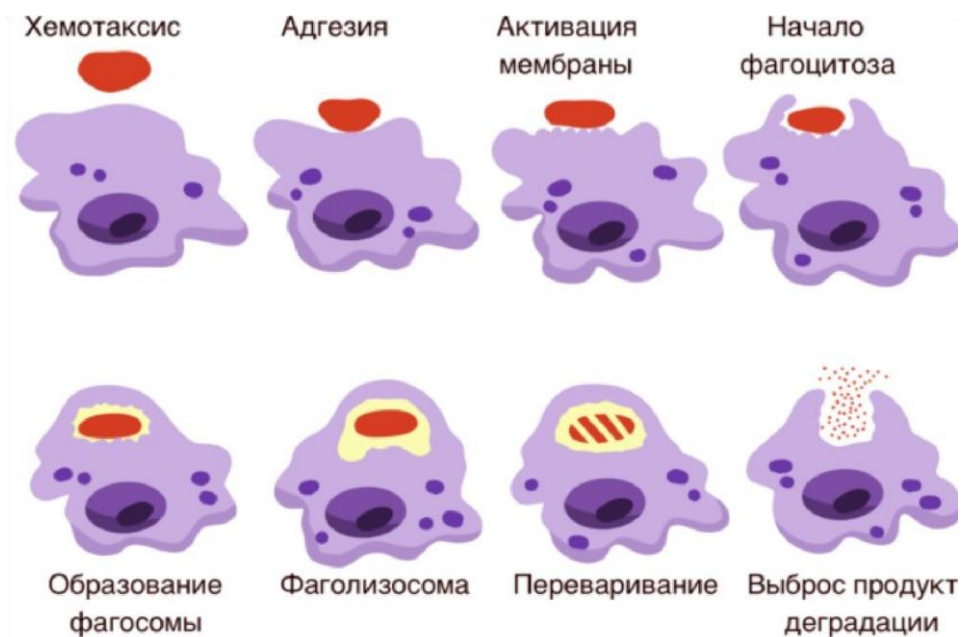
Фагоцитарлық индекс (фагоцитарлық индекс) – белсенді фагоциттердің пайызы, яғни. Құрамында фагоциттелген материал бар. Қалыпты ФИ (ФП) = ересектерде 60–90%, балаларда – 30-65%.

Фагоцитарлық сан – бір фагоцитке сіңетін бөлшектердің орташа саны. Қалыпты ФС 30 минут инкубация = 4,5–7,5 бөлшектер.

Нейтрофильді және макрофагты фагоцитоздың негізгі кезеңдерінің ортақтығына қарамастан, нейтрофилдер мен макрофагтар жүзеге асыратын фагоцитоз процесіне тән белгілер бар. Нейтрофил өзінің эффекторлық қызметін (фагоцитозды) бір рет орындай алады, содан кейін әдетте өледі. Макрофаг қайта-қайта фагоциттенеді.

Сонымен қатар, макрофагтар антигендерді өңдейді және ұсынады.

Фагоцитоз процесі хемотаксистен, адгезиядан, мембрананың активтенуінен, фагосома түзу үшін объектіні батырылуынан, фагосома мен лизосоманың бірігуінен, фагоцитоз объектілерін өлтіруден және ыдыратудан; ыдырау өнімдерінің шығарылуынан тұрады (94-сурет).



94 сурет - Фагоцитоз кезеңдері. Интернет желісінен алынған.

Жұмыс барысы

Фагоцит жасушаларын таңдау. Фагоцитозды зерттеуге арналған негізгі жасушалар перифериялық қан нейтрофилдері болып табылады, өйткені макрофагтар тіндерде локализацияланған.

Дайындау: 4 сағаттық аштықтан кейін тамырдан қан алуға рұқсат етіледі. Қан тапсыру қарсаңында және күні қарқынды физикалық белсенділікті, алкогольді қабылдауды және темекі шегуді болдырмау керек. Су ішуге болады.

Фагоцит жасушаларын алу шарттары. Гепаринизацияланған веноздық немесе капиллярлық қанды пайдалануға болады, бірақ лейкоциттердің суспензиясымен жұмыс істеу ыңғайлы. Лейкоциттердің суспензиясын алу үшін веноздық гепаринизацияланған қанды пробиркада 45° бұрышпен 37°C температурада 30-40 минут инкубациялайды. Эритроциттердің өздігінен шөгуінен кейін жоғарғы қабат негізінен плазмадан және онда суспензияланған лейкоциттерден тұрады.

Фагоцитоз объектісін таңдау. Фагоцитозды зерттеуге арналған сынақ объектісі ретінде микроорганизмдердің суспензиясы (*Staphylococcus aureus* немесе *E. Coli*) және диаметрі 3 мкм латекс бөлшектері де пайдаланылуы мүмкін. Латекс бөлшектерін қолданудың кемшілігі - фагоцитоздың аяқталу дәрежесін анықтау мүмкін еместігі (яғни, фагоцитоз объектісінің бұзылуы және жойылуы).

Фагоцитоз объектісін дайындау шарттары. Қиғаш қоректік агардағы *S. aureus* бір күндік дақылынан немесе *E. coli* физиологиялық ерітіндімен микробтық колонияларын жуады және алынған суспензияны қажетті (1×10^9 /мл) концентрацияға жеткізу оптикалық лайлану стандартын қолдану арқылы жүзеге асырылады.

Лайлану стандарты – белгілі бір концентрациядағы диаметрі 1–2 мкм инертті бөлшектердің суспензиясы бар ампулалық препарат (лайлану стандарттары мл-ге 1×10^6 бөлшектер, мл-ге 1×10^9 бөлшектер және т.б. үшін қол жетімді). Микробтық суспензияның концентрациясын қажетті деңгейге жеткізген кезде стандарттың бұлыңғырлығын лайлылық стандартының бірдей диаметрлі пробиркаға орналастырылған микробтардың суспензиясымен визуалды

салыстыру жүргізіледі. Микробтық суспензия концентрациясының асып кеткені көрінсе ол физиологиялық ерітіндімен сұйылтылады. Бұл тәсілдің негізгі кемшілігі субъективті есептеу болып табылады, сондықтан неғұрлым қолайлы нұсқа – фотоэлектрколориметрдің (ФЭК) көмегімен микробтық суспензияның концентрациясын автоматтандырылған анықтау.

Реакция шарттары. Пробиркада бірдей көлемде (100 мкл +100 мкл немесе 50 мкл + 50 мкл) микробтық және лейкоциттік суспензиялар (немесе гепаринделген қан) араластырылып, 37°с 30 мин температурада инкубацияланады (бұл уақыт нейтрофилдердің миграциялануына, микробтардың цитоплазмалық мембранаға адгезиялануына және фаголизосоманың түзілуі үшін қажет), содан кейін центрифугаланады (5 мин, 1500 айн/мин) және тұнбадан жағындылар дайындалады. Жағындыларды ауада кептіреді, этанолмен 15 мин.немесе Никифоров қоспасында 10 минут бекітеді, Романовский-Гимзе бойынша 20-30 мин. бояйды, ағынды суда шаяды және микроскоппен қарайды.

Нәтижелерді тіркеу. Нәтижелер 10×90 үлкейту арқылы иммерсиялық микроскоп жүйесі астында есепке алынады. Микробтар қою күлгін (немесе қою көк) түске боялған, жақсы контурланған. 100-200 нейтрофилдердің ішінде фагоцитарлық жасушалардың саны мен сіңірілген микробтардың жалпы саны есептеледі.

Фагоцитоз белсенділігінің көрсеткіштері:

1.ФИ (фагоцитарлық индекс) – фагоцитарлық нейтрофилдердің пайызы – фагоцитозға түскен жасушалардың олардың жалпы санының пайызы, $ФИ = (\text{бактерияларды жұтқан фагоциттер саны}/\text{қаралған нейтрофилдердің саны}) \times 100\%$. Мысалы, 200 нейтрофилдің ішінде микробтың 64 жасушасын фагоцитоздайды, бұл $ФИ = (64/200) \times 100\% = 32\%$ дегенді білдіреді.

2.ФС – фагоцитарлық сан, жұтылған микробтардың орташа саны – жұтылған микробтардың жалпы санының фагоцитоздың пайызына бөлінетін бөлігі. Мысалы, 64 нейтрофилдер 214 бактерияны фагоциттеді, содан кейін $ФС = 214/64=3,34$ Стафилококк суспензиясын қолданғанда фагоцитоздың қалыпты көрсеткіштері: ФП–

45–75; ФС – 4,5-7,5.

Зерттеуге көрсеткіштер:

- иммунитет тапшылығымен жүретін жағдайлар
- ауыр соматикалық патология
- аутоиммунды патология

ХАТТАМА №21 Фагоцитозды зерттеу

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1 күн	Фагоцитоздың әртүрлі кезеңдерінің дайын жағындылары	1. Микроскоппен қарау 2. Сурет салу 3. Қорытынды жазу	

Материалдар мен құрал-жабдықтар: дайын жағындылар, иммерсиялық объективті биологиялық микроскоп, иммерсиялық май.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық зерттеулергенұсқаулық. Оқулық // Редакциялаған профессор В.Б.Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - С.129-139.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық жаттығуларға нұсқау. Редакциялағанакад. РАН В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, ГЭОТАР-Медиа, - 2012, - С.115121.
3. Микробиологиядағы зертханалық зерттеулерге нұсқаулық. Редакциямен проф. ФУНТ. Борисов, - Мәскеу «Медицина», - 1984, С.36-42.

2. Жеке микробиология вирусологиямен

2.1. Зертханалық жұмыс № 1

Тақырыбы: **Фурункулездің бактериологиялық зерттеу әдісі.**

Мақсаты: Стафилококты инфекцияның диагностикалаудың микробиологиялық әдістерін меңгеру

Студент білуі керек:

1. Стафилококтық инфекцияның микробиологиялық диагностикалау әдістерін.

Студент жасай білуі тиіс:

1. Микробиологиялық зерттеудің жолдамасы мен нәтижесін жазу;

2. Коккалық флораға ірің себу;

3. Бөліп алынған стафилококк дақылын идентификациялау;

4. Диско-диффузиялық әдіспен антибиотикке сезімталдықты анықтау нәтижелерін интерпретациялау.

Негізгі теориялық ақпараттар

Стафилококтарды алғаш рет 1878 жылы атақты неміс микробиологы Р. Кох сипаттаған (100 сурет).



95 сурет - Роберт Кох (Heinrich Hermann Robert Koch, 1843-1910 жж.) Интернет желісінен алынған.

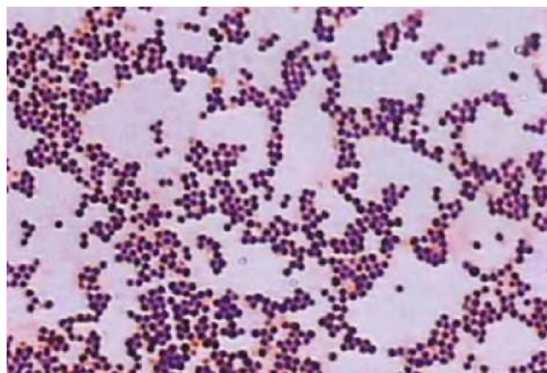
Стафилококтарды 1880 жылы Л. Пастер (сурет101) және Огстон ашқан. Туыстастық атын Огстон ұсынған (staphyle-жүзім шоғыры, coccus-дән, жидек), ал туыстастық сипаттамасын Розенбах баяндаған.



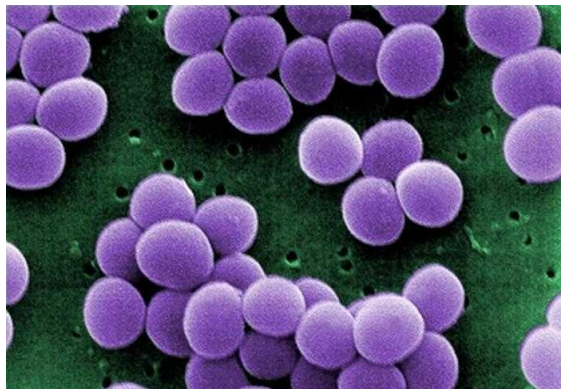
96 сурет - Луи Пастер (Louis Pasteur 1822-1895 жж.) Интернет желісінен алынған.

Адамдар үшін клиникалық маңызды стафилококк түрлері *Staphylococcus aureus* (97 сурет), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intetrmedius* және кейбір басқа да түрлері.

Іріңді инфекцияны көбінесе стафилококктардың келесі түрлері тудырады *Staph.aureus*, *Staph.epidermidis*, *Staph.saprophyticus*.



97 сурет - *Staph.aureus* таза дақылы (Грам бойынша) Интернет желісінен алынған.



98 сурет - Стафилококкалар (электрондық микроскопия) Интернет желісінен алынған.

Бұлар диаметрі 0,5-1,5 мкм грам-оң коккалар, жүзім шоғыры түрінде орналасқан. Микроскоптың астында күлгін түсті жүзімнің шоғырына ұқсайды. Қозғалмайды, спора түзбейді, микрокапсула түзуі ықтимал. Тыныс алу типі бойынша факультативті анаэробтар, қоректену типі бойынша хемоорганотрофтар. Нитраттарды нитриттерге дейін қалпына келтіреді, лизоцимге төзімді.

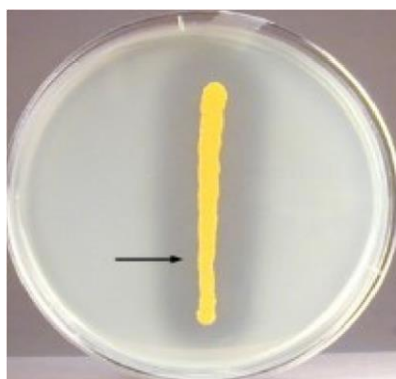
Қан агарында стафилококктар ақ немесе алтын түсті, тегіс, дөңгелек, тегіс жиектері бар, диаметрі 1-3 мм гемолитикалық және гемолитикалық емес мөлдір емес колонияларды түзеді. Стафилококк колониялары гемолиз аймағымен қоршалуы мүмкін және көп жағдайда алтын, бозғылт сары немесе лимон сары түстес пигмент түзеді. СТА ортасында (сарыуызды-тұзды агар) өскен колониялар, қиғаш жарықта көрінетін тәж тәрізді сақина орналасады (99 сурет).



99 сурет - СТА ортасында (сарыуызды-тұзды агар) *S. aureus*-тің

колониялары, қиғаш жарықта көрінетін тәж тәрізді сақина ретінде орналасады (лецитиназаның болуы). Интернет желісінен алынған.

Элективті-дифференциалды ортада, әдетте, тек стафилококк колониялары өседі. СТА-да колониялардың айналасында лецитиназа өнімдері анықталады. Анаэробты жағдайда инкубацияланған маннит - полимиксин агарында маннит ферменттелген жағдайда стафилококк колониялары мен олардың айналасындағы орта сары түске боялады. ДНҚ-аза- *Staph.aureus* патогенділік ферменттерінің бірі, оның болуы ДНҚ қосылған қоректік ортада зерттеледі (100-сурет).



100 сурет - *Staph.aureus* ДНҚ-агардағы нуклеазалық белсенділігі.

Интернет желісінен алынған.

Стафилококктарды идентификациялау

1. Каталазаға сынама

Зерттелетін штамның таза дақылын шыны таяқшаның көмегімен заттық шыны үстіндегі 3-10% сутегі асқын ерітіндісінің тамшысына салады және дөңгелек қозғалыстармен ысқылайды. Оң жағдайларда газ көпіршіктерінің шығуы байқалады (101 сурет).



а



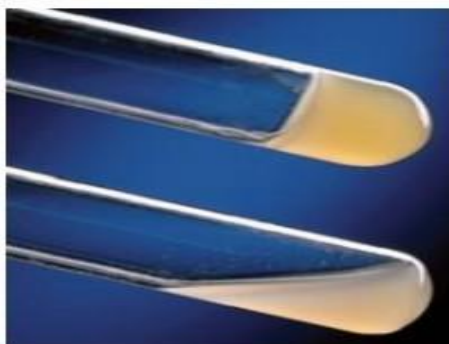
б

101 сурет - Стафилококк каталазасын қоректік агарда (а) және шыныда (б) сутегі асқын тотығының көмегімен анықтау. Интернет желісінен алынған.

2. Плазмокоагулазаға реакция қою

2 рет сұйылтылған қан плазмасын пробиркаларға 0,4 мл-ден құяды, оған стафилококктың зерттелетін таза дақылдарының бір ілмегі енгізіледі және 37°C термостатқа орналастырады. 2, 4, 24 сағаттан кейін тәжірибе нәтижелері есепке алынады. Плазмокоагулаза болған кезде плазма ұйып қалады.

Патогенетикалық белгілер тұрғысынан стафилококктардың плазмокоагулазаны өндіру қабілеті бойынша жіктелуі маңызды болып табылады (102 сурет). Осы белгісі бойынша стафилококктар коагулаза оң немесе коагулазопозитивті (оларға алтын түсті стафилококк жатады – *S. aureus*) және коагулаза теріс немесе коагулазонегативті стафилококктар (оларға эпидермальды және сапрофитті стафилококктар жатады – *S. epidermidis* және *S. saprophyticus*) болып бөлінеді.



102 сурет - Плазманың коагулазамен ұюы (жоғарғы пробирка) және фибринолизинмен ұюды сұйылту (төменгі пробирка).

Интернет желісінен алынған.

5. Қан агарында гемолиз сынамасын қою.

Метаболикалық белсенділік нәтижесінде *Staph. aureus* қан лизисін (гемолиз) тудыратын әртүрлі экзотоксиндерді (гемолизиндер) өндіреді.

Қан агарының ерекшелігі-микроорганизмдердің гемолитикалық белсенділігін байқау және оларды гемолиз түріне қарай ажырату мүмкіндігі (103 сурет). β -гемолиз (бета-гемолиз) — микроорганизмнің өсу аймағында қоректік орта түссізденетін эритроциттердің толық лизисі. Гемолиздің бұл типі стафилококктарға тән.



103 сурет - *Staph. aureus* дақылдарының айналасындағы қан агарында бета-гемолиз. Интернет желісінен алынған.

5. Сахаролитикалық белсенділікке сынама қою

Стафилококктардың биохимиялық белсенділігі жоғары: олар аэробты жағдайда көптеген көмірсуларды сірке қышқылына газсыз ашытады. Атап айтқанда, *S. aureus* глюкозаны, сахарозаны, лактозаны, маннитті қышқылға дейін ыдыратады және мальтозаны ыдыратпайды (104 сурет).



104 сурет - Алтын түсті стафилококктардың көмірсуларды ыдыратуы. Гисс орталары. Интернет желісінен алынған.

Жұмысты орындау барысы

Стафилококтық инфекциясына күдік туындаған кезде іріңді микробиологиялық зерттеу.

Зерттеу материалы – фурункулдан алынған ірің. Бактериологиялық лабораторияға жолдама жазу.

I. Бактериоскопиялық зерттеу: іріңнен жағынды дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскоппен қарау, қорытынды шығару.

II. Бактериологиялық зерттеу:

1 күн: зерттелетін материалды СТА-ға Петри табақшасына ілмекпенсебу. Термостатта 37°C 18-24 инкубациялау.

2 күн: кесте бойынша СТА-да өскен колонияларға сипаттама беру. Колонияның бір бөлігінен жағынды препарат дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскопиялау. Стафилококктардың таза дақылын алу үшін жағындысынан стафилококктар табылған өсімді қисайтылған агары бар пробиркаға қайта себу.

3 күн: қисайтылған агардағы өсім. Өсімге сипаттама беру және алтынпигменттің болуын ескеру. Дақылдың тазалығын тексеру үшін: жағынды дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскопиялау. Патогенділікке тест қою: плазмокоагулазаға сынама; қан агарындағы гемолиз; маннитті ыдырату. ЕПАға антибиотиктер дискілері бар Петри табақшасына себу.

4 күн: патогенділікк тестілерінің және антибиотикке сезімталдықнәтижелерін есепке алу. Қорытынды жасаңыз, зерттеу нәтижесін бланкіге жазу. **Зерттеу материалының жолдамасының үлгісі**

	Нысанның БҚСЖ бойынша қолы Код формы по ОКУД КҰЖЖ бойынша ұйым коды _____ Код по ОКПО
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения РК	ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің 2005 жылғы 08 шілдедегі №332 бұйрығымен бекітілген №204 / е нысанды Медициналық құжаттама
Ұйымның атауы/ Наименование организации М. Оспанов атындағы БҚММУ медицина орталығы Медицинский центр ЗКГМУ им. М. Оспанова.	Медицинская документация Форма № 204 / у Утверждена приказом Министра здравоохранения РК №332 от «08» июля 2005 года

организации

Микробиологиялық зерттеуге (алғашқы рет, қайталап)

ЖОЛДАМА / НАПРАВЛЕНИЕ

на микробиологическое исследование (первичное, повторное)

№ _____

20 ____ ж.(г.) сағ (час) _____ мин.

материал алыну күні мен уақыты (дата и время взятия материала) (в) зертханаға (лабораторию)

Тегі, аты, әкесінің аты (Фамилия, имя, отчество) _____

Туған күні (Дата рождения) _____

Медициналық карта (медицинская карта) № _____

ұйым (организация) _____

Бөлімше (Отделение) _____ палата _____ учаске(участок) _____
Тұрақты мекен-жайы (уақытша болса, қаралушы кімнің үйінде тұрып жатыр, т.а.э.а. көрсетіңіз) (Адрес
постоянного места жительства) (временного с указанием ф.и.о. у которого проживает обследуемый)

Жұмыс, оқу орны (балалар мекемесінің, мектептің атауы) _____

(Место работы, учебы (наименование детского учреждения, школы) _____

Диагнозы, ауырған күні (Диагноз, дата заболевания): _____

Зерттелу көрсеткіштері: науқас, бұрын ауырған, реконвалесцент, бактерия тасушы, _____

түйісуші, алдын ала зерттеу. (Показания к обследованию: больной, переболевший, реконвалесцент,
бактерионоситель, контактный, профилактическое
обследование) _____

астын сызып, толықтырып жазыңыз (подчеркнуть, вписать) _____

Материал: қан, несеп, нәжіс, қақырық, дуоденум сұйықтығы, жұлын сұйықтығы, пунктат, жарадан аққан
сұйықтық, ірін, терleme, кесу материалы, жылбысқы қабықтың жағындысы, қырнама және басқалар
(Материал: кровь, моча, кал, мокрота, дуоденальное содержимое, спинномозговая жидкость, пунктат, раневое
отделяемое, гной, выпот, секционный материал, мазок со слизистых, соскоб и др.)
астын сызып, материал қайдан қайдан келгенін көрсетіп жазыңыз (подчеркнуть, вписать, указав, откуда получен

Зерттеудің атауы мен мақсаты (цель и наименование исследования): _____

материал) _____

кандай жұқпалы ауруларға зерттеу керек (на какие инфекции исследовать) _____

Материал жіберген адамның лауазымы, тегі, қолы (Должность, фамилия, подпись лица, направляющего
материал) _____

Микробиологиялық зерттеу нәтижелері бар бланкілерді оқу және бағалау дағдылары.

Микробиологиялық зерттеулердің нәтижелері стандартты бланктерге
толтырылады және ауру тарихына немесе амбулаторлық картаға
жапсырылады. Мұнда, болжамды патогенді немесе шартты-патогенді
қоздырғыштың бары немесе жоқтығы көрсетіледі. Микроб атауы бинарлы
номенклатура бойынша беріледі, яғни қоздырғыштың туысы және түрі
көрсетіледі.

Жауап үлгісі

		Нысанның ТКЖК бойынша қолы ҚҰЖК бойынша ұйым коды КодорганизациипоОКПО
ҚР Денсаулық сақтау министрлігі Министерство здравоохранения РК		ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің 2005 жылғы 08 шілдедегі №332 бұйрығымен бекітілген №239/енысанды Медициналық құжаттама
Ұйымның атауы/Наименование организации М. Оспанов атындағы БҚММУ медицина орталығы Медицинский центр ЗКГМУ им.М.Оспанова.		Медицинская документация Форма № 239 / у Утверждена приказом Министра здравоохранения РК №332 от «08» июля 2005года

КодформыпоОКУД

МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕСІ РЕЗУЛЬТАТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

№ _____

_____ 20 _____ 20ж.(г.) ж(г.)

Биоматериал _____ әкелінген _____ күні _____ (дата поставки материала) _____ Зерттеу күні (дата исследования)

Тегі, аты, әкесінің аты (Фамилия, имя,отчество)

Туған күні (Дата рождения)

Ұйым (Организация)

Бөлімше (Отделение) _____ палата _____ учаске (у

Медицин

(медицинская карта)№

Зерттегенде (при исследовании)

Қандай материал көрсетіңіз (указать какой материал)

« _____ » _____ 20 ж.(г.) Қолы (Подпись) _____

Хаттама № 1

Фурункулезді бактериологиялық зерттеу әдісі.

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	2	3	4
1	Шиқаннан алынған ірің.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Жолдама, қағаз толтыру. 2. Іріңнен жағынды дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскоппен қарау, суретін салу. 3. Зерттеу материалды ілмекпен Петри табақ-шасындағы сарыуызды-тұзды агарға себу. 	
2	Петри табақшасындағы СТА-ғы өсім.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Дақылды кесте бойынша сипаттау. 2. Лецитиназа ферментінің болуына немесе болмауына назар аударыңыз. 3. Өскен дақылдардың бір бөлігінен жағынды дайындау, Грам әдісімен бояу, микроскоппен қарау. Дақылдардың екінші бөлігін қисайтылған агарға себу. 	
3	Қисайтылған агардағы өсім.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Өсімді сипаттау (кесте бойынша). 2. Өсімнің тазалығын тексеру, таза дақылды Грам әдісімен бояу, микроскоппен қарау. Суретін салу. 3. Патогендік тесттерін анықтау, <ul style="list-style-type: none"> - плазмокоагулазаға сынама; - қанды агарда гемолиз; - маннитті ыдырату. 4. Антибиотикке сезімталдығын қағазды диск әдісімен анықтау. 	
4	Манниттегі, қанды агардағы, плазмадағы өсім. Антибиотиктер дискасы бар ЕПАғы өсім.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Нәтижесін есепке алу. 2. Айырып алған таза өсімді қорытындылау. 	

Материалдар мен жабдықтар: фурункулдан алынған ірің, спирт шамы, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза заттық шынылар, спиртовка, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза заттық шынылар, препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа, сүзгіш қағаз, әйнек сызуға арналған қарындаш (стеклограф), дезинфекциялық

ерітінді, СТА стерильді орталары бар Петри табақшалары, қисайтылған агары бар пробирка, термостат, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, Грам бойынша бояғыштар жиынтығы, антибиотикке сезімталдықты анықтауға арналған дискілер.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 149-152.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 258-264.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 133137.

1.1. Зертханалық жұмыс №2

1.2.

Тақырыбы: **Гонореяның микроскопиялық диагностикасы**

Мақсаты: гонококк инфекциясын диагностикалаудың микроскопиялық әдісін игеру

Студент білуі керек:

1. Гонореяны микробиологиялық диагностикалау әдістері **Студент білуі керек:**

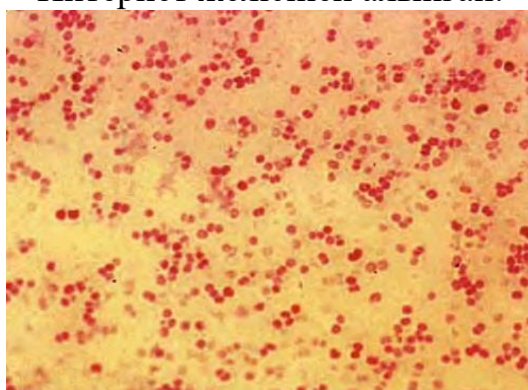
- 1.Микробиологиялық зерттеудің жолдама жазу және нәтижесін рәсімдеу;
- 2.Бекітілген микропрепаратты дайындау, оны қарапайым әдіспен, Грам әдісімен бояу;
- 3.Боялған жағындылардың микроскопиялық нәтижелерін бағалау

Негізгі теориялық ережелер

Гонорея қоздырғыштары - *Neisseria gonorrhoeae* - кофе дәндері тәрізді грам теріс диплококктар (105 сурет), қозғалмайтын, спора түзбейтін, нәзік капсуласы және пили жіпшесі бар. Гонококктарды талғамды қарапайым бактериялар. Атмосферада табиғи сарысу ақуызы бар ортада 3-10% CO₂ өседі. Тығыз ортада олар кішкентай, түссіз колонияларды түзеді.



105-сурет - *Neisseria gonorrhoeae* (электронды микроскопия)
Интернет желісінен алынған.



106 сурет-*Neisseria gonorrhoeae*, таза дақыл (Граммен)
Интернет желісінен алынған.

Бактериологиялық зерттеудің тиімділігі көбінесе қоректік ортаның сапасына байланысты. Гонореяны культуралық диагностикалауға арналған орталар қоян етінен немесе асцит сұйықтығы (асцит-агар) қосылған бұқа жүрегі, қан сарысуы, ашытқы гидролизаты, казеин қосылған етопептонды агар негізінде дайындалады. Зерттелетін материал қоректік ортаның бетіне себіліп, құрамында 10-20% көмірқышқыл газы бар атмосферада 24-72 сағат ішінде 37°C температурада инкубацияланады. Гонококктар шық тамшыларына ұқсайтын дөңгелек, мөлдір немесе сәл бұлыңғыр колонияларды құрайды.



107 сурет – Қан агарындағы *Neisseria gonorrhoeae* өсімі.
Интернет желісінен алынған.

Бөлінген таза дақылдар морфологиялық, тинкториалдық және биохимиялық қасиеттерімен анықталады. Зерттеудің соңында штаммның пенициллинге төзімділігін анықтау үшін ферменттер - β -лактамазалардың болуын анықтау қажет.

Созылмалы гонорейда немесе дәрілік терапия аясында бактериоскопиялық зерттеу көбінесе аурудың болуы немесе болмауы туралы қорытынды жасауға мүмкіндік бермейді, өйткені бұл жағдайларда гонококктар жағындыларда мүлдем анықталмауы немесе атипті формада болуы мүмкін (шарлар түрінде немесе, керісінше, өте кішкентай түзілімдер) және тинкториалды қасиеттері. Мұндай жағдайларда бактериологиялық зерттеу жүргізу қажет. Бактериологиялық немесе дақылдық әдіс міндетті түрде гонореймен ауыратын науқастарды емдеу аяқталғаннан кейін, балалардағы ауруды диагностикалау кезінде, сот-медициналық сараптаманың талабы бойынша және басқа да жағдайларда бақылау үшін қолданылады.

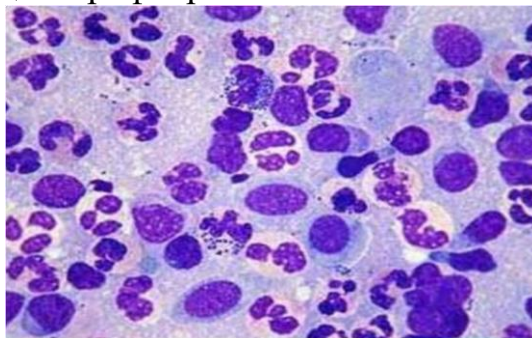
Жұмыстың жасалу барысы

1. Зерттеуге арналған материал: ерлерде - уретрада бөлінісі, қуық асты безінің шырыны, спермалар; әйелдерде - қынаптан, уретрадан және жатыр мойны каналының бөлінісі. Сондай-ақ, басқа ықтимал зақымданулардың шырышты қабаттарынан (тік ішек, жұтқыншақ, көздің конъюнктивасы) қырынды алынады. Материал стерильді ілмекпен, мақта тампонымен немесе қасықпен соңғы зәр шығарудан немесе жуудан кейін 2 сағаттан кейін алынады.

Зерттелетін материалдан екі жағынды дайындалады, олардың біреуі Граммен, екіншісі қарапайым әдіспен (метилен көк) бояйды,

Метилен көк түсімен бояу. Метилен көк түсімен бояу болжамалы болып табылады. Метилен көкінің сулы немесе спирттік ерітінділерін қолдануға болады. Спирттік ерітіндісін қолдану бояу сапасын төмендетпестен препаратты бекіту уақытын қысқартуға мүмкіндік береді. Метилен көк гонококкты өте жақсы түрде анықтатады, бұл оның пішінін, мөлшерін, макроорганизм жасушаларымен өзара әрекеттесу сипатын нақты анықтауға мүмкіндік береді.

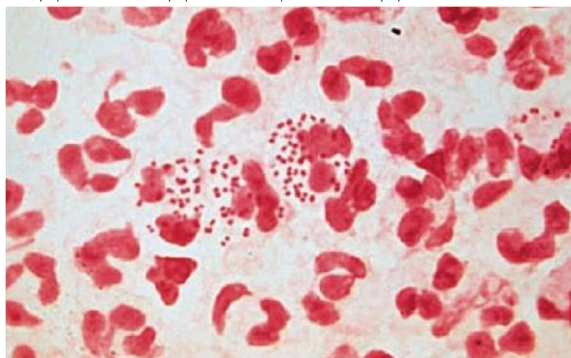
Метилен көкпен боялған жағындыларды бағалау. Препараттың микроскопиясында көрінеді: көк түске боялған жасуша ядролары; әртүрлі қарқындылықтағы көк түске боялған цитоплазма; әртүрлі қарқындылықтағы көк түске боялған бактериялық микрофлора.



108 сурет - Іріңдегі *N. gonorrhoeae* (метилен көк түспен боялған)
Интернет желісінен алынған.

Граммен боялған жағынды анықталған кокктардың соңғы түрлік дифференциациясы үшін қажет. Оң нәтижеде жағындыларда бұршақ тәрізді грамтеріс диплококктар анықталады (109-сурет). Стафилококктар мен стрептококктар грам-оң кокктар болып табылады, олар әдетте лейкоциттерден тыс орналасады. Гонококктар-ақ қан клеткаларының ішінде орналасқан бұршақ тәрізді грамтеріс диплококктар (1,2-0,8 мкм).

Негізінде оң бактериоскопиялық диагноз гонорейяның жедел түрінде антибиотиктерді қабылдағанға дейін қойылады.



109 сурет - Іріндегі *N. gonorrhoeae* (Граммен бояу), аяқталмаған фагоцитоз. Интернет желісінен алынған.

Боялған жағындылардың микроскопиялық нәтижелерін бағалау

Микроскопиялық зерттеу негізінде гонорейя диагнозы гонококктың үш белгісі бойынша белгіленеді:

- оның формасы (бұршақ тәрізді диплококктар);
- орналасу (жасушадан тыс және жасушаішілік);
- бояу (грам теріс).

Барлық үш белгінің болуы ғана диагноз қоюға мүмкіндік береді. Егер олардың кем дегенде біреуі болмаса, дақылдық зерттеу қажет.

ПРОТОКОЛ №2 Гонорейяның микроскопиялық диагностикасы

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Уретрадан бөлінді	1.Микробиологиялық зерттеуге жолдама жазу; 1. Бөлінетін уретрадан жағындыдайындау, метилен көкпен бояу, микроскопиялау, суреттеу. 2. Бөлінетін уретрадан жағындыдайындау, грамммен бояу, микроскопиялау, суреттеу. 3. Боялған жағындылардың микроскопиянәтижелерінің бағасын жазып,	

		қорытынды жасау. 4. Микробиологиялық зерттеу нәтижесін жазу.	
--	--	---	--

Материалдар мен жабдықтар: уретрадан бөлінді, спирттік шам, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, заттық шыны, препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа, сүзгі қағазы, Шыныға арналған қарындаш (стеклограф), дезинфекциялық ерітінді, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, метилен көк суспирттік ерітіндісі және Грам бояғыштарының жинағы.

Әдебиет:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Оқу құралы // редакциялаған профессор В.Б. Сбойчаков, доцент М. М. Карапац, - ГЕОТАР-Медиа, - 2012, 166-169 б.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. Акад редакцияда өндеген. РАН В.В. Зверев және проф. М.Н. Бойченко, - ГЕОТАРМедиа, - 2015, 292-294 б.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға нұсқаулық. Проф. Л.Б. Борисовтың редакциясымен - Мәскеу "Медицина", - 1984, б.222.

2.3. Зертханалық жұмыс №3

Тақырыбы: Шигеллездің бактериологиялық диагностикасы

Мақсаты: шигеллезді диагностикалаудың микробиологиялық әдістерін игеру

Студент білуі керек:

1. Шигеллезді микробиологиялық диагностикалау әдістері.

Студент жасай білуі тиіс:

1. Микробиологиялық зерттеуге жолдама және жауап қағаз жазу;
2. Науқастың нәжісін Плоскиревтің селективті ортасына себу;
3. Shigella туыстастығы бактериялардың өскен колонияларын сипаттау; 4. Shigella туыстастығы бактериялардың боялған жағындыларының микроскопиясының нәтижелерін бағалауды жүргізу;
5. Shigella туыстастығы бактериялардың өскен колонияларын Рессель ортасына себу;
6. Рессель ортасының түсінің өзгеруінің нәтижелерін бағалау;
7. Поливалентті дизентериялық сарысуы (№1 қоспасы) және түрлік сарысуларымен (Флекснер, Ньюкестль, Зонне) заттық шыны үстінде агглютинация реакциясын қою.

Негізгі теориялық ақпараттар

Бактериялық дизентерия немесе шигеллез - бұл тоқ ішектің зақымдануымен, колиттің дамуымен және ағзаның интоксикациясымен жүретін жұқпалы ауру.

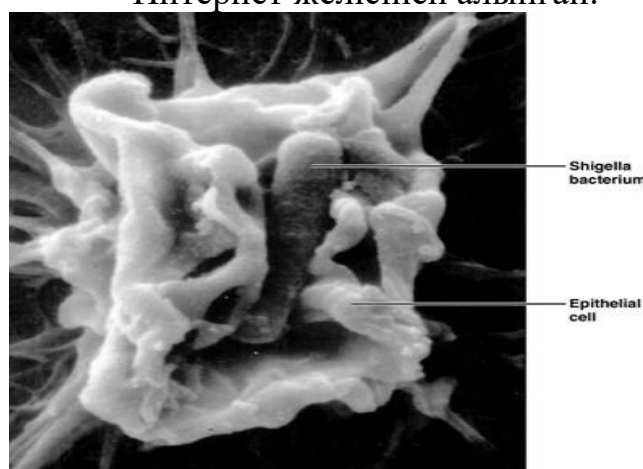
Қоздырғышы – *Shigella* туындысына жататын бактериялар:

- *Shigella dysenteriae* (А тобы);
- *Shigella flexneri* (В тобы);
- *Shigella boydii* (С тобы);
- *Shigella sonnei* (Д тобы).

Шигеллалар-ұсақ, қозғалмайтын, грам-теріс таяқшалар (110 сурет). Шигеллалардың барлық түрлері тоқ ішектің шырышты қабатын инвазияланып, кейінен жасуша аралық кеңістікке таралады (111 сурет). Бұл қабілеті трипсинге сезімтал инвазин - ақуыздардың синтезін және микроорганизмнің жасушааралық кеңістіктер арқылы таралу факторын анықтайтын ірі плазмидамен байланысты. Сонымен қатар, барлық шигеллалар эндотелийді зақымдайтын нәруыз шига токсиндер мен шига тәріздес цитотоксиндер өндіреді, нәтижесінде нәжісте қан пайда болады.



110 сурет – Шигеллалар, таза дақыл (Граммен)
Интернет желісінен алынған.



111 сурет - Тоқ ішектің шырышты қабатының қатпарларындағы шигелла.

Интернет желісінен алынған.

Шигеллезді зертханалық диагностикалау бактериологиялық әдіспен жүзеге асырылады.

Патогенездің ерекшеліктеріне сәйкес шигелла тоқ ішектің эпителий жасушаларында локализацияланады, сондықтан бактериологиялық зерттеудің негізгі материалы - нәжіс немесе мақта-дәке тампонымен немесе ректальді алынған тоқ ішек материалы болып табылады.

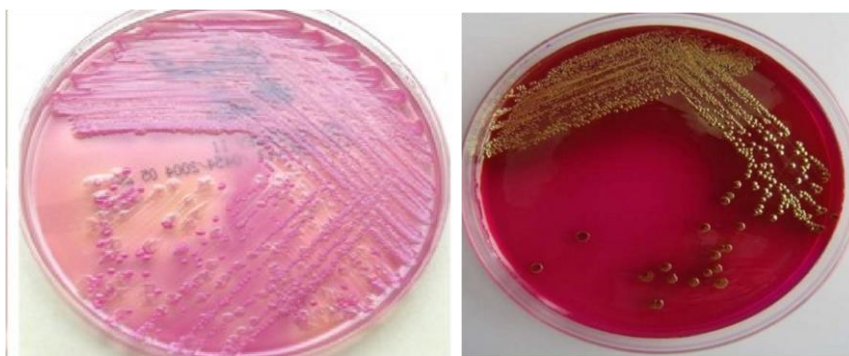
Шигеллаларды анықтау үшін нәжісті жинау кезінде мыналарды ескеру қажет:

- Шигеллалар негізінен шырыш пен ірінде болады, сондықтан шырыш пен ірінбар сынамалар алынады.
- Нәжістің алғашқы бөліктері-бұл микроорганизмдер өліп кетуі мүмкін ішектің төменгі бөлігіндегі тығын, сондықтан себу үшін тік және сигма тәрізді ішектің жоғарғы бөлігінен алынған нәжістің бөліктері таңдалады.
- Зерттеу үшін ішектің төменгі бөлігі болып табылатын нәжістің соңғы, сұйық бөліктерін алуға болмайды.
- Шигеллаларды анықтау үшін нәжісті тікелей себеміз, егер ол тікелей палатадағана орындалса жүзеге асырылуы мүмкін, әйтпесе ашыту процестері тұрып қалған нәжісте пайда болады да, бұл қышқыл реакцияны тудырады, ал онда шигеллалар өледі.

Тасымалдау ортасы қызметін байыту ортасы атқарады (20% өт және селенит сорпалары). Консервант-глицерин қоспасы (химиялық таза глицерин және натрий хлоридінің изотониялық ерітіндісі). Енгізілетін нәжістің көлемі тасымалдау ортасының көлемінің 1/5 аспауы тиіс. Зертханаға жеткізілгеннен кейін тасымалдау ортасында материал дифференциалды элективті тығыз ортаға себіледі. Консервантпен жеткізілген нәжіс 4°C температурада себілгенге дейін сақталады. Себу бір уақытта бірнеше ортаға - Плоскирев, Эндо, Левин жүзеге асырылады.

1904 жылы Эндо тифоидты таяқшаларды нәжістен анықтау үшін қоректік орта ойлап тапты, ол кең практикалық қолданысқа ие болды.

Эндо ортасының құрамына етті пептон, екі алмастырылған фосфорқышқылды натрий, фуксин, лактоза, натрий сульфиті және агар кіреді. Натрий сульфиті мен негізгі фуксиннің болуы грам оң микроорганизмдердің өсуін тежеу үшін қажет. Эндо ортасының саралау қасиеттері микроорганизмдердің лактозаны ыдырату қабілетіне негізделген. Лактозаны ыдыратпайтын микроорганизмдер, ортада түссіз мөлдір колонияларды құрайды. Лактоза оң микроорганизмдер ацетальдегид пайда болғанға дейін лактозаны ыдыратады, ол күкірт қышқылды натриймен әрекеттесіп, колонияларды қызыл түске бояйды. Натрий сульфиті мен негізгі фуксиннің болуына байланысты ортада грам-оң микрофлораның өсуі болмайды (112 сурет).

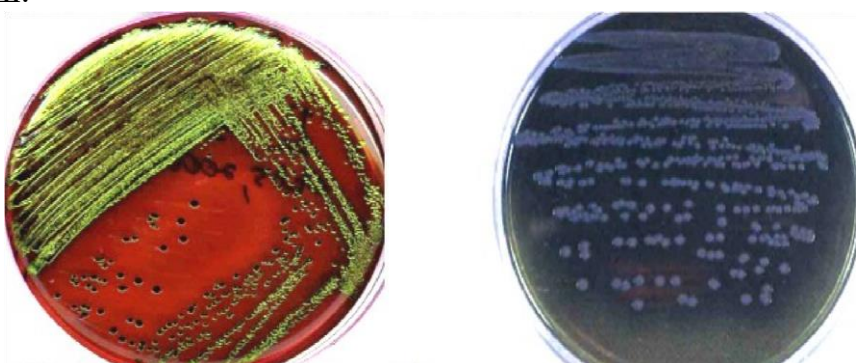


112 сурет – Оң жақта эшерихия колониялары (ал қызыл) металл жылтырымен, сол жақта шигелла колониялары (түссіз) Эндо ортасында. Интернет желісінен алынған.

Левиннің дифференциалды диагностикалық ортасы - эозин-метилен көгі бар қоректік орта. Бұл орта дизентерия, іш сүзегі, сальмонеллез және басқа ішек инфекцияларын зертханалық диагностикалауда қолданылады. Алғаш рет эозин мен метилен көк агарын 1916 жылы Холт-Харрисоми Тиг ұсынған (J. E. Holt-Harris, O. Teague), кейінірек, 1918 жылы орта құрамы Левинмен өзгертілген. Ол тек пептонды негіз ретінде пайдаланып, оған буферлік жүйе ретінде бір алмастырылған калий фосфатын қосып, бастапқы құрамды жеңілдетті, ол сахарозаны орта құрамынан шығарып, лактоза концентрациясын арттырды.

Дифференциялау қабілеті лактозаны бактериялар ыдырату кезінде түзілетін қышқылдың әсерінен рН өзгеруіне негізделген. Индикатор кешені рН 4,7-де тұнбаға түседі, қышқыл түзетін бактериялардың колонияларын қою көккүлгін, қара дерлік, көбінесе жасыл жылтырмен бояйды. Лактозаны ыдыратпайтын бактериялар түссіз немесе қызғылт түсті колониялар түзеді (113 сурет).

Левин ортасы (эозині және метилен көгі бар агар) келесі құрамнан тұрады: пептон немесе желатиннің панкреатиялық гидролизаты, лактоза, екі алмастырылған калий фосфаты, эозин, метиленді көк, агар. Дайын ортаның түсі қызыл-кірпіш.



b-S. flexneri

113 сурет - Левин ортасында микроорганизмдердің өсімі. Сол жақта E. coli, жасыл жылтырлығы бар қою күлгін колониялар. Оң жақта-S. flexneri, түссіз колониялар. Интернет желісінен алынған.

Плоскирев ортасы 1-ші кезеңде энтеробактериялардың таза дақылын бөліп алу үшін қолданылады; лактозаны ыдырату негізінде бактерияларды дифференциялауға мүмкіндік береді. Орта құрамында ингибиторлардың (өт

қышқылдарының тұздары, йод, индикаторлар) болуына байланысты орта грам оң микрофлораның өсуін тежеуі тиіс. Лактоза теріс бактериялар (шигелла, сальмонелла) осы ортада түссіз колониялар түрінде өседі. Лактоза оң бактериялар (эшерихия) таңқурай түсті колонияларды түзеді (114 сурет).

Ортаның саралау қасиеттері таңқурай түсті бейтарап қызыл колония индикаторының арқасында, Плоскирев агарында түзетін лактоза ыдырататын бактерияларының өсуімен, рН-ның қышқыл жағына өзгеруіне негізделген.

Плоскирев агары келесі құрамнан тұрады: құрғақ тиосульфатпен балық ұнының панкреатиялық гидролизаты, тиосульфат және натрий цитраты, лактоза, наубайханалық ашытқы сығындысы, ірі қара малдың тазартылған өті, екі алмастырылған фосфорқышылды натрий, натрий хлориді, бейтарап қызыл, бриллиант жасыл, кристалды йод, агар.

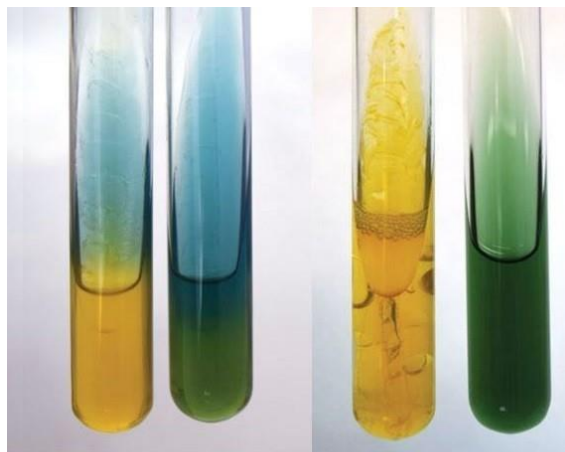


114 сурет - Плоскирев ортасының сол жақ жартысында лактозаға теріс бактериялар (шигеллалар мен сальмонеллалар) бар, олардың колониялары түссіз. Оң жақта лактоза оң бактериялардың колониялары (эшерихия) – таңқурай түсті. Интернет желісінен алынған.

Рессель ортасы ішек тобының грам теріс бактерияларын, әсіресе эшерихий, сальмонелла және шигеллаларды глюкоза мен лактозаны ыдырату қабілетіне қарай саралау үшін қолданылады. Инкубация кезінде қышқылдың түзілуі қиғаш бөліктегі фенолдық қызыл түстің (аэробты ыдырату) және орта бағанындағы (анаэробты ыдырату) индикатор түсінің өзгеруімен анықталады. Ыдырату кезінде газдың пайда болуы бағандағы көпіршіктер мен орта үзілістерінен байқалады. Талдау нәтижелері бойынша бактериялар үш топқа бөлінеді: лактоза ферменттеуші, глюкоза ферменттеуші және көмірсуларды ферменттей алмайтын бактериялар. Рессел ортасына себінді жасағаннан кейін нәтижелері термостатта 19-20 сағат инкубацияланғаннан кейін талданады, өйткені олар орта компоненттерінің кезең-кезеңмен ферменттеуіне байланысты қате болуы мүмкін. Міндетті түрде бір бақылау пробирканы қалдырады (бастапқы түсі-жасыл).

Лактозаны ашытатын микроорганизмдердің өсуімен ортаның рН қышқыл жағына ауысады және агардың қиғаш бөлігінің сарғаюы, глюкоза – орта

бағанының сарғаюы байқалады. Лактоза мен глюкозаны ферменттей алмайтын микроорганизмдердің өсуі сілтіленумен қатар жүреді, орта индикаторы көк түске айналады немесе бастапқы жасыл түс сақталады. *S. flexneri* – бағанның сарғаюы және қиғаш бөліктің көк түске боялуы. *S. paratyphi* – бағанның газ түзе сарғаюы және қиғаш бөліктің көк түске боялуы. *E. coli* – бүкіл ортаның газ түзілумен сарғаюы. *Alcaligenes faecalis* – бүкіл ортаның немесе тек қиғаш бөліктің көк түске боялуы (115 сурет).



Shigella flexneri *Alcaligenes faecalis* *Escherichia coli* Контроль

115 сурет - Энтеробактериялардың Рессель ортасындағы өсімі. Интернет желісінен алынған.

Шигеллалардың бөлінген дақылдарын идентификациялау үшін 3-кезенде поливалентті сарысуымен заттық шыны үстінде агглютинация реакциясын (АР) жүргізеді (егер реакция оң болса, одан әрі түрлік сарысуларымен). Диагностикалық лиофилизацияланған иммундық сарысулар формалин немесе мертиолятпен инактивтендірілген, шигелла антигендерімен гипериммундалған, қояндардың немесе қошқарлардың қанынан алынады. Антиденелер бар адсорбцияланған сарысулар, гомологиялық антигендері бар шигелла дақылдық қоспасын агглютинациялауға тиісті және гетерологиялық антигендері бар шигелла дақылдарын агглютинацияламау керек.

Жұмыстың орындалу барысы

Бактериологиялық зерттеу мынадай негізгі кезендерді қамтиды: бастапқы материалды дифференциалды-диагностикалық және элективті ортаға себу, күдікті колонияларды іріктеу, таза дақылдардың жинақталуы және оларды идентификациялау.

1 кезең. Науқастың нәжісін Плоскирев, Эндо, Левин ортасына себеді.

2 кезең. Алғашқы себуден кейін дақылдарды 18-20 сағаттан кейін қарайды. Плоскирев, Левин және Эндо орталарында шигеллалар түссіз, мөлдір немесе жартылай мөлдір, дөңгелек, дөңес, тегіс шеті бар (S-пішінді) диаметрі 14 мм колонияларды құрайды.

Схема бойынша түссіз колонияларды сипаттау. Жағынды жасау, Грам бойынша бояу, микроскопиялау. Мұндай колониялардан алынған материалды

бактериоскопиялағанда, жаңа клиникалық материалдарда кейде коккобациллаларға ұқсайтын грам-теріс қысқа таяқшалардың болуы анықталады. Шигеллаларға тиісті күдікті колонияларды Рессель ортасы бар пробиркаға қайта себіледі.

3. Кезең. Алдыңғы күнгі дақылдардың нәтижелерін талдау. Шигелла қатарына жататын микроорганизмдер глюкозаны қышқылға дейін ыдыратуға бейім (*S. flexneri*, 6 Ньюкастл сероварынан басқа, қышқылдан басқа газ да түзеді). Лактозаның ферменттеу 2-3 күнде *S. sonnei* штамдарында байқалады.

ФЗН (Флекснер, Зонне, Ньюкастл) поливалентті сарысуымен заттық шыны үстінде агглютинация реакциясын жүргізеді, оң нәтиже болған жағдайда түрін анықтау үшін осы қоспаның әр сарысуымен бөлек АР қойылады.

Соңғы қорытынды ферментативті қасиеттерді және агглютинация реакциясын зерттеу нәтижелері бойынша 3-ші күнде беріледі, зерттеу нәтижелері бланкісіне жазылады.

Хаттама №3

Дизентерия кезінде бактериологиялық зерттеу

Күні	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Нәжіс	1. Бактериологиялық зертханаға жолдама жазу. 2. Петри табақшасындағы Плоскирев, Эндо, Левинортасына ілмекпен себу.	
2.	Плоскирев ортасында ағы колониялардың өсімі	1. Түссіз колонияларды зерттеу және сипаттау. 2. Колониялардың бір бөлігінен жағынды, Грам бойынша бояу. 3.Рессель ортасына түссіз колонияны себу.	
3.	Рессель ортасындағы өсім	1.Ортаның түсінің өзгеруін тіркеу. 2.Жағынды, Грам бойынша бояу. 3.Поливалентті дизентериялық сарысуы (№1 қоспа) және түрлік сарысулармен (Флекснер, Ньюкестль, Зонне) шыны үстінде агглютинация реакциясын кою 4.Қорытынды.	
		5.Бланкіге жауапты жазу.	

Материалдар мен жабдықтар: вакутейнердегі нәжіс, спирттік шам, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза заттық шынылар, препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа, сүзгіш қағаз, әйнек сызуға арналған ққарындаш, дезинфекциялаушы ерітінді, Плоскирев ортасы бар Петри табақшалары, Рессель ортасы бар пробиркалар, термостат, иммерсиялық

объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, Грам бойынша бояғыштар жиынтығы, поливалентті дизентериялық сарысу, түрлік сарысулар (Флекснер, Ньюкестль, Зонне).

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012, 177-180б.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015, 207-211б.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина", -1984, 179-181б.

3.4. Зертханалық жұмыс №4

Тақырып: Іш сүзегінің серологиялық диагностикасы. Видадь реакциясы.

Мақсаты: Іш сүзегінің серологиялық диагностикалау тәсілдерін игеру.

Студент білуі тиіс:

1. Іш сүзегінің микробиологиялық диагностикалау әдістерін. **Студент өз қолымен жасай алуы тиіс:**

1. Зертханаға жолдама жазуды және зертханада Видадь реакциясын қоюды. 2.

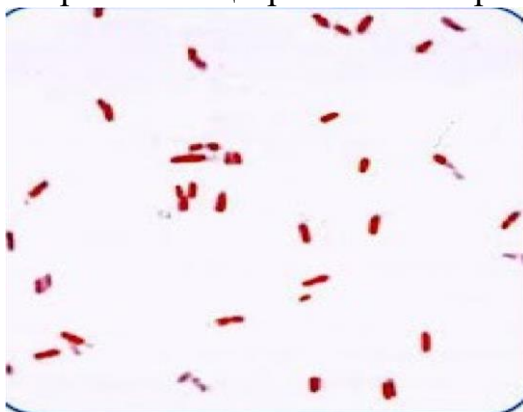
Серологиялық диагностиканың (Видал реакциясы) бағытын жазып, нәтижесін ресімдеу

Тақырып бойынша негізгі теориялық ақпарат

Іш сүзегі мен А және В парасүзек - жедел ішек инфекциялары, аурулардың патогенезімен клиникалық көріністері бір-біріне ұқсас, циклдік ағымды, ащы ішектің лимфа аппаратының, мезентериальды лимфа түйіндерінің, паренхиматозды органдардың зақымдануымен сипатталатын аурулар. Клиникалық түрде айқын интоксикациямен, энтериттің дамуымен және бөртпемен жүреді.

Іш сүзегі мен парасүзектердің қоздырғыштары *Salmonella туыстастығына*, *Enterobacteriaceae* тұқымдасына, *S. Enterica* түріне, *S. Typhi* сероварына (116-сурет), *S. Paratyphi A* және *S. Paratyphi B*. жатады Сальмонеллалар – қысқа, грамтеріс, ұзындығы 1,5-4 мкм, шеттері доғалданған таяқшалар. Негізінен қозғалғыш (перитрихтар), спора және капсула түзбейді (117 сурет). Түр ішілік дифференциалдау антигендік құрылысына қарай жүргізіледі. Сальмонеллалардың соматикалық О-антигені, талшықтық Н-антигені, кейбіреуі - беткейлі К-антигені болады. Уайт пен Кауфманның серологиялық жіктелісі бойынша сальмонеллалар О -антиген құрылымының жалпылығына қарай

серологиялық топтарға (серогруппаларға) бөлінеді; серогруппа ішінде - H-антиген құрылымындағы айырмашылықтарға сәйкес сероварларға бөлінеді.



116 сурет - S. Typhi, таза дақыл Грам бойынша боялған. Интернет желісінен алынған.



117 сурет - Сальмонеллалардың электронды микроскоппен қарағандағы қылшалары мен талшықтары. Интернет желісінен алынған.



118 сурет - Сальмонеллалардың микрокапсуласын компьютерлік бейнесі. Интернет желісінен алынған.

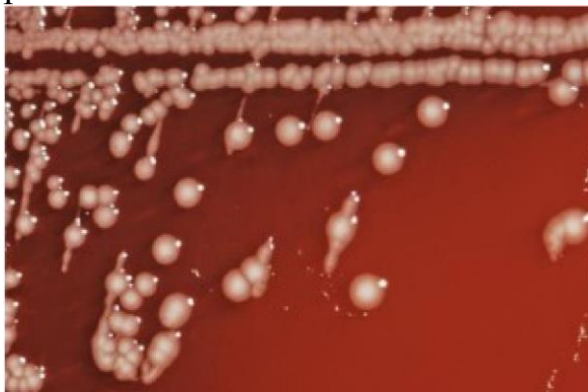
Іш сүзегі мен парасүзектерді бактериологиялық зерттеу.

Іш сүзегі мен паратифтерде инфекциялық процестің дамуын ескере отырып қоздырғыш бөледі:

- 1 - ші аптада және бүкіл қызба кезеңде-қаннан (гемокультура);
- 2-3-ші аптаның соңынан бастап-ішек қозғалыстарынан (копрокультура);
- 2-ші аптаның соңынан бастап-зәрден (уринокультура);
- өттен (биликультура)-аурудың 2-ші аптасынан бастап, аурудың барлық кезеңінде және бактерия тасымалдаушыларда.

Сальмонеллалар Эндо (119 сурет) және Плоскирев (120 сурет) ортасында ішек таяқшаларынан ерекшелігі түссіз колониялар түзеді, ал висмут-сульфит агарда колониялар қара түсті, себебі сальмонеллалар, эшерихиядан айырмашылығы, ортаның құрамына кіретін темір сульфатынан күкіртсутек түзеді. Күкіртсутек индикатордың қараюына әкеледі-түссіз висмут сульфиті, оның қара висмут сульфидіне өтуіне байланысты. Сондықтан күкіртсутек түзетін бактериялар қара, кейде колонияның қою жасыл реңмен түзіледі, ал олардың астындағы орта да қара түске боялады (121-сурет). Күкіртсутек түзбейтін бактериялар түссіз, жасыл түсті колониялар түрінде өседі.

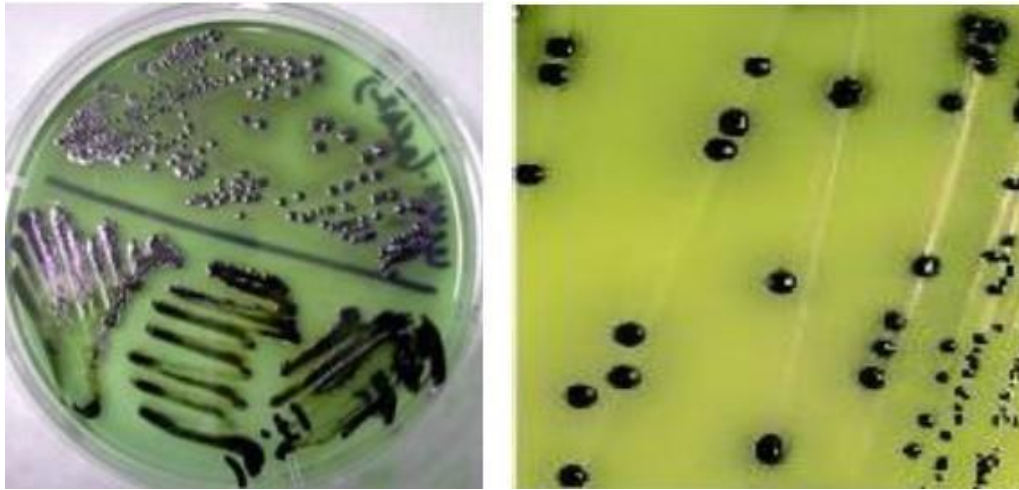
Қан себуге және гемокультураны бөлуге арналған селективті орта - өт сорпасы. Қан мен қоректік ортаның арақатынасы - 1: 10. Қанды себу үшін қалтыраудың басында дене температурасы көтерілуінің басында шынтақ тамырынан 5-10 мл көлемінде алып, науқастың төсегінің қасында дереу 50-100 мл өт сорпасына себу керек.



119 сурет - Эндо ортасындағы сальмонеллалардың колониясы. Интернет желісінен алынған.



121 сурет - Плоскирев ортасындағы сальмонеллалардың өсуі. Интернет желісінен алынған.



122 сурет - Висмут-сульфит агардағы сальмонелла колониялары.
Интернет желісінен алынған.

Іш сүзегі мен парасүзектердің қоздырғыштарында О және Н антигендері бар. *S. Typhi*, олардан басқа, вируленттіліктің беткейлік антигеніне ие (Vi антиген); ол жаңа бөлінген дақылдарда кездеседі, бірақ әртүрлі факторлардың әсерінен оңай жоғалады, дақылдарды ұзақ уақыт сақтау кезінде және 100°C температурада 10 минут ішінде жойылады.

Серологиялық әдіс.

Сальмонеллез және іш сүзегі-парасүзек инфекциялардың серодиагностикасының классикалық әдісі-кеңейтілген агглютинация реакциясы (Видал реакциясы).

1896 жылы француз дәрігері Ф. Видаль ұсынған (F. Widal, 1862—1929). Тәсіл, науқас адамның организмінде түзілген қарсы анти денелердің (агглютининдердің) жазылғаннан кейінде ұзақ сақталып іш сүзектік микроорганизмдерін бір-біріне желімделуіне негізделген. Алғашында Оантигенге қарсы антидене түзіледі, бірақ титрі ауру айыққаннан кейін күрт төмендейді. Н- және Vi - антидене соңынан пайда болады, бірақ ұзақ жылдар бойы жоғары деңгейде сақталады. Бактерия тасымалдаушылармен вакцина алғандардада солай, бұл антиденелер жоғары деңгейде ұзақ сақталады.

Видаль реакциясы аурудың 7-9 күндерінен бастап бір уақытта 3 дақылмен қатар қойылады: іш сүзегі, А және В парасүзек. Әдетте өлтірілген диагностикумдар қолданылады (10-кесте). Реакция АД титрінің жоғарылауын анықтау үшін аурудың 3-4-ші аптасында қайталанады (1 : 200-ден 1 : 400 -1 : 1600-ге дейін).

10-кесте - Видал реакциясында жұптасқан сарысуларды зерттеу кезінде іш сүзегі сальмонеллаларының антигендеріне антиденелер титрінің өсуі

Сальмонеллалар диагностикумы	Алғашқы зерттеу	Қайталап зерттеу
	Сарысуды сұйылту	

	1:10 0	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
Іш сүзегі О	+	+			+	+	+	+
Іш сүзегі Н	+				+	+		
Парасүзек А О	+				+			
Парасүзек А Н	+				+			
Парасүзек В О	+				+			
Парасүзек В Н	+				+			

Видадь реакциясының нәтижелерін бағалауға қатысты мынаны атап өткен жөн: кейде бактериялардың бірнеше түрімен — топтық агглютинациямен бірдей титрге дейін оң реакция алынады. Мұндай жағдайларда сарысуды одан әрі сұйылтумен реакция жасау керек.

Видалдың реакциясы іш сүзегіне қарсы екпе алған ("егу" реакциясы) немесе іш сүзегі мен парасүзекпен ауырған ("анамнестикалық" реакция) адамдарда оң болуы мүмкін. Бұл жағдайда Видал реакциясын 7-10 күннен кейін қайта қою керек. Ауырып кеткен және вакцинацияланғандарда АД титрінің өсуі болмайды. АД титрінің жоғарылауы тек ағымдағы ауру кезінде байқалады ("инфекциялық" реакция).

Жұмысты орындау барысы

Зерттеу материалы: қан сарысуы.

Зерттеу әдісі: серологиялық (Видадь агглютинация реакциясы)

Дайындық: Зерттеуге қан 4 сағат бойына ашыққан адамның венасынан 5 мл мөлшерінде консервантсыз пробиркаға алынады. Қан тапсырар алдында және сол күні қарқынды физикалық жүктеме, ішімдік пен шылым шегуге болмайды. Су ішуге рұқсат етілген. Алынған қан сарысуын +2- +8°C температурада 7 тәуліктен немесе -20°C-та 3 айдан артық сақтауға болмайды.

Жұмыс сипаты: Іш сүзегі мен парасүзек қоздырғышына антиденелер деңгейін сандық анықтау.

Видадь реакциясын қою үшін үш компонент қажет:

- 1) анти дене (науқастың қан сарысуы);
- 2) антиген (сальмонеллезді монодиагностикум О₉, О₂, О₄ және Нd); 3) 0,85% натрий хлорид ертіндісі.

Қан сарысуынан 1:100 -ден 1:600 дейін 4 қатар тәртіппен келесі сұйылту дайындайды: барлық пробиркілерге 1 мл физиологиялық ертінді құяды; содан соң сол пипеткамен 1:50 есе сұйылтылған 1 мл сарысуды 1-ші пробиркаға құйып физиологиялық ертіндімен араластырады, сөйтіп 1:100 есе сұйылтылған қоспа алады. Сосын 1 мл қоспаны келесі пробиркаға құйып физертіндімен араластырады, сөйтіп 1:200 есе сұйылтылған қоспа алады, осылай 1:400, 1:800 сұйылтуларды төрт қатар бойынша да жасап шығады.

Видадь реакциясы 1 мл сұйықтық мөлшерімен жүргізіледі, сондықтан соңғы пробиркадан ығысқан 1 мл сұйықтықты алып тастайды. Бөлек бақылау пробиркасына 1 мл физиологиялық ертіндіні сарысусыз тек өзін құяды. Бұл бақылау антигеннің (диагностикумның) спонтанды агглютинация беру мүмкіндігін анықтау үшін қойылады. Әр қатардағы барлық пробиркаларға 2

тамшыдан диагностикум тамызып шығады. Реакцияда сальмонеллезді О-және Н-монодиагностикумдар қолданылады. Н-антигенді жою үшін сальмонеллалар қайнату арқылы өлтіріліп, О-монодиагностикум алынады, ал О-антигенді жою үшін сальмонеллалар формалинмен өңделеді және Н-монодиагностикум алынады.

Пробиркалар салынған штативті қаттырақ шайқағаннан кейін 2 сағатқа термостатқа қойып сосын алғашқы нәтижесін бағалайды. Ақырғы нәтижені пробиркаларды бөлме температурасында 18 -20 сағат ұстағаннан кейін бағалайды. Реакция оң болған жағдайда пробирканың түбінде ақ түсті тұнба түзіледі, тұнба үстіндегі сұйықтық мөлдір болады. О-агглютинация ұсақ түйіршікті, ал , Н-агглютинация – ірі, кесек түйіршікті. Реакция теріс болса сұйықтық лай болып қалады, пробирка түбінде тұнба болмайды. Бақылау пробиркасында тұнба түзілмесе агглютинация спецификалық деп саналады. Видал реакциясының титрі - бұл зерттелетін сарысудың ең үлкен сұйылтуы, онда агглютинация әлі де байқалады.

Іш сүзегінің типтік клиникалық көрінісінің сұйылтуы 1:100 және одан жоғары диагностикалық титр болып саналады да, атипті немесе клиникалық көрінісі айқын болмаған жағдайда диагностикалық титр сұйылтуы 1:200 және одан кем болмайды. Науқас сарысуларында спецификалық антиденелермен қатар топтық антиденелер болуыда мүмкін. Әдетте арнамалы агглютинация реакциясы жоғары титрлардан басталады.

Видаль реакциясын қою сызбасы.

Ингредиенттері	Сарысуды сұйылту					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	БД
Стерилді 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 физиологиялық ертінді (мл)						
Науқастың сарысуы	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
1:50, (мл)	→	→	→	→		
Диагностикум (тамшы)	2	2	2	2	2	2

↓1,0

Хаттама №4

Іш сүзегінің серологиялық диагностикасы.

Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
-------------------	----------------	--------

1. Науқастың қан сарысуы	1. Серологиялық зерттеуге жолдама беру 2. Демонстрациялық O ₉ , O ₂ , O ₄ , және H _d диагностикумдарымен толық агглютинация реакциясының нәтижесін бағалау . 3. Суреттеу 4. Серологиялық диагноздың негіздемесімен қорытынды жасау. 5. Зерттеу нәтижесін бланкіге жазу.	
--------------------------	--	--

Материалдармен мен құралдар: науқастың сарысуы, стерилді физиологиялық ертінді, O₉, O₂, O₄, H_d, монодиагностикумдары, пробиркалар, штатив, пипетка - 1 мл.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 181-191.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 203-207.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 195198.

2.5. Зертханалық жұмыс №5

Тақырыбы: Тырысқақ ауруына күдікті науқасты бактериологиялық зерттеу.

Мақсаты: тырысқақтың микробиологиялық диагностикалау әдістерін меңгеру.

Студент білуі тиіс:

1. Тырысқақ ауруының микробиологиялық диагностика әдістерін.

Студент жасай алуы:

1. Науқастың құсығын 1% пептонды суға себу;
2. 1% пептонды судағы бактериялардың өсуін сипаттау;
3. *Vibrio cholerae* бактерияларының боялған жағындыларын микроскопиялау және нәтижелерін бағалау;
4. Сұйық қоректік ортадан сілтілі агарға көшіріп себу;
5. Сілтілі агарда өскен колонияларды сипаттау;
6. «Езілген тамшы» әдісімен бактериялардың қозғалғыштығын анықтау; 7. Тырысқақ O-1, O-139, ОН-сарысуларымен әйнекте шартты агглютинация реакциясы.

8. Бактериологиялық зерттеудің жолдамасы мен нәтижесін жазу.

Негізгі теориялық ақпарат

Тырысқақ - бұл су-электролит алмасуының бұзылуымен гастроэнтерит типі бойынша жүретін, ағзаның күрт дегидратациясына әкелетін аса қауіпті антропонозды жұқпалы ауру. Тырысқақ карантиндік инфекцияларға жатады. Тырысқақ инфекциясына фекальды-оральді механизм, аш ішектің зақымдалуы, кең эпидемиялық таралуға бейімділігі тән. Сулы диареямен және құсумен ауыр ағымымен, дегидратацияның әртүрлі дәрежесінің дамуымен, жоғары өліммен сипатталады.

Тырысқақ қоздырғышы *Vibrio cholerae* Vibrionaceae тұқымдасына, *Vibrio* туысына жатады. *Vibrio* туысының 55 түрі бар, олардың ішінде адамдар үшін ең маңыздысы *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* және *V. fluvialis*. Вибриондардың бұл түрлері адамның клиникалық белгілері бойынша әртүрлі ауруларды тудырады (тырысқақ, гастроэнтерит, отит, жара инфекциясы, менингит).

Тырысқақ қоздырғышы - *Vibrio cholerae* - грамм теріс, ұсақ иілген таяқша Ол споралар мен капсулаларды түзбейді, оған қозғалғыштық беретін бір ғана талшығы (монотрих) бар (121 сурет).



121 сурет - Тырысқақ вибрионы. Интернет желісінен алынған.

Факультативті анаэроб, негізінен аэробты жағдайында дақылдануға қабілетті, құнары төмен қоректік заттар (мысалы, 1% пептонды су), сілтілі (рН 8-9) орталарда өседі. Құрамында 0,5-1,0% натрий хлориді бар сілтілі пептон суында (рН 8,6-9,0) тырысқақ вибрионы 6-8 сағаттан кейін ортаның бетінде аздап бұлыңғырлық пен нәзік көкшіл пленканың пайда болуына әкеледі, пленканың шеттері пробирка қабырғалары бойымен көтеріледі, шайқау кезінде пленка оңай бұзылып, пробирканың түбіне түседі.

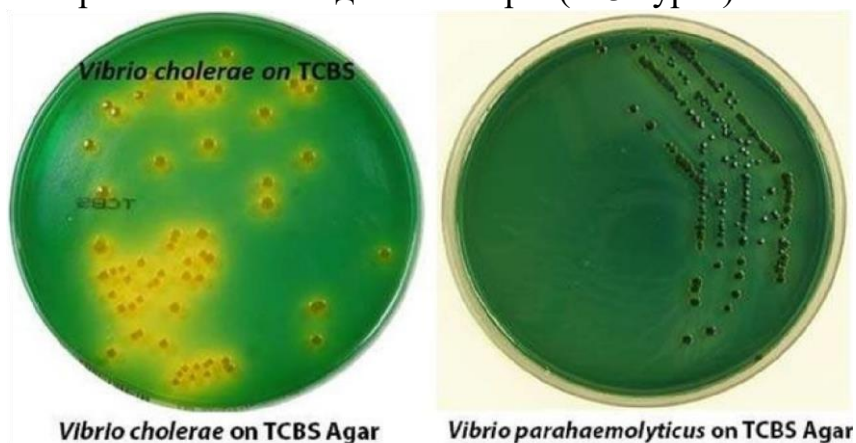


а б

а – бақылау, б – тәжірибе

122 сурет - Сілтілі пептонды суда тырысқақ вибрионының өсуі. Интернет желісінен алынған.

Сұйық ортада 6 сағаттан кейін қабықшаның пайда болуы байқалады. Тығыз TCBS ортасында (тиосульфат, цитрат, өт және сахароза) 18-24 сағаттан кейін сары түсті колониялар түзіледі. Себебі тырысқақ вибрионы сахарозаны ферменттейді. Ферменттік белсенділігі жоғары (123 сурет).



Vibrio cholerae on TCBS Agar

Vibrio parahaemolyticus on TCBS Agar

123 сурет – TCBS агарындағы колониялар. Сол жақта - тырысқақ вибрионының сары колониялары, оң жақта - сахарозаны ферменттемейтін парагемолитикалық вибрионның колониялары. Интернет желісінен алынған.

Сілтілі агарда 10-12 сағаттан кейін ол әлсіз опалесценциямен дөңгелек, мөлдір, көкшіл колониялар түзеді (124 сурет).



124 сурет – *Vibrio cholerae* сілтілі агарда өскен колониялары. Интернет желісінен алынған.

Тырысқақ вибрионының антигендік құрылымы күрделі. Н-антиген барлық *Vibrio* туыстарына ортақ, О-антигенге сәйкес микроорганизмдер серотоптарға бөлінеді. Тырысқақ қоздырғыштары О1 және О139 топтарының өкілдері болып табылады.

Биологиялық қасиеттері бойынша *Vibrio cholerae* екі биоварға бөлінеді – *El-Tor* және *classic*. О1 серотобы екі нұсқаны қамтиды - Эль-Тор және классикалық, О139 серотобы *Bengal* нұсқасына жатады, ол фенотипі бойынша *El-Tor*–ға ұқсас, антигендік құрылымы өзгерген *El-Tor* нұсқасының генетикалық туысқаны. О1 серотобы А-, В- және С - суббірліктерінің комбинациясына байланысты үш серовар ажыратылады: Огава (АВ), Инаба (АС) және Гикошима (АВС).

Тырысқақ вибрионының патогендік факторлары тырысқақ энтеротоксині, нейраминидаза және гемагглютинин протеазасы. Тырысқақ энтеротоксині сүтүз алмасуын бұзады, бұл ретте су мен хлоридтердің ішек қуысына гиперсекрециясы жүреді, бұл диарея мен құсу салдарынан организмнің сусыздануын тудырады.

Жұмысты орындау барысы

1-кезең. Зерттеуге арналған материалдар – нәжіс, құсық, тағам, су.

Зерттеуге арналған материал арнайы сақтық шараларымен жинақталып, зертханаға жеткізіледі. Ыдыс-аяқтарда дезинфекциялау құралдарының іздері болмауы керек, өйткені тырысқақ вибриондары оларға өте сезімтал. Банкілер, пробиркалар шыны немесе резеңке тығындармен жабылуы тиіс. Сонымен қатар, материалды алу үшін стерильді вакутейнерлерді қолданады. Материалды алғаннан кейін тығын парафинмен немесе герметикалық балауызбен толтырылады, қосарланған балауыз қағазбен байланады да науқастың аты-жөні, материалдың сипаты мен алынған уақыты, болжамды диагнозы және жолдама берген дәрігердің аты-жөні көрсетілген этикетка жабыстырылады. Материал аса қауіпті инфекциялар зертханасына арнайы көлікпен жіберіледі.

Материалды алғаннан бастап себуге дейінгі уақыт 3 сағаттан аспауы керек. Материалды бірден жинақтау ортасы болып табылатын 1% пептонды суда қабылдаған дұрыс.

Зерттеудің бірінші күнінде материалды 50 мл 1% пептонды суы бар колбаға қосады.

2-кезең. Сұйық ортадағы өсуді зерттеу. Сілтілі пептонды суда тырысқақ вибрионы 6-8 сағаттан кейін аздап лайланады және ортаның бетінде нәзік көкшіл қабықша түзеледі. Қабықшадан жағындылар дайындалып, Грам бойынша боялады, вибриондардың барына көз жеткізеді. Содан кейін сілтілі агарға қайта себу қажет.

3-кезең. Зерттеулерде сілтілі агарда мөлдір көкшіл колониялар пайда болуын белгілейді. Схема бойынша колонияларға сипаттама жүргізу қажет. Жағынды жасап, Грам бойынша бояңыз, «өзілген тамшы» әдісімен қозғалғыштығын анықтайды. Тырысқақ вибрионына күдікті колонияларынан тырысқақ O1, O139-және ОН-сарысуларымен әйнекке болжамалы агглютинация реакциясын қояды.

О-сарысуымен агглютинацияланатын грамтеріс вибриондардың болуы аурудың қоздырғышы бар екенің дәлелдейді.

Хаттамада қорытындыны және аса қауіпті инфекциялар баклабораториясынан жауапты ресімдеу (30-нысан бойынша).

Хаттама №5 Тырысқаққа бактериологиялық зерттеу

Кезең	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
-------	-----------------------------	----------------	--------

1	Құсық	1. Зерттеуге жолдама беру. 2. 1% пептонды суға және сілтілі агарға егу.	
2	1% пептонды суда өсіру.	1. Сұйық ортадағы өсуді зерттеу, сипаттау. Қатты ортаға қайта егу (сілтілі агар) 2. Жағындыны жасау, Грам әдісімен бояу, бактериоскопия.	
3	Сілтілі агарда өсіру	1. Колонияларға сипаттама беру. 2. Жағындыны жасау, Грам әдісімен бояу, бактериоскопия. 3. Қозғалдыштығын «езілген тамшы» әдісімен анықтау. 4. Тырысқақ О1, О139, ОН сарысуларымен әйнекке болжамалы агглютинация реакциясын өткізу. 5. Суреттеу. 6. Қорытындыны хаттамаға ресімдеу және бактериологиялық зертханадан жауап беру.	

Материалдар мен құрал-жабдықтар: вакутайнердегі құсық, спирт шамы, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза әйнектер, бояу препараттарына арналған шыны «көпірі» бар науа, сүзгі қағазы, шыны қарындаш (шыны график), дезинфекциялық ерітінді, сілтілі агары бар Петри табақшалары, 1% пептонды суы бар пробирка, термостат, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, Грам бояуына арналған жинақтар, жабын әйнектері, ойығы бар заттық шыны.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 194-199.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 212-215.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 188-192.

1.5. Зертханалық жұмыс № 6

Тақырыбы: **Көк жөтел кезінде серологиялық диагностика үшін агглютинация реакциясы**

Мақсаты: көк жөтел диагностикасының серологиялық әдістерін игеру

Студент білуі керек:

1.Көкжөтел диагностикасының микробиологиялық әдістері. **Студент жасай білуі тиіс:**

1.Серологиялық зерттеудің жолдамасын жазу, нәтижесін жасау.

2.Көкжөтелді диагностикалау үшін агглютинация реакциясының нәтижесін түсіндіру.

Негізгі теориялық ақпараттар

Көкжөтел (лат. Pertussis - конвульсиялық жөтел, франц. coqueluche-әтеш айқайы) - көмейдің, кеңірдектің және бронхтың қабынуымен және спазматикалық жөтел ұстамаларының дамуымен қатар жүретін тыныс алу жолдарының жіті инфекциялық ауруы.

Көкжөтелдің қоздырғышы 1900 жылы науқастардың қақырығынан дайындалған жағындыларда табылған, 1906 жылы бельгиялық бактериологтар Ж.Борде (125 сурет) пен О.Жангу (126 сурет) таза дақылдан бөліп алған.



125 сурет - Жюль Борде (Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet, 1870-1961 жж.). Интернет желісінен алынған.

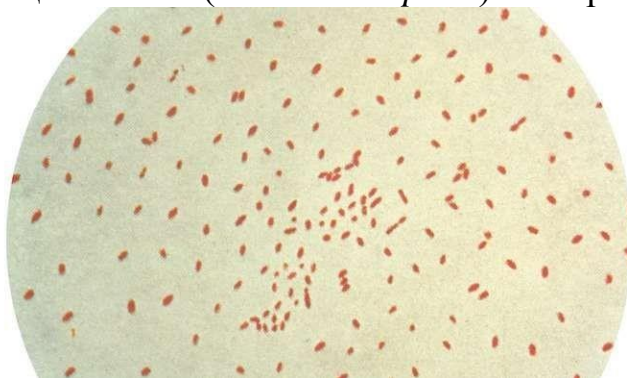
Паракөкжөтел ауруының қоздырғышын 1937 жылы Г.Элдеринг пен П.Кендрик бөліп алып, зерттеген.

Көкжөтелді үш қоздырғыш тудыруы мүмкін- *B. pertussis*, *B. parapertussis* және жекелеген жағдайларда *B. bronchiseptica*. Микроорганизмдер *Bordetella* туыстастығына, *Halobacterium* тұқымдастығына жатады. Олардың барлығы грам-теріс ұсақ овоидты таяқшалар (коккобактериялар), дара немесе топ болып орналасады, нәзік қапсуласы, түкшелері бар.



126 сурет - Октав Жангу (Octave Gengou, 1875-1957 жж.).
Интернет желісінен алынған.

Бордетеллалар – қозғалмайтын (*B. Pertussis* (127 сурет) және *B. parapertussis*) немесе қозғалғыш (*B. bronchiseptica*) бактериялар.

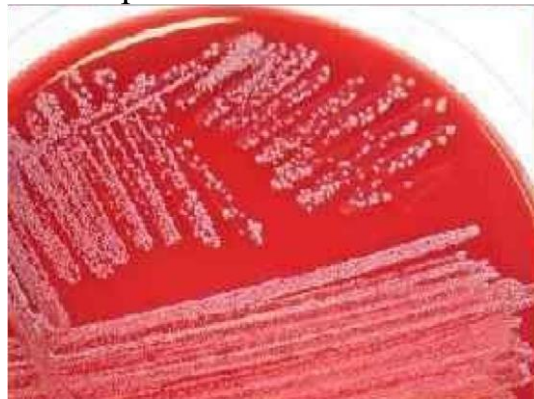


127 сурет - *Bordetella pertussis*, таза дақыл (Грамм). Интернет
желісінен алынған.

Бордетелла қарапайым қоректік орталарда өсірілмейді. Өсу үшін оларға үш амин қышқылы қажет - пролин, цистеин, глутамин қышқылы. Бордетелла қан қосылған картоп-глицеринді агарда Борде-Жангу ортасы (128 сурет), қанды агарда (129 сурет) және жартылай синтетикалық казеинді көмірлі агарда өседі (130 сурет).



128 сурет - Борде-Жангу ортасында бордетеллалардың өсуі. Интернет желісінен алынған.



129 сурет - Қан агарында *B. pertussis* өсуі. Интернет желісінен алынған.



130 сурет - Казеин көмір агарындағы бордетеллалардың өсуі (ККА) Интернет желісінен алынған.

Көкжөтел бактерияларының колониялары ұсақ, дөңгелек, шеттері тегіс, жылтыр, сынап немесе інжу тамшыларына ұқсайды, 3-4-ші күнінде өседі. Жаңадан бөлінген дақылдар S-формалы колониялар (1-ші фаза), одан әрі дақылдандыру кезінде олар R-формаларын (2-ші фаза) түзе алады.

Паракөкжөтел бактерияларының колониялары үлкенірек және 1-2-ші күні анықталады. Оңтайлы өсу температурасы 35-36° С. Қан орталарында олар гемолиз аймағын құрайды.

Көкжөтел мен паракөкжөтел зертханалық диагностикада екі әдіспен жүзеге асырылады:

- ☐ *бактериологиялық*, онда қоздырғышты жұтқыншақтың артқы қабырғасынан шырыштан бөліп алады;
- ☐ *серологиялық*, онда науқастың немесе ауырып жазылған адамның сарысуындағы спецификалық антиденелер анықталады.

Бактериологиялық диагностика

Материалды алу. Зерттеуге арналған материал-жоғарғы тыныс жолдарының шырышы. Материалды алу екі жолмен жүзеге асырылады: ☐ жұтқыншақ артынан тампонмен; ☐ "жөтелдік пластинка".

Құрғақ тампонмен алынған материал тез арада қоректік ортаға себіледі, ал ылғалданған тампонмен алған кезде материалды зертханаға себу үшін, 2-4 сағаттың ішінде кешіктірілмей жеткізіледі. "Жөтелдік пластинка" әдісімен материалды жинау қоректік ортасы бар екі шыныаяққа (ККА) жүргізіледі. Жөтелу кезінде сол қолыңызбен табақшаның қақпағын ашыңыз, ал оң қолыңызбен оны ауызға 10-12 см қашықтықта әкеліңіз, сонда тыныс алу жолдарынан шырыш тамшылары орта бетіне түседі. Бұл позицияда табақшаны 6-8 рет жөтелге ұшырайды, содан кейін қақпақпен жабылады және 37 °С температурада зертханаға жеткізіледі. Диагностикалық мақсатта материалды себу кезінде ККА ортасы бар 2 табақша, ал эпидемиялық көрсеткіштер бойынша - 1 табақша қолдану ұсынылады.

Серологиялық диагноз

Көкжөтел мен паракөкжөтелдің серологиялық диагностикасы зерттелетін сарысуда спецификалық антиденелерді анықтаудан тұрады. Зерттеулер аурудың 2-3-ші аптасында, науқастардың қанында спецификалық антиденелер пайда болған кезде жүргізіледі. Көкжөтелге қарсы иммунизацияның кең таралуына байланысты серологиялық реакциялардың нәтижелері оларды динамикада зерттегенде, науқастың жұптасқан сарысуын 1-2 апта аралықпен кемінде 2-3 рет зерттегенде ғана диагностикалық мәнге ие болуы мүмкін. Серологиялық реакцияларды көкжөтел және паракөкжөтел диагностикасымен қатар қою керек.

Сонымен қатар иммунизацияланбаған адамдарда сероконверсия байқалады (антиденелер титрінің 2-4 есе жоғарылауы), ал вакцинацияланған адамдарда сероконверсия анықталмайды, өйткені зерттеу уақытында екіншілік иммундық жауап пайда болады. Серологиялық зерттеулер динамикалық түрде аурудың 2-3 аптасынан бастап 1-2 апта аралықпен жүргізілуі керек.

Көкжөтелді серологиялық диагностикалаудың ең кең таралған әдісі **агглютинация реакциясы** болып табылады. Агглютинация реакциясында көкжөтел мен паракөкжөтелдің серологиялық диагностикасын жасау үшін диагностикалар қолданылады, олар формалинмен бейтараптандырылған көкжөтел (1 мл-де 20 млрд) немесе паракөкжөтел (1 мл-де 35 млрд) микробтардың біртекті суспензиясы болып табылады (сурет 139). Диагностикалар науқас адамдардың, сауығып кеткен науқастардың немесе вакцинацияланған адамдардың қан сарысуында антиденелерді анықтауға мүмкіндік береді.

Жұмыстың орындалу барысы

Келесі 9-10 сұйылту зерттелетін сарысудан дайындалады: 1:5, 1:10 және т.б. 1:1280 немесе 1:2560 дейін. 10-шы (немесе 11-ші) пробиркаға сарысудың орнына 0,25 мл физиологиялық ерітінді (бақылау) құйылады. Агглютинация реакциясын 0,5 мл көлемінде қояды: сарысуды тиісті сұйылтудың 0,25 мл-ге 0,25 мл диагностикум қосылады. Пробиркаларды термостатқа 37 °С температурада 2 сағат салып, содан кейін бөлме температурасында қалдырады. Нәтижелер келесі күні агглютиноскоптың көмегімен есептеледі. Соңғы титр сол сұйылту деп саналады, егерде онда екі крестке (2+) нақты агглютинация байқалса, алайда реакция алдыңғы пробиркаларда төрт немесе үш крестке (4+ немесе 3+) нақты агглютинация болған кезде ғана оң деп саналады.

1:80 сұйылту вакцинацияланбаған және ауырмаған балалардағы агглютинация реакциясының диагностикалық титрі болып саналады. Иммунизацияланған балалар мен ересектерде оң реакция нәтижелері титрдің кем дегенде 4 есе жоғарылауымен 1-2 апта аралықпен алынған жұпталған қан сарысуын зерттеу кезінде ғана ескеріледі.

Толық агглютинация реакциясын орнату схемасы

Ингредиентер	Сарысуды сұйылтулар									
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	ҚД
Стерильді физиологиялық ерітінді (мл)	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Зерттеу сарысуы (мл) 1:5	0,25	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	
Көкжөтел диагностикумі(мл)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

0,25

МАҢЫЗДЫ! Реакция көкжөтел және паракөкжөтел диагностикумымен қатар қойылады.

Хаттама №6

Көк жөтел кезінде серологиялық диагностика үшін агглютинация реакциясы

Күн	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
-----	-----------------------------	----------------	--------

1.	Науқастың сарысуы	1.Зерттеуге жолдама жазу. 2. Жұмыс барысын сипаттауда көрсетілген схемаға сәйкес АР қою. 3.Пробиркаларды термостатқа 37°С қа 2 с. салу. 4.Нәтижені ескеру. 5.Суреттеу. 6. Қорытынды жасау және аурудың серологиялық диагнозын негіздеу. 7. Бланкіге алынған нәтижені жазу.	
----	-------------------	--	--

Материалдар мен құрал-жабдықтар: науқастың сарысуы, натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі, көкжөтел және паракөкжөтел диагностикумы, пробиркалар, штатив, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 182-186.
2. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 160163.

2.7. Зертханалық жұмыс №7

Тақырып: Өкпе туберкулезін микроскопиялық диагностикалау

Мақсаты: Туберкулездің микроскопиялық диагностикалау тәсілдерін игеру

Студент білуі тиіс:

1. Туберкулездің микробиологиялық диагностикалау тәсілдерін. **Студент жасай алуы тиіс:**
2. Туберкулезді микроскопиялық диагностикалауды
3. Зертханаға жолдама жазуды және зерттеу нәтижесін бағалауды

Тақырып бойынша негізгі теориялық ақпарат

Туберкулез – әр түрлі ағзаларда өзіне тән гранулемалар(лат. *granulum*– дән, түйіршік) түзе, түйін, томпақ (лат. *tuberculum*– түйіншек) пайда болуымен жүретін қабынумен одан әрі оның (тіннің) ірімшік тәрізді ыдырауымен немесе известтенуімен болатын адамның біріншілік созылмалы жұқпалы ауруы.

1882 ж. герман бактериологы Р. Кох 17 жыл бойы жүргізілген жұмысының нәтижесінде алғаш рет ауру адамның қақырығын микроскопиялық зерттеу барысында туберкулез қоздырғышын анықтады. Зерттеу кезінде Р.Кох препаратты бояу үшін везувинмен метилен көгін қолданған еді. Қоздырғышты

Кох бациллалары (таяқшалары) деп атады. 1882 ж. 24- наурызда. Кох туберкулез қоздырғышын бөліп алғандығы туралы хабарлама жасады. Осыған орай ДДҰ 24-наурызды Бүкіл әлемдік туберкулезбен күрес күні деп жариялады. Кейінірек Р. Кох сарысулы ортадан қоздырғыштың таза өсіндісін бөліп алды.

1890 ж. Р. Кох “дақылдың су-глицериндік сығындысын алды” туберкулин алды. Ол туберкулинді туберкулезді диагностикалауға, профилактикасына, тіпті емдеуге қолдануға болады деп болжады. Дегенмен, уақыт өте келе туберкулин өте нәтижелі диагностикалау құралы екендігі анықталды. 1905 жылы. Р. Кох туберкулез қоздырғышын зерттегені үшін физиология мен медицина саласы бойынша Нобель сыйлығының иегері атанды.

1882-1884жж. Герман ғалымдары Франц Циль (F. Ziehl, 1857-1926 жж.) мен Ф. Нельсен қышқылға төзімді бактерияларды карбол фуксинімен от жалынына қыздырып бояу (термоқышқылдық өңдеу тәсілі) әдісін ұсынды. Циль-Нельсен тәсілі бүгінгі күнге дейін туберкулез диагностикасында қолданыста. Микобактериялардың жасуша қабырғасында көп мөлшерде липидтер, микол қышқылдары болғандықтан анилин бояуларын нашар қабылдайды, сондықтан Циль-Нельсен тәсілімен бояйды.

1907 ж. австриялық педиатр К. Пирке (131 сурет) туберкулез микобактерияларымен залалданғандарды анықтау үшін терілік туберкулин сынамасын ұсынды.



131 сурет - Клеменс фон Пирке (Clemens Peter Freiherr von Pirquet, 1874-1929 жж.). Интернет желісінен алынған.

1910 ж. француз зерттеушісі Шарль Манту (сурет 142) мен германдық ғалым Феликс Мендель туберкулинді тері ішіне енгізуді ұсынды, ол теріге тамызғаннан сезімтал болып шықты.

1919 ж. француз зерттеушісі микробиолог А. Кальметтпен ветеринар К. Герен туберкулез микобактериясының (Кальметт-Герен бациллалары, BCG – Bacilles Calmette – Guérin немесе БЦЖ) вакциндік штаммаларын алды. Олар бұл штаммды алу үшін 13 жыл бойы өгіз типті туберкулезі қоздырғышын өт қосылған картофель-глицерин ортасында 230 рет қайталап сеуіп отырды.

Туберкулез қоздырғыштары *Mycobacteriaceae* туыстығына *Mycobacterium* тұқымдастығына жатады. Адамда туберкулез туғызатын микобактериялар *Mycobacterium tuberculosis* кешеніне біріктірілген, олар:

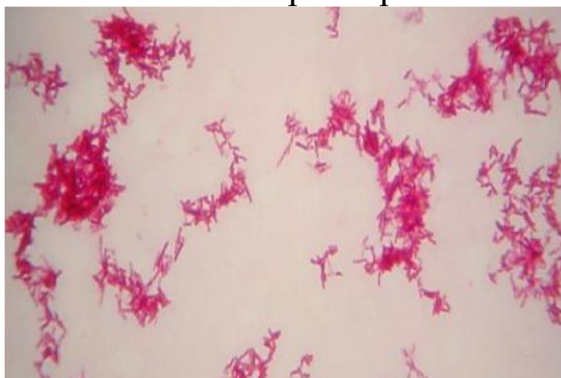
- *M. tuberculosis*- адамдық түр;
- *M. bovis*- өгіздік түр;
- *M. africanum*- аралық түр.



132 сурет - Туберкулез микобактериялары. а – компьютерлік бейнелеу, б – сканерлік микроскоп көмегімен жасалған сурет. Интернет желісінен алынған.

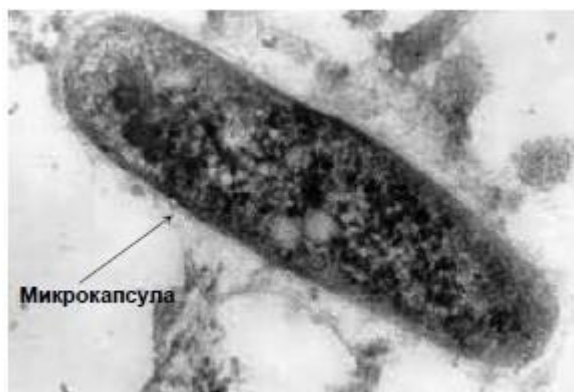
Туберкулез қоздырғыштары полиморфты, пішіні -жіңішке,ұзын, сәл иілген (*Mycobacterium tuberculosis*) немесе қысқа жұмыр (*M. bovis*) таяқшалар. Грам оң, спора түзбейді, қозғалыссыз, қышқыл -, спирт- және сілті тұрақты.

Кейде микобактериялар саңырауқұлақ мицеллалары сияқты жіпшелер түзеді, осыған орай *mykes*- саңырауқылақ және *bacterium*– бактерия, осыған орай олардың аталуы пайда болған – микобактериялар.

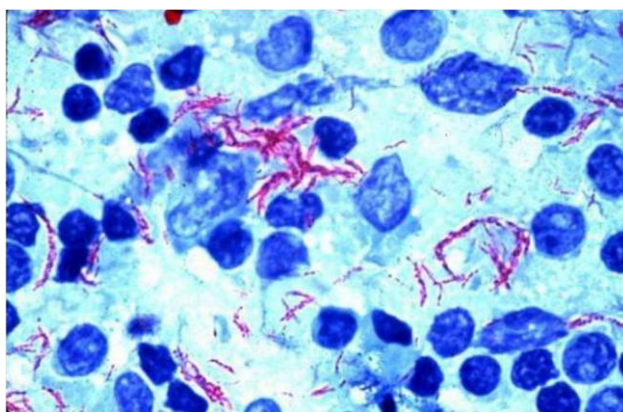


133 сурет - Микобактериялардың саңырауқұлақ мицеллалары сияқты жіпшелер түзуі. Интернет желісінен алынған.

Микобактериялар қозғалмайтын, спора түзбейтін, микрокапсуласы бар.



135 сурет - Микобактериялардың микрокапсуласы. Интернет желісінен алынған.



136 сурет – Қақырықтағы *M. Tuberculosis* (Циль-Нельсен бойынша бояу) Интернет желісінен алынған.

Микобактериялар L-формаға айнала алады, олардың метаболизм деңгейі төмен болады, вируленттілігі әлсіз және организмде ұзақ уақыт персистенцияланады.

Микобактериялар - облигатты аэробтар. Оларды дақылдау үшін қоректік ортада глицерин, лецитин, витаминдер, аминқышқылдары болуы керек. Оларды дақылдауға жұмыртқа қосылған Левенштейн-Йенсен (137 сурет), Финн II және синтетикалық Сотон орталарын қолданады. Оптималды өсу температурасы 37-38 °С; рН - 6,8-7,2, леспе микрофлораны тежеуге ортаға жасыл малахит бояуын және микобактерияларға әсері жоқ антибиотиктер қосылады.



137 сурет – Левенштейн-Йенсен тығыз қоректік ортасындағы *M. bovis* өсіндісі. Интернет желісінен алынған.

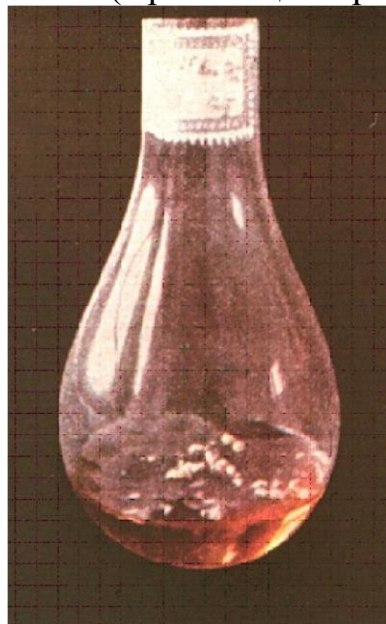
Тығыз қоректік орталарда 15 -20 тәуліктерде ашық-крем түстес немесе бозғылт сары түсті шеттері тегіс емес (R-формалы колония), түрлі-түсті орамжапыраққа ұқсас өсінді пайда болады.

Микобактерияларды дақылдауға көбінесе ДДҰ ұсынған туберкулез диагностикасында стандарт саналатын жұмыртқа қосылған Левенштейн-Йенсен, Финн-2 орталары пайдаланылады. Бұл орталарда 15-40 тәулікте бұжыр крем түстес сүйел (“піл сүйегі ” түсті) тәрізді, ақ қырыққабатқа ұқсас колониялар түзеді (138 сурет).



138 сурет - Левенштейн-Йенсен тығыз ортасындағы сүйел тәрізді *M. Tuberculosis* өсіндісі. Интернет желісінен алынған.

Сұйық орталарда 5 – 7 тәуліктерде крем түстес, қалың,күрғақ, бұжырлықатпарлы қабықша түзе өседі (139 сурет). Микобактериялар сұйық ортада әйнек бетінде өсуге қабілетті (Прайстың микродақылдау тәсілі).



139 сурет – Сұйық қоректік ортадағы *M. Tuberculosis* өсіндісі. Интернет желісінен алынған.

Микобактериялар сұйық қоректік ортада шыныда дақылдануға қабілетті. 48-72 сағаттан соң тығыз ортада микобактериялардың вирулентті штаммалардың корд-факторы (ағылш. *cord* - «қамшы, арқан») анықталады, осыған байланысты микобактериялар бұрым, арқан тәрізді өсінді береді.

Кордфактор – микобактериялардың патогенді факторыларына жататын – гликолипид (140 сурет).



140 сурет –Прайс әдісімен дақылдандырғанда анықталатын Корд-фактор.Интернет желісінен алынған.

Туберкулезбен ең жиі зақымданатын тыныс органдары, бірақ басқа мүшелерде зақымдануы мүмкін, осыған орай өкпе туберкулезімен өкпеден тыс туберкулез деп бөледі.

Туберкулезді лабораториялық диагностикалауға негізгі қосымша тәсілдерді қолданады.

Негізгі әдістер:

- бактериоскопия әдіс (жарық және люминесцентті микроскопия); - бактериологиялық тәсіл. **Қосымша әдістер:**
- биологиялық әдіс;
- серологиялық әдіс;
- тері- аллергиялық сынама ;
- полимеразды тізбекті реакция (ПТР).

Зерттеу материалы патологиялық процестің орналасуына байланысты қақырық, бронх бөліндісі, жылан көз бөліндісі, ликвор, несеп, нәжіс.

Жұмыстың орындалу барысы

1. Бактериологиялық лабораторияға жолдама жазу.

Зерттеу материалы: қақырық.

2. Жағынды жасап оны Циль-Нельсен әдісімен бояйды. Қақырықта микобактериялар мөлшері аз болған жағдайда «байыту» тәсілдерін гомогенизация және тұндыру қолданады.

3. **Циль-Нильсен әдісімен бояу:**

1. Кептірілген бекітілген жағындыға сүзгіш қағаздың аз бөлшегін қойып үстіне Цилдің карбол фуксин ертіндісін құяды. Заттық шыныны пинцетпен ұстап жалынның үстіне бу шыққанша қыздырады. Буланып бояу кепкен кезде сүзгіш қағаз үстіне карбол фуксинін еппен қайта құяды. Осы әрекеттерді 2 -3 рет

қайталайды, әр қайталаған ретте әйнекті шетке суытуға қалдырады (будын пайда болуын жағындының жанынан қарау ыңғайлы);

2. Қағазды алып, жағындыны суытып сумен шаяды;
3. 5 % күкірт қышқылымен түссіздендіреді, қышқылды құя отырып 1-2 минутбойына толық түссіздендіреді;
4. сумен мұқият шаю;
5. Леффлер көгімен бояу (3-5 мин);
6. Сумен мұқият шаю кептіру.

Осылай бояу нәтижесінде қышқылға төзімді бактериялар рубин-қызыл түске ал басқалары көк түске боялады.

Хаттама №7

Өкпе туберкулезін микроскопиялық диагностикалау әдісі

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Науқас қақырығы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Бак.лабораторияға жолдама жазу. 2. Жағынды дайындау, Циль-Нельсен әдісімен бояу. 3. Микроскопия. 4. Суреттеу. 5. Хаттамаға қортынды жазу. 6. Жолдама, жауап бланктерін толтыру. 	

Материалдар мен құралдар: спирттік шам; бактериологиялық ілмек; пробиркаларға штатив; дайын микропрепарат, әйнек «көпірі» бар табақша; сүзгіш қағаз; әйнекке жазатын карандаш (стеклограф); дезинфициялайтын ертінді; иммерсиялық объективті биологиялық микроскоп; иммерсиялық май; Циль – Нельсен бояуы үшін қажетті реактивтер.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 164-168.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 186-190.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 164-169

1.8. Зертханалық жұмыс №8

Тақырыбы: **Күл ауруының микроскопиялық диагностикасы** Мақсаты:

Күлдің диагностикасының микроскопиялық әдісін меңгеру.

Студент білуі тиіс:

1. Күлдің диагностикасының микробиологиялық әдістері.
2. Күлдің зерттеу үшін жұтқыншақтан жағынды алу әдісі;**Студент жасап білуі тиіс:**

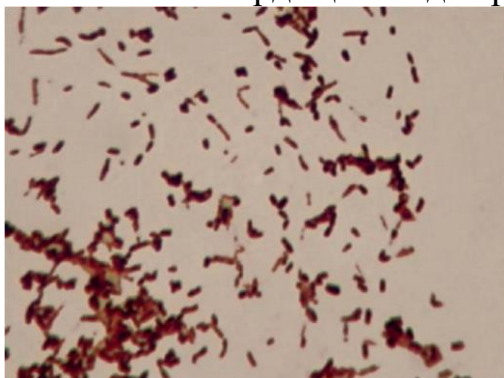
1. Күлдің диагностикасының микроскопиялық әдісімен жасау
2. Күлдің микроскопиялық диагностикасына жолдама мен нәтижесін жазу.

Негізгі теориялық ақпарат

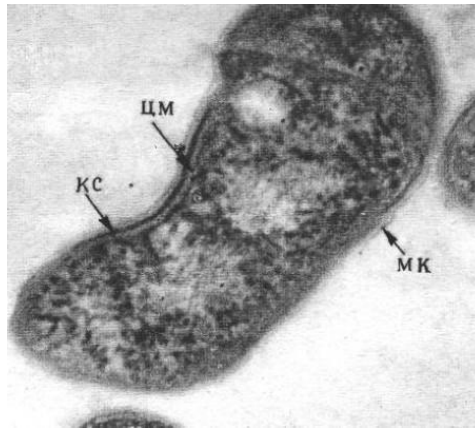
Күл – организмнің жалпы интоксикациясымен және инфекцияның кіреберіс қақпасының орнында ақшыл-сұр қатпарлардың пайда болуымен сипатталатын жедел жұқпалы ауру. Аурудың атауы грек тілінен шыққан. *diphthera* - қабықша, қатпар, тері. Төменгі тіндерге дәнекерленген тығыз пленканың пайда болуы осы ауруға тән. Күл **антропоноздық** инфекцияларға жатады.

Күл қоздырғыштары *Corynebacteriaceae* тұқымдасына, *Corynebacterium* туыстастығына, *C. diphtheriae* түріне жатады. Бұл волютин түйіршіктері бар түйреуіш тәрізді түзу немесе сәл иілген жұқа грам оң таяқшалар (140 сурет). Олар споралар мен капсулаларды түзбейді, қозғалмайды, бірақ оның құрамында корд-факторы бар микрокапула түзеді Күл қоздырғыштары 37°C температурада өсетін факультативті анаэробтар.

Күл қоздырғышын 1883 жылы герман бактериологы Е.Клебс (сурет 155) наукастың тамағынан алынған пленкалардың кесінділерінен тапқан.



140 сурет - Күл қоздырғышы *Corynebacterium diphtheriae*, таза дақыл (Нейссербойынша). Интернет желісінен алынған.



141 сурет - *C. diphtheriae* жасушасы, электрондық микроскопия ЦМ – цитоплазматикалық мембрана, ЖҚ – жасуша қабырғасы, МК – микрокапсула. Интернет желісінен алынған.



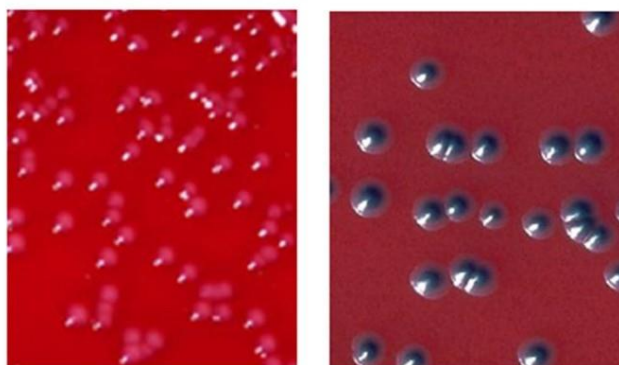
142 сурет - Эдвин Клебс (Edwin Klebs, 1834-1913 жж.). Интернет желісінен алынған.

1884 жылы неміс бактериологы Ф.Лёффлер (сурет 156) күл қоздырғышының таза дақылын алды. Содан бері қоздырғыш Клебс-Лёффлер таяқшасы деп аталады.

Адамға патогенді коринебактерияларға типтік *C. diphtheria*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* жатады. Олар адамдарда дифтерия және дифтерия тәрізді ауруларды тудырады.

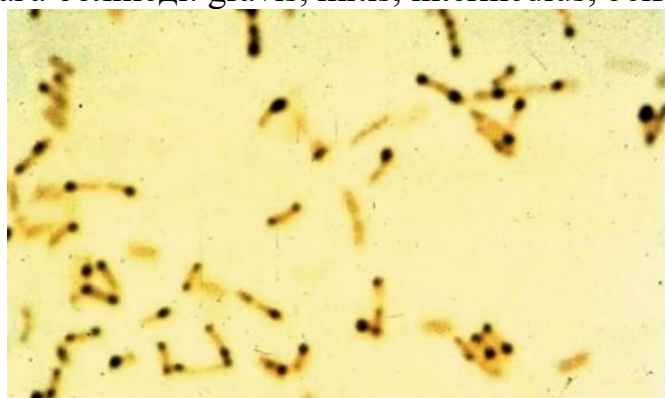
Зертханалық диагностика тәсілдері микроскопиялық, бактериологиялық, серологиялық және ПТР.

Қанды агарда орташа өлшемді дөңес, сұр-ақ түсті колониялар түзіледі. Ауруға ең тән колониялар 0,04% калий немесе натрий теллуриді (*C. diphtheriae* селективті өсу ортасы) қосылған Клауберг II ортасында өседі. Олар металдық теллурдағы калий теллуриді қалыпқа келтіреді, бұл мұндай қоректік орталарда өсірілген колониялардың сұр-қара түске бояуын түсіндіреді. (143 сурет).



143 сурет - Қанды агарда (а) және теллуритті қанды агарда (Клауберг Портасы) (b) *Corinebacterium diphtheriae* өсу сипаты. Интернет желісінен алынған.

Қанды-теллуритті қоректік орталарда өсетін колониялардың сипатына, жағындылардағы таяқшалардың морфологиясына, крахмалды ыдырату және нитраттардың азаюына қатынасы бойынша *C. diphtheriae* төрт дақылдық биохимиялық нұсқаға бөлінеді: *gravis*, *mitis*, *intermedius*, *belfanti*.



144 сурет - *Corynebacterium diphtheriae*-дағы волютин дөңдерінің идентификациясы (Нейссер бояуы). Интернет желісінен алынған.

Биохимиялық белсенділік. Күл қоздырғышы жоғары ферментативті белсенділікке ие. *C. diphtheriae* барлық штамдары глюкозаны, мальтозаны, галактозаны қышқыл түзе отырып ыдыратады және сахарозаны, лактозаны және маннитолды ыдыратпайды (145 сурет).



145 сурет - Көмірсулардың ыдырауы *C. Diphtheriae*. Интернет желісінен алынған.

Күлмен ауратын науқастар ауруханада емделеді. Токсинді бейтараптандыру үшін арнайы күлге қарсы жылқының тазартылған концентрацияланған сарысуы (антитоксин) қолданылады (146 сурет). Препарат дифтерия анатоксинімен жылқыларды көп қайтара иммундау арқылы алынады. Сарысу бұлшықет ішіне немесе тері астына енгізіледі.



146 сурет - Күл қарсы жылқы сарысуы. Интернет желісінен алынған.

Спецификалық профилактика. Күлдің спецификалық профилактикасы үшін құрамында күл анатоксині (токсоид) бар препараттар қолданылады (147 сурет).



147 сурет - АКДС-вакцина. Интернет желісінен алынған.

Жұмыс барысы

1. Материалды алу және жеткізу

- Материалды алу емдеу мекемелерінің арнайы дайындалған медицинақызметкерлері жүргізуі керек.
- Күлге тексеру кезінде ауыз-жұтқыншақ пен мұрын тексеріледі. Сиреккездесетін күл ошақтарында (көз, құлақ, жара, тері, қынап) зақымдалған аймақтардан басқа, бадамша бездерден және мұрыннан материал алу керек.
- Материалды алу стерильді құрғақ мақта тампондары арқылы жүзеге асырылады.
- Жұтқыншақпен пен мұрыннан алынған материалды аш қарынға немесе тамақтанғаннан кейін 2 сағаттан кейін, жақсы жарықта, шпательмен тілге және жақтың және тістердің ішкі беттеріне тампонды тигізбей, бөлек тампондармен алынады. Бір жағынды ауыз-жұтқыншақтың (бадамша бездерінің) зақымдалған аймақтарынан, қажет болған жағдайда – жұмсақ таңдайдың доғаларынан, таңдай немесе жұтқыншақтың артқы қабырғасынан материал жинайды. Ақтандақ болған кезде материалды жағындымен жеңіл басу арқылы зақымдалған және сау тіндердің шекарасынан алынуы керек. Мұрыннан материал алу үшін басқа тампонды қолданады, мұрынның сыртына тигізбей, алдымен біреуіне, содан кейін екіншісіне еңгізіп алады.
- Тампондарды зертханаға материал алынған сәттен бастап 3 сағаттан кешіктірмей жеткізу керек.
- Тасымалдаушы ортаны пайдаланған жағдайда материал құрғақ тампонмен жиналады, ортасы бар пробиркаға түсіріледі және тампонның тығынының суланбауын қадағалау қажет. Тасымалдаушыны пайдалану нәтиже беру уақытын бір күнге ұзартатынын ескеру қажет.

Нейссер бойынша волютин дәндерін анықтау

1. Бекітілген препаратты 1-2 минут бойы Нейссердің көк ацетатымен бояу;
2. Бояғышты шайып, препаратқа 1 мин Люголь ерітіндісінің бірнеше тамшысын тамызу;
3. Жағынды сумен шайылады және кептіріледі;
4. Дайын препаратты везувин ерітіндісіне 2-3 минутқа батырады.
5. Бояғаннан кейін жағынды сумен жуылады, кептіріледі және микроскоппен зерттеледі.

Сілтілік реакциясы бар волютин дәндері көк ацетатпен қара көк түске боялады. рН қышқыл жасушалардың цитоплазмасы сілтілі бояғыш везувинді (хризоидин) қабылдайды және сары немесе ашық қоңыр түске боялады. Күл қоздырғышында волютин түйіршіктері қатаң түрде жасушаның екі полюсінде орналасады.

ПРОТОКОЛ №8 Микроскопическая диагностика дифтерии

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
------	-------------------	----------------	--------

1	Нейсер және метилен көк түстерімен боялған дифтерия қоздырғышының дайын микропрепараты	1. Бак. лабораторияға жолдама жазу. 2. Дайын препаратты иммерсиялық жүйемен микроскопиялау және суреттеу. 4. Хаттамада қорытынды ресімдеу. 5. Бланкке жауап жазу.	
---	--	--	--

Материалдар мен жабдықтар: дифтерия қоздырғышының дайын жағындысы, спирттік шам, бактериологиялық ілмек, пробиркаларға арналған штатив, таза заттық шынылар, препараттарды бояуға арналған шыны "көпірі" бар науа, сүзгі қағазы, шыныға арналған қарындаш (стеклограф), дезинфекциялық ерітінді, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май, Нейсердің сірке қышқылды көк, везувині, Люголь ерітіндісі.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 194-199.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 212-215.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 188-192.

3.8. Зертханалық жұмыс №9

Тақырыбы: **Сібір жарасындағы Асколидің термопреципитация реакциясы**

Мақсаты: Асколи термопреципитация реакциясын қою әдісін меңгеру

Студент білуі керек:

1. Сібір жарасының микробиологиялық диагностикасының әдістері. **Студент жасай білуі тиіс:**

1. Сібір жарасындағы Асколи термопреципитация реакциясын орнату және түсіндіру

Негізгі теориялық ақпараттар

Сібір жарасы – ауыр интоксикация дамуымен, терінің, лимфа түйіндерінің және басқа ағзалардың зақымдануымен, жоғары өлім-жітімділігімен сипатталатын жедел антропозоонозды жұқпалы ауру.

1876 жылы неміс микробиологы Р.Кох алғаш рет күйдіргі қоздырғышының таза дақылын алды. Анықталған таза дақылдармен Р.Кох пен Л.Пастер жануарларда ауруды тудырды.

Сібір жарасының қоздырғыштары – *Bacillus anthracis* дақылдарының даму сатысына, сондай-ақ қоршаған орта жағдайларына байланысты үш түрде болуы мүмкін: капсуласыз вегетативті таяқшалар (сурет 163), капсуласы бар таяқшалар (148 сурет) және споралар түрінде (149 сурет).



148 сурет - Сібір жарасы микробының вегетативті капсуласыз жасушалары, Грам бойынша бояуы. Интернет желісінен алынған.



149 сурет - Күйдіргі микробының вегетативті капсулалық жасушалары, өлген жануардың мүшелерінен алынған жағынды-ізі, Ребигер бойынша боялған. Интернет желісінен алынған.

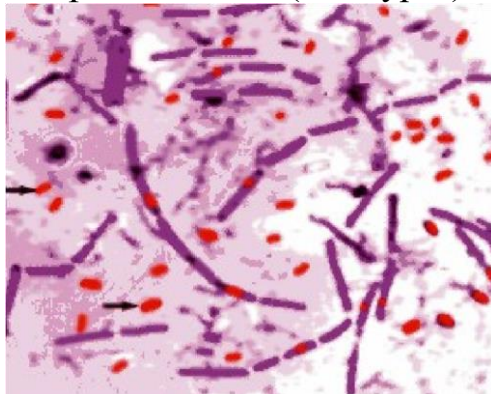
Споралар тек қолайсыз жағдайларда түзіледі: бос оттегісі бар сыртқы ортада немесе аэробты жағдайда ұзақ инкубация кезінде қоректік орталарда (150 сурет). Бұл жағдайда вегетативтік жасушада орталықта орналасқан бір сопақ спора түзіледі.



150 сурет - *B. anthracis* споралары, трансмиссиялық электронды микроскопия. Түзілген споралы қабықтар (ск), экзоспорийлер (экз) және жартылай еріген спорангийлер (спр) көрінеді. Интернет желісінен алынған.

Сібір жарасының қоздырғышы – факультативті анаэроб, қозғалмайды, қарапайым қоректік ортада жақсы өседі, өсудің оптималды температурасы 34-37 °С.

Спораларды бояу үшін Ауеска (Ожешко), Пешков, Циля-Нельсен әдістері қолданылады. Циля-Нельсен бойынша боялған кезде вегетативті жасушалар көк (күлгін), ал споралары қызыл түске боялады (151 сурет).



151 сурет - Күйдіргі микробының вегетативті жасушалары (күлгін) және споралары (қызыл), Циля-Нельсен бояуы. Интернет желісінен алынған.

Таза дақылды бөліп алу үшін зерттелетін материалды ЕПА, Хотингер агары, ет-пептонды сорпа (ЕПС) бар пробиркаларға және 0,01% натрий фенолфталеин ерітіндісі бар селективті дифференциалды диагностикалық ортаға себеді. Себінді сарқылу әдісі бойынша шпательдің көмегімен орындалады, шпательді 2-3 табақшаға ауыстыру арқылы материалды таратады (152 сурет).



152 сурет – *Bacillus anthracis* тығыз қоректік ортада өсуі. Интернет желісінен алынған.

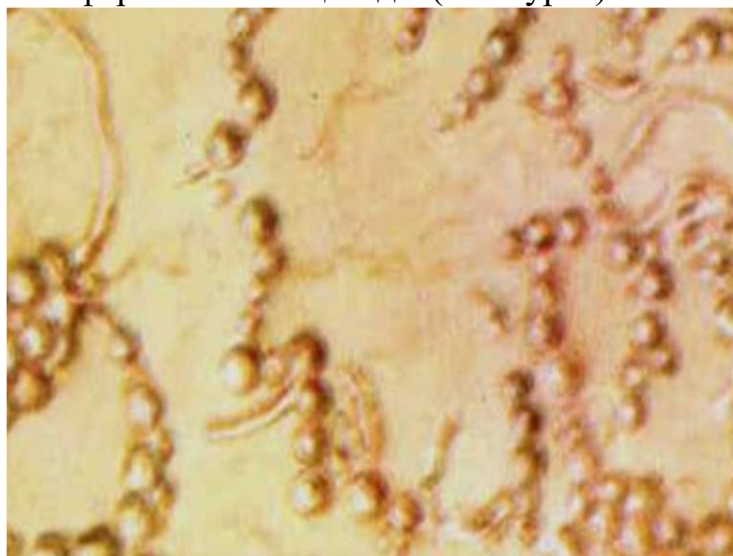
Қоректік агары бар Петри табақшаларына отырғызғанда, бір күндік инкубациядан кейін ол R-пішінді ірі, бұдырлау, құрғақ, айқын түсті колонияларды түзеді, айнала шеті тегіс емес және ол микробтың жіпше шоғырларынан пайда болған, сондықтан микроскоптың кіші ұлғайтқышымен қарағанда «арыстанның жалына» ұқсайды (153 сурет).



153 сурет – *Bacillus anthracis* өсуі «арыстан жалы». Интернет желісінен алынған.

Бір мезгілде зерттелетін материалды қоректік ортаға себеді және зертханалық жануарларға жұқтырады (биоталдау). Өлген жануарларды сояды, қаны мен мүшелерінен микроскопияға арналған препараттар жасайды және қоздырғыштың таза дақылын бөліп алу үшін қоректік ортаға себеді.

3 сағаттан кейін пенициллин қосылған агарда тізбекше орналасқан «інжулік алқа» тестін құрайтын сферопласт байқалады (154 сурет).



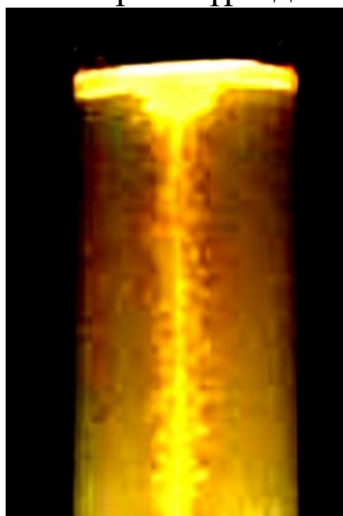
154 сурет – «Інжулік алқа» тесті, пенициллин қосылған агарда. Интернет желісінен алынған.

Сорпада R-пішінді мақта түйіршігі секілді тұнба басымырақ. Сорпа мөлдір түсті, бірақ S-пішіні сорпаны бұлыңғыр етеді (155 сурет).



155 сурет 170 - ЕПС бойынша *Bacillus anthracis* өсуі, бір күндік дақыл. Интернет желісінен алынған.

Сібір жарасының таяқшасы глюкозаны, сахарозаны, мальтозаны газсыз қышқыл түзіп ыдыратады, күкіртсутек түзеді, сүтті ұйытады, каталаза-оң. Етпептонды желатиннің бағанасына егу тәсілімен себу кезінде ол қабат-қабат сұйылтуды тудырады (төңкерілген шырша түрінде өсу) (156 сурет).



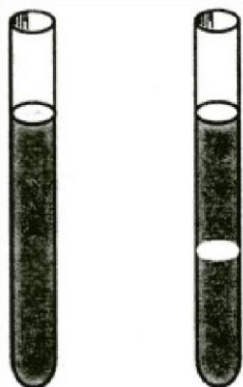
156 сурет - Ет-пептонды желатин бағанасында *Bacillus anthracis* өсуі. Интернет желісінен алынған.

Күйдіргінің зертханалық диагностикасы зерттелетін материалдан жағындылардың бактериоскопиясын, таза дақылды бөліп алуды және оны идентификациялау, ИФР көмегімен зерттелетін материалдағы антигендерді анықтауды, ПТР қоюды, биосынаманы және Асколи бойынша реакцияны қамтиды. Адамдарда да күйдіргі антигенімен терінің аллергиялық сынамасы қойылады.

Антраксинмен тері-аллергиялық сынама қойылады. Көптеген науқастарда бұл реакция аурудың алғашқы аптасында оң болады. Антраксинді асептиканың барлық ережелерін сақтай отырып, тері ішіне сол жақ білектің төменгі үштен бір

бөлігіне 0,1 мл көлемінде енгізеді. Антраксинді енгізу орнында 8-24 сағаттан кейін гиперемия мен инфильтраттың пайда болуы ескеріледі. Күйдіргі диагнозы гиперемия мен инфильтрат диаметрі 2 см-ден 4 см-ге дейін болған кезде сынама оң нәтижелі деп есептеледі.

Асколи термопреципитация реакциясы көбінесе сібір жарасы қоздырғышын немесе соматикалық полисахаридті антигенді әртүрлі субстраттарда (тері шикізаты, тері мен жүннен жасалған бұйымдар, ет, топырақ, нәжіс) анықтау үшін қолданылады. Бұл реакция жануарлардың балғын және шіріген немесе мумифицерленген өліктерінде, теріде немесе одан жасалған заттарда күйдіргілік антигендердің болуын анықтауға мүмкіндік береді. Бұл реакцияны 1902 жылы итальяндық дәрігер және иммунолог Альберто Асколи тері шикізатындағы патогенді анықтау үшін жасаған. Бұл бактериологиялық зерттеудің теріс нәтижелерінде патогеннің антигендерін анықтауға мүмкіндік береді. Бұл реакцияның құрамдас бөліктері зерттелетін материалдың сығындысы және преципитациялайтын сібір жарасының сарысуы болып табылады. Компоненттердің жанасу шекарасында 1-5 минут ішінде ақ түсті преципитацияның бұлыңғыр сақинасы пайда болады, бұл оң нәтижелі деп есептеледі (157 сурет).



157 сурет - Асколидің термопреципитация реакциясы. Интернет желісінен алынған.

Жұмыстың орындалу барысы

1. Зерттеуге арналған материалдар – карбункул және күлдіреуік бөлінділері, қақырық, нәжіс, қан және несеп. Эпидемиологиялық көрсеткіштер бойынша сыртқы ортаның әр түрлі нысандарын зерттейді, жануарлардың жүнін және қылшықтарын зерттейді. Барлық зерттеулер патогендігі I-II топтағы микроорганизмдермен жұмыс істеу қауіпсіздігін регламенттейтін талаптарға сәйкес жүргізіледі.

2. Асколи бойынша преципитация реакциясы қысқа мерзімде науқастардың, күйдіргіден қайтыс болған жануарлар мен адамдардың ағзаларының, өлген жануарлардың терілері мен ағзаларының ойық жараларынан алынған сығындыларда күйдіргі антигенін анықтауға мүмкіндік береді. Реакция жасау үшін преципитациялайтын күйдіргі сарысуы, зерттелетін материалдан алынған сығынды және бақылау үшін күйдіргі антигені қажет.

3. Сығынды алу үшін материал ұсақталады, тұзды ерітіндімен құйылады және 30-40 минут қайнатылады; алынған сығынды сүзіледі. Тар

пробиркаларға 0,2-0,3 мл тұндыратын сарысу құйылады, содан кейін алынған сығындының бірдей мөлшері Пастер пипеткасымен мұқият қабатталады. Оң реакция кезінде сұйықтықтардың жанасу шекарасында 15 минуттан кешіктірмей бұлтты ақ сақина пайда болады.

4. Бір мезгілде бақылау қойылады: бірінші пробирка: преципитациялайтын сарысу + стандартты күйдіргі антигені (оң бақылау), преципитация сақинасы түзіледі. Екінші пробирка: преципитациялайтын сарысу+сау жануардың жүнінен жасалған термоэкстракт (теріс бақылау), сақина түзілмеуі қажет. Реакция өте сезімтал.

Хаттама № 9

Күйдіргі антигенін анықтау үшін Асколидің термопреципитация реакциясы

Күні	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	1. Өлген жануардың терісінен жасалған термоэкстракт. 2 .Преципитациялайтын сарысу 3. Стандартты күйдіргі антигені.	1. Тәжірибелік пробиркаға 0,5 мл преципитациялайтын сарысу қосып, зерттелетін термоэкстрактқа мұқият пипеткамен тамызу керек. 2. Екі бақылау пробиркасына 5 мл преципитациялайтын сарысу енгізу және мұқият пипеткасымен тамызу: біреуіне - сау жануардың жүнінен жасалған термоэкстракт; екіншісіне стандартты күйдіргі антигені. 3. Нәтижені ескеру, суретін салу.	

Материалдар мен жабдықтар: Өлген жануардың терісінен жасалған термоэкстракт, преципитациялайтын сарысу, стандартты күйдіргі антигені, пипетка, пробиркалар, штатив.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 230-233.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 213-217.

3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б.208211.

2.10. Зертханалық жұмыс №10

Тақырыбы: **Обаның микроскопиялық диагностикасы**

Мақсаты: обаның микроскопиялық диагностикасын игеру

Студент білуі тиіс:

1. Обаны микробиологиялық диагностикалау әдістері. **Студент**

жасай білуі тиіс:

1. Обаға микроскопиялық диагноз қоюды.

2. Дифтерияның микроскопиялық диагнозының бағыты мен нәтижесін жазыңыз.

Негізгі теориялық ақпарат

Оба-адамдар мен жануарларға ортақ, өте қауіпті, жоғары өліммен бірге жүретін жұқпалы ауру. Табиғаттағы инфекцияның тұрақты резервуары кеміргіштер мен қояндардың белгілі бір түрлері.

Оба-бұл індет ғана емес, сонымен бірге пандемияны да тудыратын инфекциялардың бірі. Адамзат тарихында **үш оба пандемиясы** құжатталған.

Алғашқы оба пандемиясы "Юстиниан обасы" деп аталады (531-589). Бұл атау пандемия кезінде обаның тубонды түрімен ауырған Византия императоры Юстиниан I есімімен аталды.

"Қара немесе ұлы өлім" деп аталатын **екінші пандемия** Моңғолиядан бастап тарады.

Үшінші пандемия 1855 жылы Қытайдың Юньнань провинциясында пайда болды және бірнеше ондаған жылдар бойы барлық құрлықтарға таралды.

1894 жылы үшінші оба пандемиясымен күресу үшін Қытайға белгілі ғалымдар жіберілді: француз үкіметі А. Йерсенді, ал Жапония Үкіметі С. Китасатоны (158 сурет) жіберді.

С. Китасато патогенді обадан қайтыс болған адамның тіндерінен, ал А.Йерсен обадан қайтыс болған адамдардың мүшелерінен де, өлген егеуқұйрықтардан да қоздырғыштарды бөліп алды. А. Йерсен сонымен қатар қоректік ортада қайта егу кезінде қоздырғыш патогендік қасиеттерін жоғалтады, ал аз мөлшерде әлсіреген культура жануарларды обадан қорғауға қабілетті екенін анықтады. А. Йерсеннің құрметіне қоздырғыш *Yersinia pestis* деп аталды.



158 сурет - Александр Эмиль Жан Йерсен (Alexandre Emile Jean Yersin, 1863-1943 гг.); Б – Сибасабуро Китасато (1853-1931 гг.). Интернет желісінен алынған.

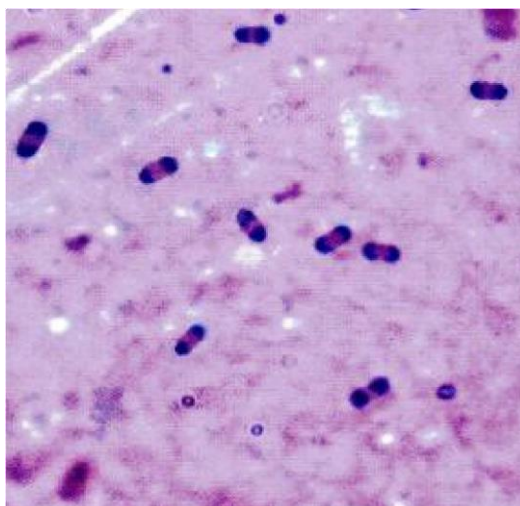
Оба қоздырғышы – Enterobacteriaceae тұқымдастығына, Yersinia туысына, pestis түріне жатады (159 сурет). Оба қоздырғышы - сопақша пішінді, қысқа грам-теріс таяқша, қозғалыссыз, спора түзбейді, жұқа капсула құрайды (160 сурет). Сопақшалы таяқша, ортасы ісінген ("бөшке"), өлшемдері 0,3-0,7x1-2 мкм.



159 сурет - Yersinia pestis Грам бойынша боялған (а) және қоздырғыштың электронды суреті (б). Интернет желісінен алынған.



160 сурет - Оба микробының капсуласы. Интернет желісінен алынған.



161 сурет - Лёффлер бойынша оба микробының метилен көгімен боялуы, биполярлы боялуы көрінген. Интернет желісінен алынған.

Тығыз қоректік ортада қоздырғыш бастапқыда "сынған әйнек", тәрізді колониялар түзеді, 10-12 сағат ішінде шеттері бұжыр келген колониялар өседі (162 сурет).

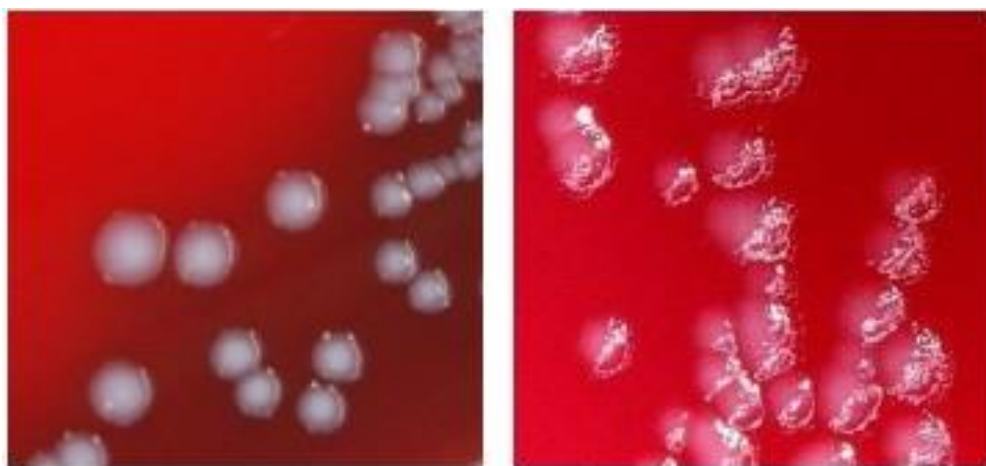


162 сурет – Тығыз қоректік ортадағы *Yersinia pestis* балғын колониялары, "сынған әйнек". Интернет желісінен алынған.

18-24 сағаттан кейін ол шілтер орамал тәрізді колонияға айналады, оның ортасында кейіннен Жарық аймағымен қоршалған колонияның дөңес түйіршікті орталығын құрайтын мөр пайда болады. Соңынан бұл колониялардың ортасы тигизделып, түйіршіктеніп айналасы ақшыл аймақпен көмкеріледі (163, 164 сурет).



163 сурет - *Yersinia pestis* қатты қоректік ортада өсу, "шілтер орамал".
Интернет желісінен алынған.



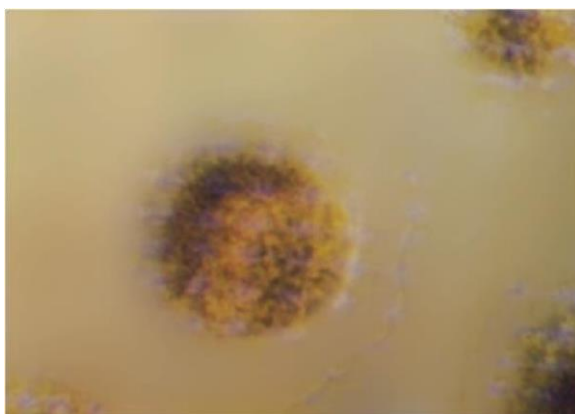
164 сурет - Қан агарында оба микробының өсу сипаты. Интернет желісінен алынған.

Оба микробына тән белгі - тығыз қоректік ортадағы колониялардың тұтқыр консистенциясында (165 сурет).



165 сурет - Оба микробы мәдениетінің өсуінің тұтқыр сипаты. Интернет желісінен алынған.

40-48 сағаттан кейін "ересек колония" кезеңі басталады; "түймедақ" секілді айқын перифериялық аймақ пен күңгірт орталығы байқалады. 2-40 ° С температурада өсуі мүмкін, оңтайлы температура 28 °С болып табылады (166 сурет).



166 сурет - *Yersinia pestis*, тығыз қоректік ортадағы жетілген, "Түймедақ" тәрізді колониялар. Интернет желісінен алынған.

Сұйық қоректік ортада оба қоздырғышы бетінде қабықша түзеді, одан түбіне қарай жіпшелер тартылып түбінде тұнба түзеді. Орта мөлдір күйінде қалады (167 сурет).



167 сурет - *Yersinia pestis* сұйық ортада өсуі. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық диагностика. Обаны зертханалық диагностикалау үшін бактериоскопиялық, бактериологиялық, биологиялық, серологиялық және молекулалық генетикалық әдістер қолданылады. Экспресс-әдістер ретінде РИФ және ПТР пайдаланылады, олар аса қауіпті инфекциялардың қоздырғыштарымен жұмыс істеуге рұқсаты бар мамандандырылған зертханаларда жүргізіледі.

Зерттеу материалы-бубон пунктаты, қақырық, жара бөлінділері, қан, зәр, нәжіс, құсық, мейіт материалы.

Обаның арнамалы профилактикасы үшін тері (скарификациялық), тері астына және ингаляциялық қолдануға арналған EV штаммы негізінде тірі аттенуирленген вакцинаның көмегімен жүзеге асырылады (168 сурет).



168 сурет - Теріге, тері астына және ингаляцияға арналған тірі оба вакцинасы. Интернет желісінен алынған.

Иммунитетті бағалау және обаны ретроспективті диагностикалау үшін пестинмен интрадермальды аллергиялық сынама жасалады. Егер пестинді енгізу орнында 24-48 сағаттан кейін диаметрі кемінде 10 мм инфильтрат пен қызару пайда болса, Реакция оң деп саналады.

Жұмыстың орындалу барысы

1. Дайын микропрепарат микроскопиялау.

Оба бактериялары сопақша пішінді, грам-теріс таяқшалар түрінде болады. Метилен көкпен боялған жағындыларында бояудың биполярлық таралуы айқын көрінеді. Полиморфты формалар бар.

ХАТТАМА №10

Обаның микроскопиялық диагностикасы

күні	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Дайын микропрепараттар	<ol style="list-style-type: none"> 1. Зерттеуге жолдама жазу. 2. Иммерсионды жүйемен дайын препаратты микроскопиялау. 3. Суретін салу. 4. Нәтижені жазу 5. Зерттеу нәтижесін бланкке жазу. 	

Материалдар мен жабдықтар: оба қоздырғышының дайын жағындысы, иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп, иммерсиялық май.

Әдебиеттері:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 170-173.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- Б. 210-211.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 199202.

2.11. Зертханалық жұмыс №11

Тақырыбы: **Анаэробты жарақат инфекцияларын диагностикалаудың микроскопиялық әдісі**

Мақсаты: жара бөлінділерін микроскопиялық зерттеуді игеру.

Студент білуі керек:

1. Анаэробты жарақат инфекциясының микробиологиялық диагностикалауының негізгі әдістерін **Студент жасай**

білуі тиіс:

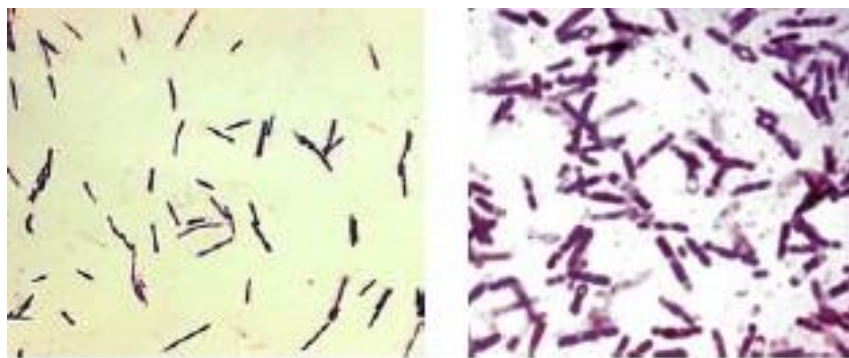
1. Анаэробты жарақат инфекциясын микроскопиялық зерттеудің жолдамасын және нәтижесін жазу.
2. Морфологиялық және тинкториалдық қасиеттері бойынша микроорганизмдерді микроскоппен қарау және дифференциалдай білу.

Негізгі теориялық ақпараттар

Жарақат анаэробты инфекция (газды гангрена) - бұл микроорганизмдер тобынан туындаған полимикробты ауру. Анаэробты клостридиальды инфекция ауыр ағыммен, некрозбен және тіндердің ісінуінің прогрессивті дамуымен, патологиялық процес аймағында газдың пайда болуымен және қоршаған тіндердің крепитациясының анықталуымен, бактериялық токсиндер мен тіндердің ыдырау өнімдерінің әсерінен ауыр интоксикациямен сипатталады. Газды гангренасының қоздырғыштары *Bacillaceae* тұқымдастығына, *Clostridium* туыстастығына жатады. Негізгі өкілдері: *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*. Әдетте ауру *Clostridium* туыстастығының бір немесе бірнеше өкілдерінің жараға енуінен және көбінесе аэробтармен - стафилококктармен және стрептококктармен қосылып жүреді.

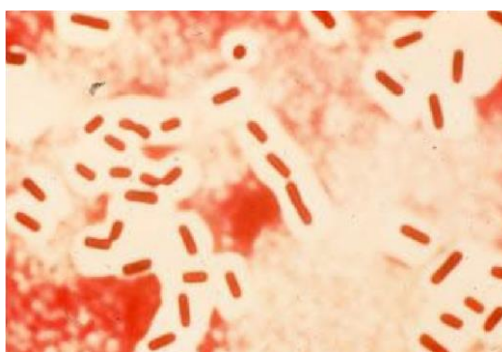
Clostridium perfringens-ті 1892 жылы Уэлч пен Неттол ашқан.

Морфологиясы: үлкен полиморфты таяқшалар орта есеппен $3-9 \times 0,9 - 1,2$ мкм құрайды. Қозғалмайды. Денеден жаңадан алынған дақылдарда капсуласы бар. Қолайсыз жағдайларға түскен кезде олар орталық немесе субтерминальды орналасқан сопақша споралары ба. Грам оң. Ескі дақылдар Грам теріс боялады (169 сурет).



169 сурет - *C. perfringens*, Грам бойынша бояу. Интернет желісінен алынған.

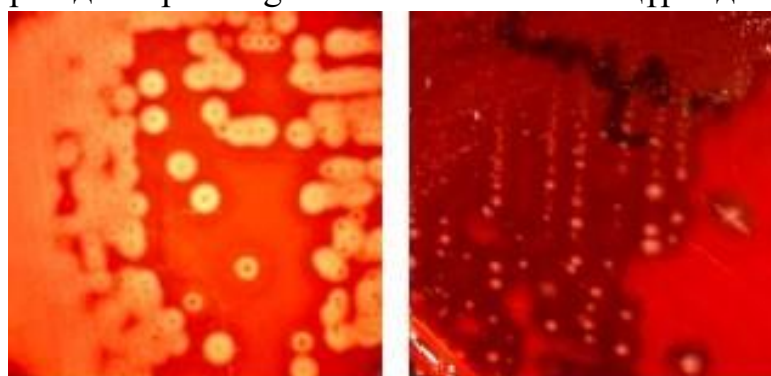
Кейбір клостридиялар әсіресе адам немесе жануарлар ағзасында капсула түзеді (170 сурет).



170 сурет - Бурри-Гинс бойынша *Cl.perfringens* (таяқшалардың айналасында түссіз капсула көрінеді). Интернет желісінен алынған.

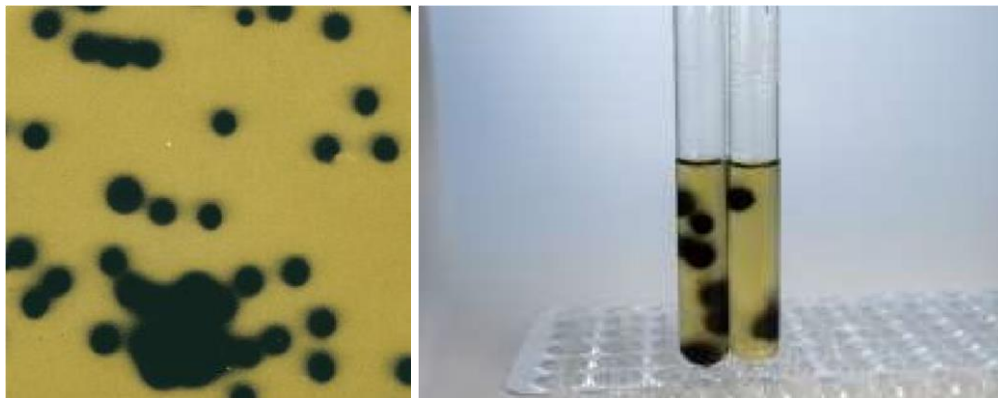
Дақылдандыруы. Зерттелетін материалды келесі қоректік орталарға себеді: Цейслер қан агары, сарыуызды агары, висмут - сульфит агар бағанасының тереңдігіне, бензидин агарына, Вильсон-Блер ортасына, КиттаТароцци ортасы бар 5 пробиркаға, оның 4-і егу алдында 20 минут қайнатылады, содан кейін тез салқындатылады. Бір пробирка жылытусыз қалады. Зерттеуге арналған материалды анаэробты жағдай жасау үшін ет-пептонды агар мен қант агарына толтырылған Пастер пипеткасына себу ұсынылады. Себілген дақылдарды анаэроустаттарға салып, күн сайын тығыз қоректік ортада өсуін бақылайды. Сұйық қоректік ортадағы дақылдар әдеттегі жағдайда термостатта 15 күн бойы өсіріледі.

Қанды орталарында *C. perfringens* гемолиз аймағын құрайды (171 сурет).



171 сурет - Қан агарындағы кластридиялардың өсуі. Интернет желісінен алынған.

Вильсон-Блер ортасында (патогендік анаэробтарға арналған темірсульфитті агар) кластридиялардың өсу процесінде натрий сульфатынан күкірт темірінің түзілуімен жүреді. Бұл ортада *C. perfringens* қара колонияларды құрайды (172 сурет).



172 сурет - Вильсон-Блер ортасында кластридиялардың өсуі. Интернет желісінен алынған.



173 сурет - Китта-Тароци ортасында кластридиялардың өсуі. Интернет желісінен алынған.

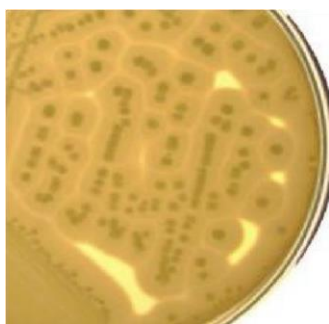
Китта-Тароци ортасында кластридиялардың өсуі осы ортаның лайлануымен және белсенді газ түзілуімен жүреді (173 сурет).

Сүтте кластридиялардың өсуі сүттің іріп кетуімен және губка тәрізді қоюімен бірге жүреді – "дауыл реакциясы" деп аталады (174 сурет).



174 сурет - Сүттегі клостридиялардың өсуі: газ көпіршіктері бар үлкен ұяшықты қоюланған сүттің іріп кетуі байқалады ("дауыл реакциясы"). Интернет желісінен алынған.

Сарыуызды агарда лецитиннің лецитиназамен ыдырауы нәтижесінде колониялардың айналасында опалесценция (түстердің ойнауы) аймағы байқалады (175 сурет).



175 сурет - Сарыуызды агарда *C. perfringens* өсуі. Интернет желісінен алынған.

Ферментативті қасиеттері. *C. perfringens* қышқыл мен газға дейін лактозаны, глюкозаны, сахарозаны, мальтозаны ыдыратады. Протеолитикалық қасиеттері-сүтті ұйытады, баяу (2-7 күнде) желатинді сұйылтады. Лакмустық сүтті кірпіш түсті және сүт сарысуының толық мөлдірлеуге дейін ұйытады. Нитраттарды нитриттерге дейін қалпына келтіреді, индол түзбейді.

Антигендік құрылымы. *C. perfringens* бес сероварға бөлінеді, олар АВС, D және Е үлкен латын әріптерімен белгіленеді. Бұл сероварлар токсиндердің антигендік және биохимиялық қасиеттері бойынша бір-бірінен ерекшеленеді. Серовар А-табиғи жағдайда ішектің тұрғыны, бірақ адамдарда тағамдық токсикоинфекцияларын тудыруы мүмкін. Серовар В қозылар ішегінде құбылыстар тудырады.

С серовары адамдарда некротикалық энтеритті және ірі қара малда ауруды тудырады.

D серовары жануарларда энтеротоксемияны тудырады.

Жануарлардың сезімталдығы. Табиғи жағдайда *C. perfringens* үй жануарларында ауру тудырады. Тәжірибелік жануарлардың ішінде гвинея

шошқалары, қояндар, көгершіндер, тышқандар оларға сезімтал. Жұқтырған жануарларда токсинді енгізу орнында тіндердің некрозы пайда болады. Қанда клостридиялар болуы мүмкін.

Зертханалық жұмыстың орындалу барысы

Иммерсиялық жүйесі бар микроскоппен патологиялық материалдан жасалған дайын микропрепараттарды зерттеп, қорытынды жасаңыз. Зерттеуге жолдама және оның нәтижесін жазыңыз.

ХАТТАМА № 11 Анаэробты жарақат инфекцияларын микроскопиялық әдіспен диагностикалау

Зерт. күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1	Жарақат бөліндісінен жасалған микропрепараттар, Грам, Гисс бойынша бояу.	1.Баклабораторияға жолдама жазу. 2.Иммерсиялық жүйелі микроскоппен дайын микропрепараттарды зерттеу. Капсуланың болуына назар аудару. 3.Сүретін салу. 4. Қорытынды жасаңыз және зерттеу нәтижесін жазыңыз.	

Материалдар мен жабдықтар: Иммерсиялық объективі бар биологиялық микроскоп; иммерсиялық май, жарақат бөліндісінен жасалған микропрепараттар (Грамм, Гисс бойынша).

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 203 -206.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- Б. 266-269.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, Б. 143148.

2.12. Зертханалық жұмыс №12 Тақырыбы:

Мерездегі Вассерман реакциясы

Мақсаты: Мерездің серологиялық диагностикасын игеру.

Студент білуі керек:

1.Мерезді микробиологиялық диагностикалау әдістері

Студент жасай білуі тиіс:

1.Мерезбен ауыратын науқастың сарысуында комплемент байланыстырушы антиденелердің болуын анықтау

2. Зерттеуге жолдама жіберу және Вассерман реакциясының нәтижесін жазу

Негізгі теориялық ақпараттар

Мерез - бұл инфекцияның кіру қақпасының орнында шырышты қабаттар мен терінің зақымдануымен, кейіннен көп мүшелі зақымданулармен (ішкі ағзалардың, сүйектердің, жүйке жүйесінің процеске қатысуы) және прогрессивті ағымымен (белсенді көріністер кезеңдері жасырын кезеңдерімен ауысады) сипатталатын адамның созылмалы жұқпалы ауруы.

Мерездің қоздырғышын 1905 жылы 3 наурызда герман ғалымдары Ф.Шаудин мен Э. Хоффман ашқан (200 сурет).



А



Б

176 сурет - А - Фритц Шаудинн (Fritz Schaudinn, 1871–1906 жж.); Б – Эрих Хоффманн (Erich Hoffmann, 1868-1959 жж.). Интернет желісінен алынған.

1906 жылы герман ғалымы А.Вассерманн (177 сурет) А. Нейссер мен К. Брукпен бірге мерезді диагностикалау үшін серологиялық реакцияны (Вассерманн реакциясы) ұсынды.



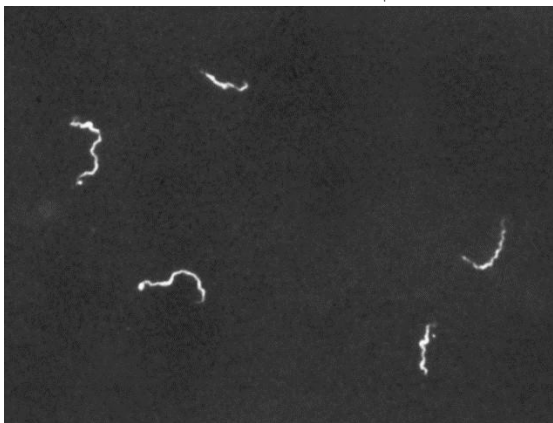
177 сурет - Август Пауль фон Вассерманн (August Paul von Wassermann, 1866-1925 жж.). Интернет желісінен алынған.

1909 жылы герман дәрігері химиотерапияның негізін қалаушы П. Эрлих (сурет 202) мерезді емдеу үшін алғашқы сальварсанға қарсы препаратты ("606", "кұтқарушы мышьяк" препараты), ал 1912 жылы неосальварсанды ("914"препараты) ұсынды.

Таксономиялық жағдай. Мерездің қоздырғышы (*Treponema pallidum*) **Трепонема** туыстастығына, *Spirochaetaceae* тұқымдастығына жатады. *Treponema* тұқымына 4 түршесі бар *T. pallidum* патогенді түрлері кіреді: *T. pallidum pallidum* – мерездің қоздырғышы, *T. pallidum endemicum* – беджелдің қоздырғышы (эндемиялық мерез, балалық шақтағы венериялық емес мерез), *T. pallidum pertenue* – фрамбезияның қоздырғышы (тропикалық гранулема, венерологиялық емес мерез) және *T. carateum* – пинта қоздырғышы (карате).

Мерездің қоздырғышы-Трепонема pallidum-спираль тәрізді микроорганизм, ұзын (8-20 мкм) жұқа (0,25—0,35) спирохет, спираль тереңдігі 0,8—1 мкм, орам амплитудасы — 1 мкм, бұйралар саны — 8-12-14. Бозғылт трепонема фибриллалар мен трепонема жасушасының өзіндік жиырылуымен қамтамасыз етілген бұрандалы, бұрыштанып иілу және контракильді қозғалыстарға қабілетті (179, 180 сурет). Жасушаішілік талшықтар болып табылатын аксиллярлық дене.

Цитоплазмада гидрофобты компоненттердің көп болуына байланысты трепонема анилин бояуларымен нашар боялады, бірақ Романовский-Гимзе әдісімен бозғылт қызғылт түске боялады (ол үшін "бозғылт трепонема" деп аталды) (181 сурет). Күміспен өңдеу және импрегнациялау әдістері де қолданылады. Морозовтың күмістендіру әдісімен боялған кезде-қара немесе қоңыр, Романовский - Гимзе бойынша-бозғылт қызғылт.

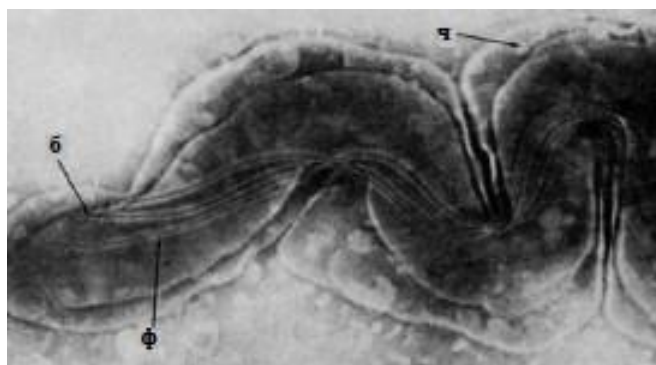


178 сурет - *Treponema pallidum*, қараңғы өріс микроскопиясы. Интернет желісінен алынған.

Боялмаған бекітілмеген тірі трепонемалар жарық микроскопында көрінбейді, оларды визуализациялау үшін түнек айдынды микроскопия әдісі (178 сурет), фазалы-контрастты микроскопта (179 сурет) қарау және флуоресцентті антиденелердің заманауи әдісі қолданылады



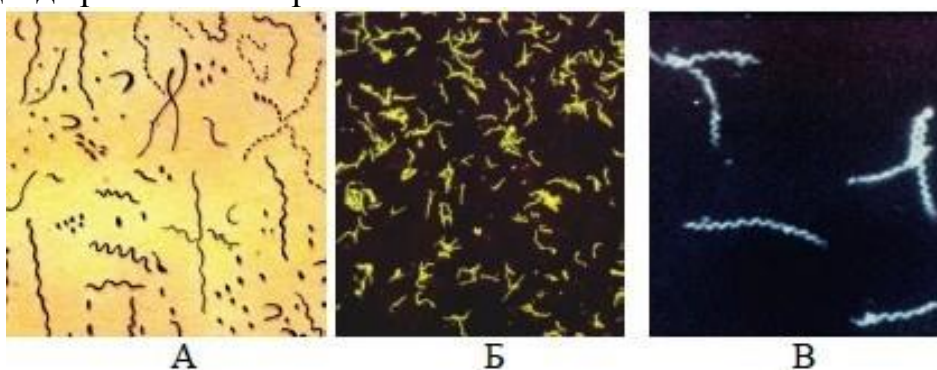
179 сурет - Трепонема, сканерлеуші электронды микроскопия. Интернет желісінен алынған.



180 сурет - Электрондық фотосурет *T. pallidum*: б – блефаропласт; ф – фибрилдер; ч – чехол. Интернет желісінен алынған.



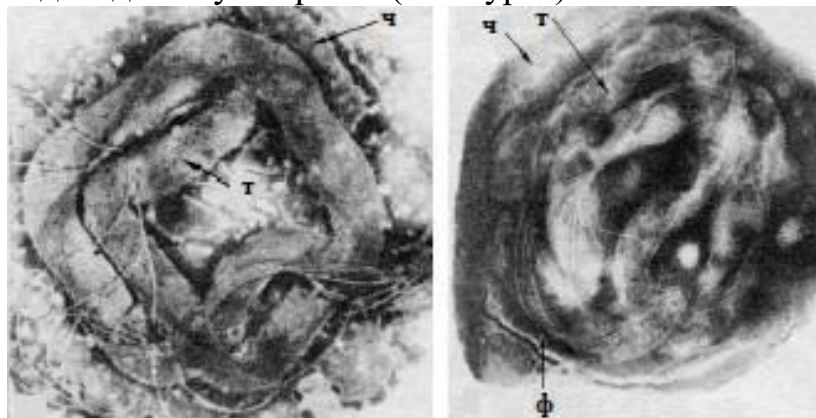
181 сурет - Романовский-Гимза әдісі бойынша боялған мерездің қоздырғышы. Интернет желісінен алынған.



А – Морозов бойынша күміс жалату (Мотавкина Н.С., Артемкин В.Д., 1976); Б – РИФ; В – түнек айдынды микроскопиясы

182 сурет - Микроскопиялық сурет *T. Pallidum*. Интернет желісінен алынған.

Ағзадағы қолайсыз өмір сүру жағдайында (антиденелердің, антибиотиктердің болуы және т.б.) бозғылт трепонема дәрілік заттардың өтуіне жол бермейтін цисталарды түзе алады. Трепонемалар цисталары түрінде айқын патогендік әсерсіз денеде болуы мүмкін (183 сурет).



ч – чехол, т – трепонемдер, ф – фибрилдер

183 сурет - Трепонема цисталары, электронды микроскопия. Интернет желісінен алынған.

Дәрілік заттардың әсерінен L-формалары қалыптасады. Цисталар мен L-формалардың болуы аурудың жасырын ұзақ ағымының себептерінің бірі болып табылады, сонымен қатар қиын зертханалық диагностикада қолданылады.

Трепонема культурасын алу үшін мерездің қоздырғышын қояндарға жұқтыру арқылы өсіреді. Бозғылт трепонеманың көбеюі тар температура диапазонында жүреді - шамамен 37°C.

Инфекция көзі әдетте 3-5 жыл бойы жұқпалы болатын науқас адам. Берілу жолы жыныстық, сирек байланыс және трансплацентарлы.

Мерездің зертханалық диагностикасы аурудың сатысына байланысты микроскопиялық, серологиялық әдістермен және ПТР арқылы жүзеге асырылады.

Инфекция көзі-әдетте 3-5 жыл ішінде жұқпалы болатын науқас адам. Берілу жолы - жыныстық, сирек жағдайда - байланыс және трансплацентарлы.

Микроскопиялық әдіс құрамында *T. pallidum* анықтауға мүмкіндік береді:

- біріншілік кезеңдегі қатты шанкр;
- екіншілік кезеңдегі бөртпелер.

Ең жақсы нәтижелер жергілікті препараттардың түнек айдынды микроскопиясы немесе фазалық контрастты микроскопия арқылы алынады.

T.pallidum облигатты паразиттер болғандықтан қоректік орталарда өсірілмейді.

Патогендік трепонемаларды өсірудің ең жақсы жолы - қояндарды аталық без ішіне жұқтыру.

Мерездің микробиологиялық диагностикасында аурудың патогенезін ескере отырып, әртүрлі әдістер қолданылады. Біріншілік мерезде

микроскопиялық зерттеу қолданылады, екіншілік мерезді диагностикалау үшін серологиялық зерттеулер қолданылады.

Ерте кезеңдерде патогенді анықтаудың қарапайым және жеткілікті сенімді әдісі - қатты шанкр немесе бөртпе элементтерінің бетінен тіндік сұйықтықтың бактериоскопиясы. Түнек айдынды микроскопияда зерттелетін «жаншылғанн тамшы» препараты дайындалады. Оң жағдайда ұзындығы 6-14 мкм жұқа спирохеттер көрінеді, олардың дұрыс пішіндегі 8-12 біркелкі кішкентай бұйралары бар.

Ең көп қолданылатыны – серологиялық реакциялар кешенімен ұсынылған зерттеудің серологиялық әдісі (СРК). Серодиагностика бар және аурудың барлық кезеңдерінде мерезді диагностикалаудың негізгі әдісі ретінде қолданылады.

СРК іріктеуші (скринингтік) және диагностикалық болып бөлінетін реакцияларды қамтиды.

Скринингтік реакциялар спецификалық емес кардиолипін антигеніне антиденелерді анықтауға бағытталған. Алдымен осы антигенге антиденелер пайда болады, ал олардың титрі организмдегі трепонемалардың санын азайту процесінде төмендейді. Тарихи түрде бұл антиденелер реагиндер деп аталады, олардың спецификасы жоқ, олар халықты мерезге жаппай тексеру және емдеудің тиімділігін бағалау үшін қолданылады. Таңдау жауаптары мыналарды қамтиды:

- микропреципитация реакциясы (МП) және оның аналогтары (VDRL - *Veneral Disease Research Laboratory*; RPR - *Rapid Plasma Reagin*);

- КБР (Вассерман реакциясы);

- флокуляциялық сынақтар.

Диагностикалық реакциялар *T.pallidum* спецификалық ақуыз антигенімен қойылады. Оған антиденелер кейінірек пайда болады және денеде трепонеманың болуына қарамастан ұзақ уақыт сақталады. Бұл өте сезімтал және жоғары спецификалық реакциялар, оларға мыналар жатады:

- ИФТ;

- ЖГАР;

- ИФР (жанама әдіс);

- РИТ (трепонемнің иммобилизация реакциясы).

Белгілі бір ақуыз антигеніне антиденелердің организмде сақталу ұзақтығына байланысты емдеудің тиімділігін бағалау үшін диагностикалық реакцияларды қолдану мүмкін емес.

Сондай-ақ, қазіргі уақытта мерезді диагностикалау үшін ПТР қолданылады.

Жұмыстың орындалу барысы

Вассерман реакциясы мерезді диагностикалаудың экспресс әдісі болып табылады. Бұл әдіс оның авторы герман иммунологы Август Вассерманның құрметіне аталды.

Талдаудың ерекшелігі - оны құрастырудың қарапайымдылығы. Бұл әдіс науқастың қанына сиыр жүрегінен алынған кардиолипін қосудан тұрады. Егер пациент мерезбен ауырса, кардиолипінмен ерекше реакция пайда болады,

өйткені пациенттің қанында антиденелер (иммунитет инфекциямен күреседі) патогенге - бозғылт трепонемаға түседі.

Антигендер спецификалық, яғни белгілі бір микроорганизмге ғана тән, ал бейспецификалық, көптеген организмдерде кездеседі. Мұндай спецификалық емес антигендерге бозғылт трепонемада және сиыр жүрегінде болатын кардиолипін жатады.

Вассерман реакциясының негізгі кемшілігі антигеннің спецификалық еместігінде жатыр – табиғатта кардиолипіннің жиі кездесуіне байланысты жалған оң нәтижелердің салыстырмалы түрде жоғары жиілігі болып табылады.

Қағидалары:

1. Вассерман реакциясы екі антигенмен бір мезгілде қойылады: - 2 пробирка, қоздырғыштың спецификалық антигені бар – ультрадыбыс арқылы жойылған трепонемалар; 3 пробирка, спецификалық емес антигені бар – кардиолипін (лецитин мен холестерин қосылған сиыр жүрегінің сығындысы) (11 кесте).
2. Зерттелетін сарысу 1:5 сұйылтылған және 0,25 мл 3 пробиркаға құйылған.
3. Бірінші пробиркаға 0,25 мл натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісін қосамыз (сарысуды бақылау).
4. Комплемент барлық үш пробиркаға қосылады (жұмыс дозасында).
5. 4-ші пробиркада гемолитикалық жүйе сенсублизацияланған: 1,0 мл үштитрде гемолитикалық сарысуға эритроциттердің 3% суспензиясы 1,0 мл қосылады.
6. 37°C термостатқа 45 минут қоямыз.
7. Егер зерттелетін Сарысуда қажетті АД болса, онда олар АГ-мен өзара әрекеттеседі және пайда болған АГ-АД кешеніне комплемент қосылады. Егер АД болмаса, онда комплемент бос қалады. Бұл реакцияның бірінші кезеңі.
8. Екінші фаза: сенсублизацияланған гемолитикалық қоспаны үш пробиркаға әрқайсысына 0,5 мл қосамыз.
9. Бақылаудағы гемолиздің басталуына байланысты термостатқа 40-60 минут қоямыз, бақылаудағы гемолиз басталғаннан кейінгі реакция нәтижелерін тіркейміз.
10. Тәжірибе пробиркада гемолиз пайда болған жағдайда КБР теріс ретінде ескеріледі, яғни қоздырғышқа АД жоқ, қой эритроциттерінің гемолизи олардың гемолитикалық сарысумен өзара әрекеттесуі нәтижесінде бос комплемент болған кезде пайда болады.
11. Нәтижелерді бағалау: оң нәтижеде әртүрлі дәрежедегі гемолиздің кешігуі байқалады, ол шартты түрде төрт кросс жүйесімен көрсетіледі (184 сурет).

Боастың сандық әдісі 1:5-тен 1:320 немесе одан да көп сатылы сұйылту арқылы 4 оң сарысулардағы антиденелердің титрін орнатуға мүмкіндік береді.

Титр оң нәтиже жазылған сарысудың ең жоғары сұйылтуы болып саналады:

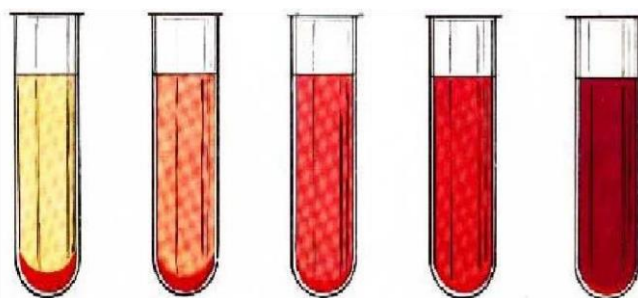
4+ гемолиздің толық кешігуі (жылдам оң нәтиже);

3+ оң;

2+ әлсіз оң;

+ - күмәнді;

- - теріс.



184 сурет - Вассерман реакциясы: а – толық гемолиздің кешігуі (++++); б – гемолиздің айқын кешігуі (+++); в – гемолиздің жартылай кешігуі (++); г – әлсіз гемолиздің кешігуі (+); д – толық гемолиз («лақты қан»). Интернет желісінен алынған.

11 кесте - Вассерман реакциясын орнату схемасы

Ингредиенттер, мл	1-ші пробирка (сарысуды бақылау)	2-ші пробирка (спецификалық антиген)	3-ші пробирка (спецификалық емес антиген)	4-ші пробирка (гемолитикалық жүйе)
Науқастың сарысуы	0,25	0,25	0,25	-
Натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі	0,25	-	-	-
Трепонемиялық антиген	-	0,25	-	-
Кардиолипінді антиген	-	-	0,25	-
Комплемент (жұмыс дозасында)	0,25	0,25	0,25	-
Үш титр ішіндегі гемолитикалық сарысу	-	-	-	1,0
3% эритроциттердің сығындысы	-	-	-	1,0
Термостатта 37°C 45 минутқа				
Гемолитикалық қоспа (сенсублизацияланған)	0,5	0,5	0,5	x
Бақылауда гемолиздің басталуына байланысты термостатта 40-60 минутқа Бақылауда гемолиз басталғаннан кейін реакция нәтижелерін тіркеу				
Нәтиже	-	+++	+++	x

№12 ПРОТОКОЛ Мерез кезіндегі Вассерман реакциясы

Күн	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Науқастың сарысуы	1.Баклабораторияға жолдама жазу. 2.Жұмыс барысын сипаттауда көрсетілген схема бойынша КБР қойыңыз. 2.Пробиркаларды термостатқа салыңыз. 3.Нәтижені ескеріңіз. 4. Жұмыс дәптеріне КБР қою схемасын, алынған нәтижені жазыңыз. 5.Қорытынды жасаңыз және зерттеу нәтижесін жазыңыз.	

Материалдар мен құрал-жабдықтар: науқастың сарысуы, натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі, трепонемді антиген, кардиолипінді антиген, комплемент (жұмыс дозасында), үштік титр ішіндегі гемолитикалық сарысу, эритроциттердің 3% қоспасы, пробиркалар, пипеткалар, штатив, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 181-183.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- б. 236-238.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, б. 199202.

2.13. Зертханалық жұмыс №13

Тақырыбы: Тұмау вирусын идентификациялауға арналған ГАТР.

Мақсаты: Тұмау вирусын идентификациялау үшін ГАТР механизмін және интерпретациялау принципін игеру

Студент білуі керек:

1.Тұмау ауруының микробиологиялық зерттеу әдістері **Студент**

жасай білуі тиіс:

1. Бөлінген вирустың типін анықтау үшін ГАТР нәтижесін интерпретациялау

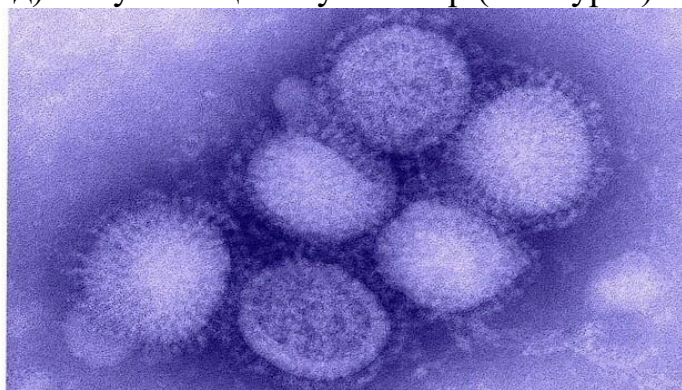
2. Тұмау вирусын идентификациялау үшін ГАТРға зерттеу мақсатында жолдама қағаз жазу және зерттеу нәтижесін толтыру

Негізгі теориялық ақпараттар

Тұмау - жиі эпидемиялық таралатын жіті вирустық респираторлық инфекция. Тұмау жалпы интоксикация, қызба, тыныс алу жолдарының, жүреқтамыр және жүйке жүйесінің зақымдалуымен сипатталады (185 сурет).

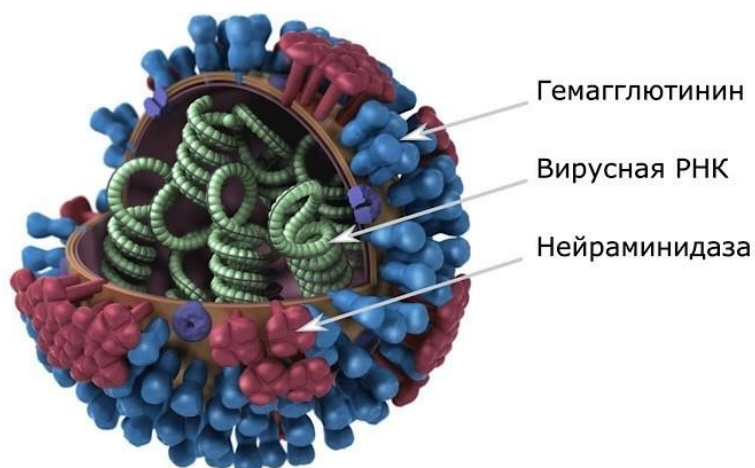
Тұмау вирусы Orthomyxoviridae тұқымдастығына жатады, оның үш туыстастығы А, В, С тұмауының вирустарын құрайды: *Influenza virus A*, *Influenza virus B* и *Influenza virus C*.

Тұмау қоздырғыштары-құрамында РНҚ бар күрделі (қабықшалы) вирустар. Вирион диаметрі шамамен 100 нм болатын сфералық пішінге ие, жіп тәрізді формалар да кездеседі. Нуклеокапсиді спиральды типті симметриялы, бетінде тікенекшелері бар липопротеинді қабатпен қоршалған. Липопротеинді қабаттың (суперкапсид) жасушалық шығу тегі бар (186 сурет).



185 сурет - Тұмау вирусы (электрондық микроскопия). Интернет желісінен алынған.

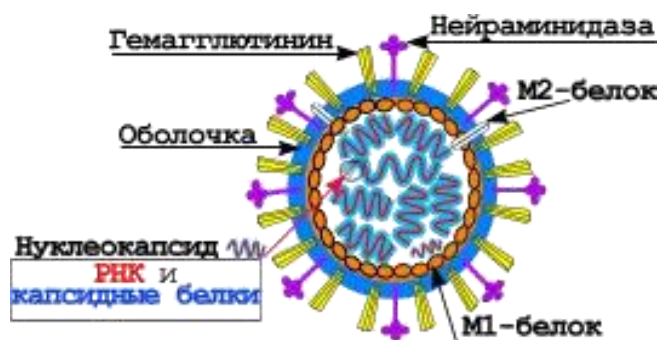
Үш вирустық ақуыз липидті қабатқа еніп, вирионның сыртқы бетін құрайды, олардың екеуі вирустық гликопротеиндер: гемагглютинин (НА) және вирионның бетін құрайтын нейраминидаза (NA) (187 сурет). Тұмау вирусының қабығының ішкі беті М1 ақуыз қабаты арқылы түзіледі. Вирион құрамында М2 (А тұмауы), NB, VM2, (В тұмауы), SM2 (С тұмауы) трансмембраналық ақуыздары бар.



186 сурет - Тұмау вирусының құрылысы (моделі). Интернет желісінен алынған.

Тұмау вирусының геномы А және В тұмауының вирустарында 8 фрагменттен, ал С тұмауында 7 фрагменттен тұратын теріс полярлықтың бір жіпшелі РНҚ (минус-РНҚ) болып табылады. Әрбір фрагмент нуклеопротеин ақуызымен (NP) және полимераза кешенінің үш ақуызымен (PB1, RV2, PA) біріктірілген. Әрбір фрагменттің негізінде вирустық ақуыздарды синтездеу үшін қосымша мРНҚ жасалады.

Суперкапсидтің бетіндегі гемагглютинин мен нейраминидазаның тікенекше-өсінділерінің ұзындығы шамамен 10 нм. Гемагглютининнің мөлшері нейраминидазаларға қарағанда 5 есе көп. С типті вирусында нейраминидазасы жоқ. Екі гликопротеиннің бетінде сезімтал жасушалардағы рецепторлармен байланысуға арналған арнайы аймақтар бар. Тұмау вирустары үшін сиал қышқылы бар қосылыстар спецификалық рецепторлар болып табылады.



187 сурет - Тұмау вирусының құрылысы (схемасы). Интернет желісінен алынған.

Вирустық бөлшектер гемагглютининнің қатысуымен сезімтал жасушамен байланысады. Гемагглютинин алдымен полипептидік тізбек түрінде синтезделеді, ал химиялық модификациядан кейін ол екі суббірлікке бөлінеді НА1 және НА2. Осындай бөліну нәтижесінде вирион жасуша мембранасымен бірігу қабілетіне ие болады. Гемагглютинин қызыл қан клеткаларын желімдеу (агглютинациялау) қабілетіне ие және тұмау вирусының негізгі антигені болып табылады. Нейраминидаза – вирустың таралу факторы, өйткені ол сиал қышқылдарын ыдыратады және вирустарға шырышты қабаттан өтуге көмектеседі.

Тұмауды зертханалық диагностикалау вирусологиялық және серологиялық әдістермен жүргізіледі. Зерттеуге арналған материалдар - мұрын-жұтқыншақтан бөлінетін, мұрын шырышты қабатынан жағындылар-таңбалар, аутопсиялық материал, қан (серологиялық әдіс үшін).

- Материалды тауық эмбриондары мен жасуша дақылдарына жұқтырады (бірінші реттік немесе ауыстырмалы).
 - Вирустардың индикациясын өлімі бойынша, клиникалық жәнepatоморфологиялық өзгерістер, цитопатиялық әсер, түйіндақтар пайда болуы, түсті реакция, ГАР және гемадсорбция бойынша жүргізіледі.
 - Вирустардың идентификациясын КБР, ГАТР, ИФТ, РИФ көмегімен антигендік құрылым бойынша жүргізіледі.
- Вирустық антигендерді анықтаудың иммунофлюоресценттік әдісі тұмаудың жылдам дифференциалды диагнозының жоғары сезімталдықты сынағы. Әдістің мәні флюорохроммен таңбаланған (мысалы, флуоресцеин изотиоцианаты - ФИТЦ) нақты антиденелердің көмегімен науқастардан алынған клиникалық материалдағы вирустық антигендерді спецификалы индикациялау. Бұл жағдайда пайда болған "антиген-антидене" кешені люминесцентті микроскоптың көк-күлгін сәулелерінде тән ашық жасыл флуоресценция арқылы анықталады.
- Гемагглютинацияны тежеу реакциясы (ГАТР) вирустың типшесін, яғни ерекшелігін анықтау үшін, сондай-ақ нақты антиденелер титрлерінің өсуін анықтау үшін қолданылады. Сарысуда спецификалық антиденелер болған кезде эритроциттердің агглютинациясының кідірісі болады. Сарысу титрі үшін гемагглютинацияның толық кешеуілдеуін тудыратын шекті сұйылту қабылданады.
- 10-12 күндік тауық эмбриондарындағы тұмау вирусының инфекциялық белсенділігін анықтау әдісі. Вирусты аллантоис қуысына (10-5-тен 10-7-ге дейін сұйылтудан алынған 0,2 мл вирус бар сұйықтық) әр өсіру үшін төрт эмбрионды қолдана отырып енгізіледі. Эмбриондарды А типті тұмау вирусы үшін 35° С температурада 48 сағат бойы және В типті тұмау вирусы үшін 72 сағат бойы өсіреді. Инкубация мерзімі аяқталғаннан кейін әр эмбрионнан 0,40,5 мл аллантоис сұйықтығын алады, ол плексигласс пластинкасының төрт бөлек тесігіне орналастырылады, әр тесікке тауық эритроциттерінің 1% суспензиясының 0,4-0,5 мл қосылады. Эритроциттердің бақылауда шөгуінен кейін 30-40 минуттан кейін есепке алу жүргізіледі
- Жалғыз радиалды иммунодиффузия (ЖРИД) реакциясы тұмау вирусының гемагглютининін сандық анықтау әдісі. Гемагглютинин (ГА) агарозды гельдің саңылауларынан радиалды бағытта таралып, агарозда орналасқан сарысудың спецификалық антиденелерімен әрекеттеседі және гельде преципитация аймағын құрайды. Лунканы қоршаған преципитация аймағының өлшемдері тесікке енгізілген антигеннің мөлшеріне тікелей байланысты.
- Серологиялық зерттеу диагнозды растау және спецификалық антиденелердің деңгейін анықтау мақсатында жүргізіледі. Антидене титрінің 5-8 күн аралығымен жұпталған сарысуды алу кезінде кем дегенде 4 есе артуының нәтижесі оң деп саналады.
- Молекулалық генетикалық зерттеу әдістеріне ПТР көмегімен вирустық РНҚ анықтау жатады.
- Иммунохроматографиялық экспресс-тест. Мұрын жағындыларының үлгілерінде А және В типті тұмау вирусының болуын анықтау үшін

иммунохроматографиялық экспресс-тест пайдаланылады. Бұл әдіс моноклоналды тышқан иммуноглобулиндерін қолдана отырып, зерттелетін материалда А және В вирустарының спецификалық нуклеопротеидтерін анықтауға негізделген. Осы мақсатта сынақ жиынтығында 2 индикатор таяқшасы бар: біреуі А типті вирустың болуын анықтауға, екіншісі В типті вирусты анықтауға арналған.

Вирусқа қарсы иммунитет

Тұмаумен ауырған адамда инфекциядан кейін тұрақты **жасушалық және гуморальды** иммунитет қалыптасады, ол өзінің тар спецификалығымен ерекшеленеді және осы ауруды тудырған тұмау вирусының серовариантына (штамына) қарсы бағытталған. Осыған байланысты тұмауға қарсы иммунитет типшелік және штаммға тән. Сондықтан вирустың сол типшелік түрінің жаңа А штаммдарының пайда болуы, тіпті беткі антигендердің өте аз дрейфімен де, қол жетімді иммунитеттің тиімділігін айтарлықтай төмендетеді. Вирустың сол типше түрінің одан әрі антигендік өзгергіштігі, тіпті антигендердің шифті, А вирусының жаңа типшесі түрінің пайда болуы адамды тұмау инфекциясынан қорғансыз етеді. **Арнамалы алдын-алуы:**

Тұмауға қарсы негізгі шаралар:

-күтілетін маусымдық тұмаумен сырқаттанушылықтың алдында халықты жаппай вакцинациялау (қазан-қараша)

-спецификалық және спецификалық емес препараттардың көмегімен тұмаудың эпидемиялық таралуы кезінде және басында адамдардың шұғыл профилактикасы.

-тұмаудың спецификалық ерте емі.

- жалпы эпидемияға қарсы және ұйымдастыру іс-шараларын жүргізу.

Вакцинопрофилактика. Бұл тұмаумен күресудің маңызды құралы. Тұмауға қарсы вакциналарының бірнеше түрлері бар — олар үнемі жетілдіріліп отырады-олардың иммуногенділігі жоғарылайды, алу және тазарту технологиясы жақсарады. Тұмауға қарсы вакциналарының тиімділігі негізінен вакцинаға кіретін тұмау штамдарының және осы індетті тудыратын штаммдардың антигендік сәйкестік дәрежесіне байланысты. Сондықтан қазіргі заманғы вакциналарда эпидемиологиялық болжамға сәйкес әр 2-3 жыл сайын ауыстырылатын вирустың әртүрлі типшесі штамдары бар. Қазіргі уақытта вакциналар А (H3N2), А (H1N1) вирустарының және В типті вирустың өзекті штамдарынан дайындалады. Қазіргі уақытты қолданылатын вакциналар түрлері:

1. **Бүтін вириондық вакциналар** (1-ші буын) - инактивацияланған және тірі. Тірі вакциналарда тұмау вирусының аттенуирленген штаммдары бар (ересектер мен балаларға арналған жеке вакциналар бар).

2. **Ыдыратылған-сплит вакциналары** (2-ші буын) құрамында тұмау вирусының ішкі және сыртқы антигендері бар және вириондарды еріткіштермен немесе детергенттермен өңдегеннен кейін алынған липидтер жоқ.

3. **Суббірліктік вакциналар** (3-ші буын). Олар ең тазартылған, құрамында тұмау вирусының сыртқы Н - және N-антигендері бар.

Вакциналардың барлық типтері жеткілікті иммуногенділікке ие, бүтін вириондық вакциналар ең реактивті, олар тауық ақуызына аллергиялық реакциялар тудыруы мүмкін; интраназальды енгізу әдетте олардың аллергиялық реакциялар дамуына жол бермейді. Тірі вакциналар жасушалық және жергілікті иммунитетті қоса, толық бағалы иммунитетті тудырады. Вакцинацияланған адамдар арасында тұмау ауруы орташа есеппен 2-2, 5 есе азаяды, тұмау инфекциясы жеңіл ағымға ие, асқынулар саны азаяды.

Шұғыл алдын алу. Ол аурудың эпидемиялық өсуі кезінде жүзеге асырылады. Балалар мекемелерінде, жұмыс топтарында – *жоспарлы алдын алу* және тұмаумен ауыратын науқастардың отбасыларында ұйымдастырылған *ошақты* алдын алуды ажыратады.

Шұғыл профилактика үшін вирусқа қарсы химиялық препараттар қолданылады: ремантадин (тек А типті вирустарға қарсы белсенді), арбидол, амиксин, оксалин жақпа және т.б. интерферон, дибазол, интерферонның әртүрлі индукторлары қолданылады (мысалы, элеутерококк, продигиозан). Мектепке дейінгі балалар ұжымдарында кейде иммуноглобулиндермен алдын алу жүргізіледі.

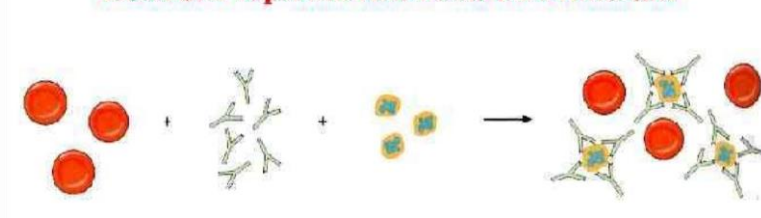
Гемагглютинацияның (ГАТР) тежелу реакциясы мынадай міндеттерді шешуге мүмкіндік береді: зерттелетін сарысуда гемагглютинациялайтын вирусқа АД титрін анықтау; белгілі диагностикалық сарысулар бойынша белгісіз гемагглютинациялайтын вирусты анықтау; екі вирустың антигендік туыстығының дәрежесін белгілеу.

ГАТР қағидасы АД вирустарды гемагглютининмен байланыстыру және оларды бейтараптандыру қабілетіне негізделген, бұл эритроциттерді агглютинациялау мүмкіндігінен айырады. Көрнекі түрде бұл әсер гемагглютинацияның "тежелуінде" көрінеді. ГАТР вирустық инфекцияларды диагностикалау кезінде науқастардың сарысуындағы спецификалық антиденелерді-антигемагглютининдерді анықтау және антигендердің қасиеттерін көрсететін гемагглютининдермен әртүрлі вирустарды идентификациялау үшін қолданылады (188 сурет).

ГАТР артықшылықтары: техниканың қарапайымдылығы, жылдамдығы, стерильді жұмыстың қажеті жоқ, спецификалығы, арзандығы.

ГАТР кемшілігі: гемагглютинациялайтын вирустармен ғана мүмкін.

Реакция торможения гемагглютинации



188 сурет - Вирустық гемагглютинация реакцияларының механизмі және гемагглютинацияны тежеу реакциясы. Интернет желісінен алынған.

Вирустарды типтеу диагностикалық типтік сарысулар жиынтығымен ГАТР - да жүзеге асырылады. Ол үшін пробиркада вирустың типтік спецификалық

сарысуы мен вирустың суспензиясының тең көлемі араластырылады және экспозициядан кейін қызыл қан клеткаларының суспензиясын қосу арқылы қоспада вирустың сақталғанын анықтайды. Эритроциттердің агглютинациясы (пробирканың түбіндегі тұнба "қолшатыр" түрінде) вирустың болуын және реакцияның теріс нәтижесін, ал гемагглютинацияның болмауын (пробирканың түбіндегі тұнба "түйме" түрінде) — вирустың қоспада болмауын көрсетеді. Вирус + сарысу қоспасынан вирустың жоғалуы сарысудағы АД және вирустың гемагглютининінің өзара әрекеттесуінің белгісі ретінде қарастырылады, яғни реакцияның оң нәтижесі.

Жұмыстың орындалу барысы

Тұмау вирусын типін анықтау үшін типтік сарысулардың (H0N1, H1N1, H3N2) бірдей көлемде (0,2 мл) бірқатар дәйекті (әдетте 2 есе) сұйылтуы дайындалады; әрбір сұйылтуға 4 ГАБ титрінде вирустың бірдей көлемі (0,2 мл) қосылады; қоспаны 30-40 минут ұстайды, содан кейін барлық қоспаларға жуылған эритроциттер суспензиясының 1% тең көлемі қосылады және 37° С инкубациядан кейін 120 мин бойы кресттермен әрбір қоспада гемагглютинацияның болуы бойынша реакция нәтижесін бағаланады ГАТР бақылаулары:

- сарысулар (гемагглютинация болмауы тиіс);- эритроциттер (гемагглютинация болмауы тиіс);

- вирус (гемагглютинация болуы керек)

(190 сурет).

ГАТР титрі қан сарысуының ең үлкен сұйылтуы болып саналады, онда гемагглютинацияның толық тежелуі байқалады ("түйме")(189 сурет).

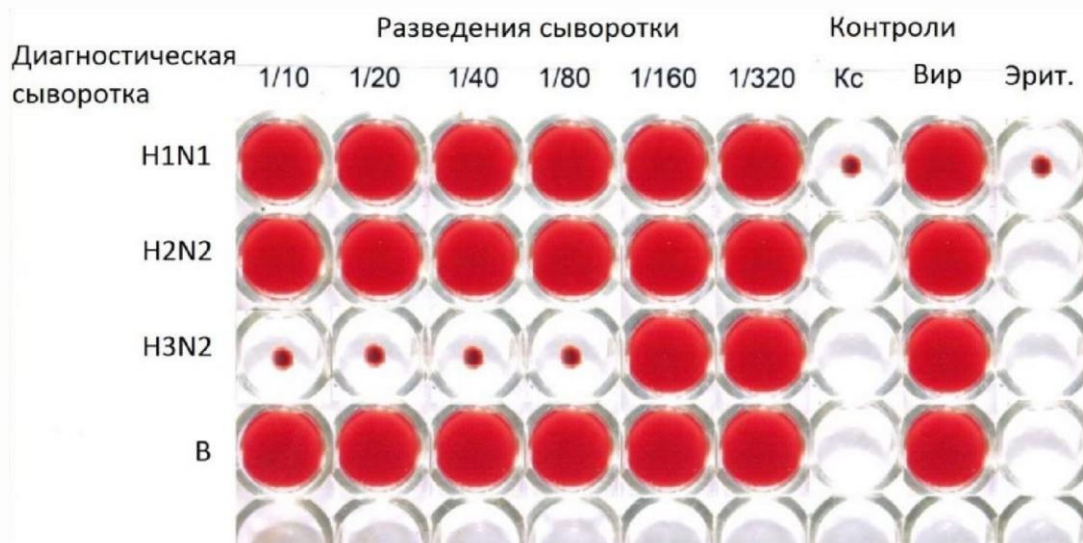
11 кесте - Тұмау вирусын типін анықтауға арналған ГАТР қою

Ингредиенттер	Сарысу сұйылтулары					Сарысу ды бақыла у	Вируст ы бақыла у	Эритро циттер бақыла уы
	1:1	1:2	1:4	1:80	1:16			
	0	0	0		0			
NaCl изотоникалық ерітіндісі, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4

Типтік спецификалық тұмауға қарсы сарысу 1: 5, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
4 ГАБ титрдегі бөлінген вирус, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	-
Экспозициясы бөлме температурасында 30-40 минут								
Эритроциттердің 1% суспензиясы, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2



189 сурет - ГАТР нәтижесін бағалау. Интернет желісінен алынған.



190 сурет - ГАТР-да бөліп алған тұмау вирусын идентификациялау. Интернет желісінен алынған.

№13 Хаттама

Тұмау вирусын типін анықтауға арналған ГАТР

Күні	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	4 ГАБ титріндегі	1.Зерттеуге жолдама жазу.	

	бөлінген вирус	2. Диагностикалық типтік спецификалық сарысулармен гемагглютинацияны тежеу реакциясының нәтижесін есепке алу демонстрация бойынша). 3. Сүретін салу. 4. Қорытынды толтыру. 3. Талдау нәтижесін бланкіде жазыңыз.	
--	----------------	---	--

Материалдар мен жабдықтар:

Полистиролдан жасалған 48-лункалы планшет, NaCl изотоникалық ерітіндісі, типтік спецификалық тұмау сарысуларының жиынтығы, эритроциттердің 1% суспензиясы, зерттелетін вирус.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 297-299.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- б. 309-314.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, б. 231239.

2.14. Зертханалық жұмыс №14

Тақырып: Аденовирусты инфекциямен сырқат адамның қан сарысуынан комплемент байланыстырушы антиденелерді анықтау.

Мақсат: Аденовирусты инфекцияны диагностикалау үшін қан сарысуынан комплемент байланыстырушы антиденелерді анықтауды үйрену.

Студент білуі тиіс:

1. Аденовирусты инфекцияның микробиологиялық диагностикасын. **Студент жасай алуы тиіс:**

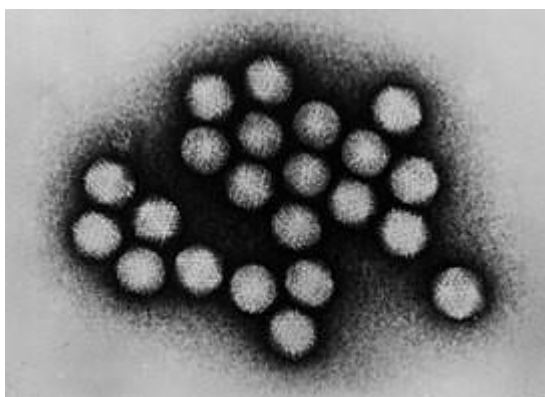
1. Аденовирустық инфекциямен ауыратын науқастың сарысуында комплемент байланыстыратын антиденелерді анықтау
2. Аденовирустық инфекциямен ауыратын науқасқа қан сарысуынан КБР-мен антидене анықтау

Негізгі теориялық ақпараттар

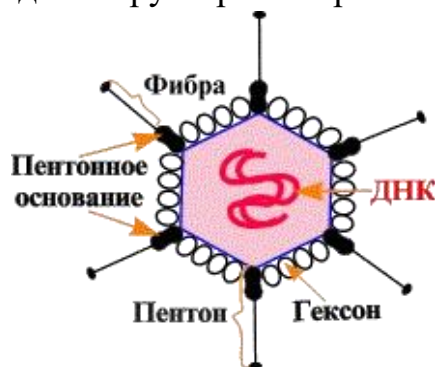
Аденовирустық инфекция – жоғарғы тыныс жолдарының, көздің, ішектің шырышты қабаттарының, сондай-ақ лимфоидты тіндердің зақымдануымен жүретін адамның жедел антропонозды вирустық ауруларының тобы, орташа интоксикациямен бірге жүреді.

Adenoviridae тұқымдасына 4 туыстық кіреді: Mastadenovirus(сүтқоректілер вирустары), Aviadenovirus(құстар вирустары), Atadenovirus(осы тұқым өкілдерінің геномы а-т жұптарымен байытылған)және Siadenovirus(құрамында сиалидаза гені бар). Тек Mastadenovirus тұқымның медициналық маңызы бар. Аденовирустарды алғаш рет 1953 жылы У. Роу және басқалар миндалин тінінен және балалар аденоидтарынан бөлді.. Қазіргі уақытта сүтқоректілердің аденовирустарының 100-ден астам серотиптері белгілі, олардың 49-ы адамдар үшін патогенді. Аденовирустар адамның барлық клиникалық анықталған вирустық инфекцияларының шамамен 8% - ын тудырады (191 сурет).

Құрылымы және көбеюі. Салмағы 150—180мд болатын аденовирустар вирионында липидті қабық жоқ. Капсид 252 капсомерден тұрады және симметрияның икосаэдрлік түріне сәйкес салынған. Геномы ақуыздармен байланысып, вирустың тығыз өзегін құрайтын және құрылымдық және құрылымдық емес вирустық ақуыздарды кодтайтын сызықты екі тізбекті ДНҚдан тұрады (192 сурет). Аденовирустардың репродуктивті циклі зардап шеккен жасушалардың лизисіне немесе жасырын инфекцияға (лимфоидты жасушаларда) әкеледі.



191 сурет – Аденовирустар. Интернет желісінен алынған.



192 сурет - Аденовирус құрылысының схемасы. Интернет желісінен алынған.

Жұмыстың орындалу барысы

1. КБР 2 фазада өтеді:

1) нәтижесінде бос комплемент пайда болған антиген — антиденекешенімен байланысатын антиденелердің, антиген мен комплементтің өзара әрекеттесуі (спецификалық фаза);

2) сезімтал эритроциттер реакциясының индикациясы (спецификалық емес. фаза).

КБР-да 2 жүйе қолданылады: нақты. антиденеден (сыналатын Сарысудан), антигеннен және комплементтен тұратын бактериялық, сондай-ақ спецификалық емес. гемолизині бар" индикаторлық " (гемолитич. Сарысу) және қойдың эритроциттерінің суспензиясы.

Антиген антиденеге комплемент болған кезде ғана қосылады. Егер сынақ сарысуында алынған антигенге гомологиялық антиденелер болса, онда реакция қоспасындағы комплемент пайда болған антиген — антидене кешенімен адсорбцияланады және сезімтал эритроциттерді, яғни комплементсіз гемолизинді (гемолитикалық антидене) лизирлеу қабілетін жоғалтады. эритроциттерді жоймайды (реакция оң) (12 кесте).

12 кесте - Аденовирустық инфекциядағы комплементті байланыстыру реакциясын қою схемасы

Ингредиенттер, мл	1-ші пробирка (бақылау сарысуы)	2-ші пробирка (тәжірибелік)	3-ші пробирка (гемолиттік жүйе)
Науқас сарысуы (1:5)	0,25	0,25	-
Натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі	0,25	-	-
Антиген	-	0,25	-
Комплемент (жұмыс дозасында)	0,25	0,25	-
Үштік титрдегі гемолиттік сарысу	-	-	1,0
3% эритроциттердің қоспасы	-	-	1,0
Термостатқа 37°C 45 минутқа			
Гемолитикалық қоспа (сенсублизацияланған)	0,5	0,5	x
Бақылау сарысуында гемолиздің басталуына байланысты термостатта 40-60 минутқа бақылау сарысуында гемолиз басталғаннан кейін реакция нәтижелерін тіркеу			

Антиген мен антиденелер арасында сынақ сарысуы болмаған жағдайда, туыстық кешен пайда болмайды және комплемент еркін күйде қалады. Гемолиттік жүйелерді қосқан кезде, бұл жағдайда байланыссыз комплемент сенсублизацияланған эритроциттердің гемолизін тудырады (реакция теріс).

2. Зерттелетін сарысу 1:5 сұйылтылып, 2 пробиркаға 0,25 мл құйылады.

3. Бірінші пробиркаға (сарысуды бақылау) 0,25 мл натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісін қосады.

4. Екінші пробиркаға 0,25 мл белгілі антиген құйылады;

5. Екі пробиркаға комплемент қосылады (жұмыс дозасында).

6. 3 пробиркада гемолитикалық жүйе сенсублизацияланады:

гемолитикалық Сарысуға үш титр 1,0 мл-де эритроциттердің 3% суспензиясы 1,0 мл қосылады

7. 37⁰С термостатына 45 минутқа қойыңыз.

8. Науқастың қанында пайда болған АГ кешені реакцияға енгізілгенэкзогендік комплементті адсорбциялайды.

9. Алғашқы екі пробиркаға сезімтал гемолитикалық қоспаны, әрқайсысы0,5 мл қосыңыз.

10. Термостатқа 40-60 минутқа қоямыз, гемолиздің басталуынабайланысты бақылауда гемолиздің басталуынан кейін реакция нәтижелерін тіркейміз

11. Эритроциттердің гемолизі сарысулы бақылауда, яғни біріншіпробиркада міндетті түрде болуы керек.

12. Егер науқастың қанында қоздырғышқа АД болмаса және АГ-АДкомплексі болмаса, еркін комплемент болған кезде олардың гемолитикалық сарысумен өзара әрекеттесуі нәтижесінде қойдың эритроциттерінің гемолизі жүреді.

13.Нәтижелерді бағалау: оң нәтиже болған кезде төрт крест жүйесі бойынша шартты түрде белгіленетін әртүрлі дәрежедегі гемолиздің кідірісі байқалады:

4 + гемолиздің толық кешігуі (күрт оң нәтиже);

3 + оң;

2 + әлсіз оң;

+ - күмәнді;

- - теріс

Хаттама №14

Науқастың сарысуында комплемент байланыстырушы АД анықтау.

Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1. Науқас сарысуы	1. Зерттеуге жолдама жазу 1 кезең: схема бойынша тамшуырдың көмегімен ингредиенттерді 3 пробиркаға салыңыз: тәжірибелі, сарысуды бақылау және гемолитикалық жүйе үшін. Пробиркаларды термостатқа 37 ⁰ С кезінде 45 минутқа қою керек. 2 кезең: гемолитикалық жүйесі бар пробиркадан қалған 2 пробиркаға 0,5 мл-ден енгізу, пробиркалардың ішіндегісін сілкі және термостатқа 37 ⁰ С температурада 40-60 минутқа қою.	

	2. Реакция нәтижесін бағалау, қорытынды жазу.	
--	---	--

Материалдар мен жабдықтар: Науқастың сарысуы, натрий хлоридінің изотоникалық ерітіндісі, аденовирустың антигені, комплемент (жұмыс дозасында), үш титр ішіндегі гемолитикалық сарысу, эритроциттердің 3% қоспасы, пробиркалар, штатив, термостат.

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 181-183.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- б. 236-238.
3. Микробиология бойынша зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Профессор Л. Б. Борисов редакциясымен - Мәскеу "Медицина",-1984, б. 199202.

2.15. Зертханалық жұмыс №15

Тақырыбы: Полиомиелиттің серологиялық диагностикасы үшін бейтараптандыру реакциясы

Мақсаты: полиомиелиттің серологиялық диагностикасы үшін бейтараптандыру реакциясының механизмдерін меңгеру

Студент білуі керек

1. Полиомиелиттің микробиологиялық диагностикасын

Студент жасай білуі тиіс

1. Жұпталған сарысулардағы түсті сынама бойынша бейтараптандыру реакциясының нәтижелерін түсіндіру.
2. Полиомиелитті зерттеуге жолдама жазу және зерттеу нәтижесін бланкеттолтыру.

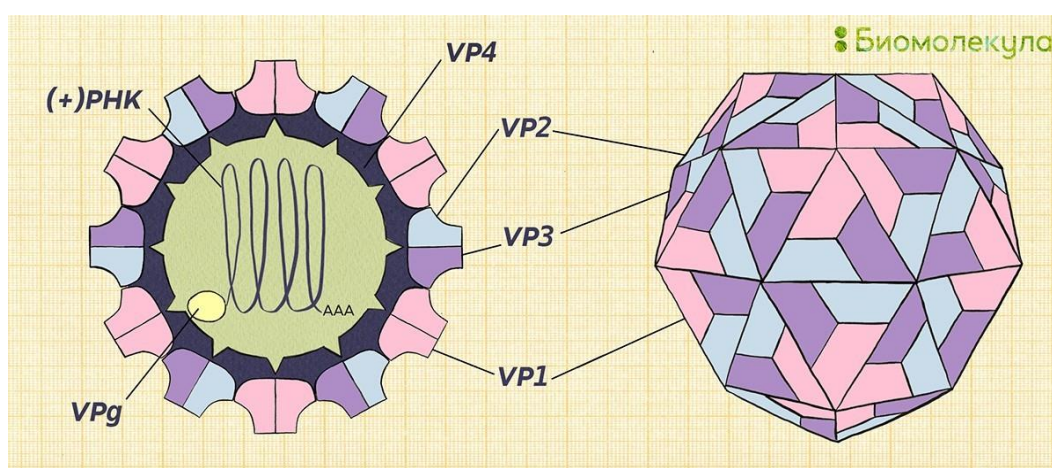
Негізгі теориялық ақпараттар

Полиомиелит-негізінен балаларды зақымдайтын жедел энтеровирустық инфекция, көбінесе симптомсыз өтеді. Клиникалық көріністер әртүрлі-орташа интоксикация және ЖРВИ белгілері бар инфекцияның жеңіл түрінен бастап, орталық жүйке жүйесінің зақымдануымен және аяқ-қол мен кеуденің сал ауруымен немесе менингиальды синдромның басым болуымен сипатталады. Полиомиелит эпидемиялық таралуға қабілетті (194 сурет).

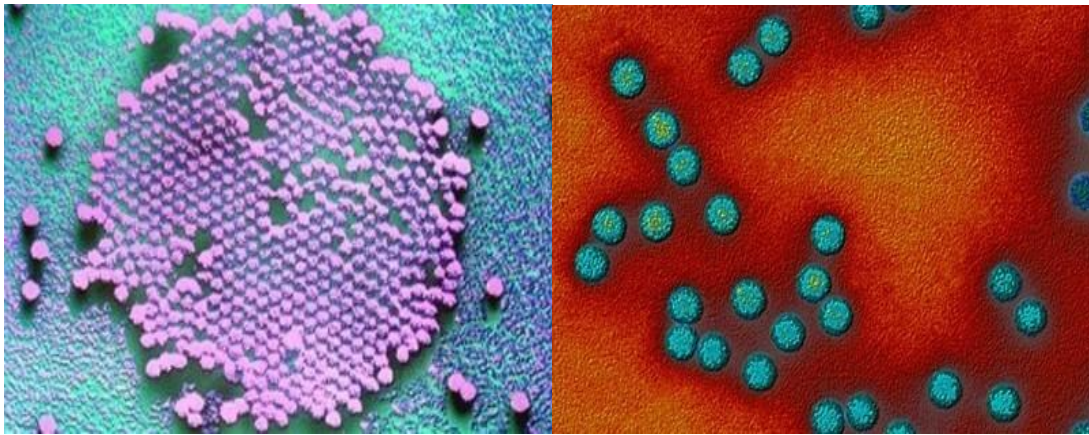
Полиовирустар - **Enterovirus** туыстастығының типтік өкілдері және құрылымы мен биологиялық қасиеттері барлық энтеровирустарға тән.

Бұл кішкентай, жай ұйымдастырылған сфералық вирустар, диаметрі 17-30 нм. Геном инфекциялық белсенділігі бар бір тізбекті плюс-жіпшелі РНҚ-мен ұсынылған. РНҚ-сы куб тәрізді симметриялы бойынша салынған капсидпен қоршалған. Капсид 60 суббірліктен тұрады, олардың әрқайсысы төрт ақуыздан тұрады (193 сурет). Вирустар тауық эмбриондарында өсірілмейді, гемагглютинациялаушы қасиеттерге ие емес, адам тіндері мен приматтардан жасушалардың біріншілік және ауыстырмалы дақылдарында жақсы репродукцияланады. Вирустардың көбеюі цитопатиялық әсермен бірге жүреді. Агар жабыны астындағы жасуша дақылдарында энтеровирустар қатпаршақтар түзеді. Түрдің ішінде үш серотип бар (1, 2, 3), олар айқастық иммунитетті қоздырмайды.

Серотип 1 ең үлкен патогенділікке ие, ол аурудың паралич формаларының көпшілігін (85 %).



193 сурет - Полиомиелит вирусының құрылысы (схемасы). Интернет желісінен алынған.



194 сурет - Полиомиелит вирустары (электрондық микроскопия).
Интернет желісінен алынған.

Зертханалық диагностика

Вирусологиялық және серологиялық әдістер, сондай-ақ ПТР қолданылады. Зерттелетін материал: мұрын-жұтқыншақ бөліндісі, нәжіс, ми жұлын сұйықтығы, секциялық материал (жұлын және ми бөліктері, лимфа түйіндері және т.б.), қан. Полиомиелитке күдік туындаған жағдайда аурудың алғашқы үш күнінде мұрын-жұтқыншақ бөліндісі зерттелуге жатады. Диагноз клиникалық белгілерге, вирустың бөліну фактісіне және оған антиденелер титрінің кем дегенде 4 есе өсуіне байланысты қойылады.






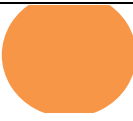
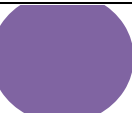
Серологиялық әдіс. Аурудың басында және 3-4 апта аралықпен алынған жұпталған сарысуларды КБР, ИФТ көмегімен зерттейді немесе 1,2 және 3 типті полиовирустық диагностикумдары бар жасуша культурасына БР қояды. Аурудың болуы екінші сарысудағы антидене титрінің біріншісімен салыстырғанда 4 есе және одан да көп артуымен дәлелденеді. Спецификалық сарысулық иммуноглобулиндердің (IgM, IgG, IgA) класын және олардың сандық құрамын анықтау үшін Манчини бойынша радиалды иммунодиффузия әдісі қолданылады.

Полимеразды тізбекті реакция. Бұл жедел әдіс полиовирусты (белгілі бір РНҚ-ны анықтау арқылы) идентификациялауға және вирустың жабайы, патогендік штамдарын вакциналық штамдардан ажыратуға мүмкіндік береді.

Жұмыстың орындалу барысы

Полиомиелит диагнозын растау үшін науқастың жұптасқан сарысуларымен бейтараптандыру реакциясы жасалады.

Бір сарысуды аурудың басында алады және оны t 4-8°С немесе мұздатылған күйде - 20°С кезінде сақтайды, екіншісін ауру басталғаннан кейін 20 күн өткен соң алады. Екі сарысуды да бейтараптандыру реакциясында бір уақытта зерттейді. Ол үшін сарысуды сұйылту 1:4-тен 1:1024-ке дейін дайындалады. Әрбір сұйылтуды I, II және III типті полиовирустың стандартты дозасымен араластырады. Бір сағаттық байланыстан кейін (бөлме температурасында) әр қоспамен жасуша культурасының суспензиясы бар 2 пробирканы жұқтырылып, термостатқа 4-9 күн орналастырылады. Реакция нәтижесі Солктың "түрлі-түсті үлгісін" қолдана отырып бағаланады (195 сурет).

	В питательную среду добавлен индикатор феноловый красный, при нейтральных значениях рН среда имеет красный цвет, при кислых значениях рН – желтый, а при щелочных – малиново-фиолетовый		
 1	 2	 3	Пример: начало исследования - №1 – контроль культуры клеток, №2 – в культуру клеток внесен исследуемый материал от больного А., №3 – в культуру клеток внесен исследуемый материал от больного И.
 1	 2	 3	Результат через 48 часов инкубации

195 сурет - «Түрлі-түсті сынама». Интернет желісінен алынған.

"Түрлі-түсті сынама" индикатор – фенолды қызыл (рН 7,4-7,8) бар жасуша дақылын өсіруге арналған қоректік орта түсінің өзгеруіне негізделген (199 ортасы, Игл және т.б.). Бастапқыда қоректік орта қызыл болады. Егер жасуша дақылы тірі болса, ол өмірлік тіршілік өнімдерді шығарады, қоректік ортаны қышқылдандырады және түс қызылдан сарыға ауысады. Егер вирус жасуша культурасына енгізілсе, ол өледі және түс қызыл болып қалады. Яғни егер зерттелген сарысуда полиовирусқа АД болса, онда вирус инактивацияланады, жасуша дақылы сақталады, түсі сарыға өзгереді - реакция оң болады. Егер антиденелер болмаса немесе сарысудың тым көп сұйылтылуы болса, вирус бос қалады және жасуша дақылын өлтіреді, ортаның түсі қызыл болып қалады реакция теріс. Реакция титрі ортаның түсі сарыға өзгертін зерттелетін сарысудың ең үлкен сұйылтуы болып саналады.

Сероконверсия ауруды дәлелдейді, яғни екінші сарысудағы антиденелер титрінің біріншісімен салыстырғанда жоғарылауы (сероконверсия диагностикалық мәнге 4 есе және одан жоғары).

13 кесте - "Түсті сынама" бойынша бейтараптандыру реакциясын қою схемасы

Ингредиент-тері мл	Зерттелетін сарысудың сұйылтуы					Бақылау	
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Сары- су	Жасуш а дақыл
NaCl изотоникалық ерітіндісі	-	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
Зерттелетін сарысу 1/4	0,25	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25 →	0,25	-
ТЦД50 вирустық диагностикумы (1, 2, 3 т и п т і полиовирустар)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
Бөлме температурасында 60 мин экспозициялау							
Жасуша дақылдары, (жасуша дозасы)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Индикатормен 199 ортасы	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Термостатта 37° С инкубациялау, 7-9 тәулік							

Ескерту: соңғы пробиркадан 0,25 мл дезинфекциялық ерітіндіге құйылады.
ТЦД - тіндік цитопатиялық доза.

Жасуша дозасы-ортаның түсін қызылдан сарыға 5-6 күнге өзгертетін жасушалардың ең аз саны.

Реакцияны бағалау кезінде тек екі тон ескеріледі: қызыл және сары. Ортаның түсінің қызылдан сарыға өзгеруі полиомиелит вирусына АД бар екенін көрсетеді.

№15 Хаттама

Полиомиелиттің серологиялық диагностикасы

Күні	Зерттеуге арналған материал	Зерттеу барысы	Нәтиже

1.	Науқастың жұпталған сарысуы	1. Жолдама жазу 2. Жұпталған сарысулардағы "түсті сынама" бойынша бейтараптандыру реакциясының нәтижесін ескеру (демонстрация бойынша) 2. Реакция нәтижесін интерпретациялау. 3. Сүретін салу. 4. Аурудың серологиялық диагнозын негіздеу 5. Талдау нәтижесін бланкіге жазу.	
----	-----------------------------	---	--

Материалдар мен жабдықтар: жұпталған сарысулар, NaCl изотоникалық ерітіндісі, вирустық диагностикум, жасуша дақылдары, индикаторы бар 199 орта, термостат, стерильді пробиркалар, дозаторлар

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 305-307.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- б. 322-325.

2.16. Зертханалық жұмыс №16

Тақырып: Кене энцефалитін серологиялық диагностикалауға арналған ГАТР

Мақсаты: Кене энцефалитін серологиялық диагностикалау үшін ГАТР механизмі мен түсіндіру принциптерін игеру

Студент білуі керек:

1. Кене энцефалитінің микробиологиялық диагностика әдістерін.

Студент жасай білуі тиіс:

1. Кене энцефалитін диагностикалау үшін жұптасқан сарысулардағы ГАТР нәтижесін түсіндіру
2. Кене энцефалитін зерттеудің жолдамасы мен нәтижесін жазу.

Негізгі теориялық ақпараттар

Кене энцефалиті (көктемгі-жазғы кене энцефалиті) - ОЖЖ басым зақымдануымен табиғи-ошақтық трансмиссивті жіті вирустық инфекция; ол клиникалық көріністердің полиморфизмімен және ағымның ауырлығымен (жеңіл, өшірілген нысандардан ауыр, прогредиентке дейін) ерекшеленеді.

Таксономиясы жағдайы. Кене энцефалиті вирусы Flaviviridae тұқымдасына, Flavivirus туысына жатады.

Кене энцефалитінің вирустары 3 түр астына (генотипке) бөлінеді:

- Қиыр Шығыс түр асты (негізгі тасымалдаушы – ixodespersulcatus кенесі);
- Шығыс Сібір немесе Орал-Сібір түр асты (негізгі тасымалдаушы – кенеIxodespersulcatus);
- Еуропалық немесе батыс түр асты (негізгі тасымалдаушы – ixodesricinusкенесі) (231 сурет).

Кене энцефалиті вирусы арбовирустардың экологиялық тобының типтік өкілі болып табылады, яғни артроподтардың шағуы арқылы беріледі (ағылшын. **arthropod – borne viruses**, яғни буынаяқтылардың шағуы арқылы жұғады).

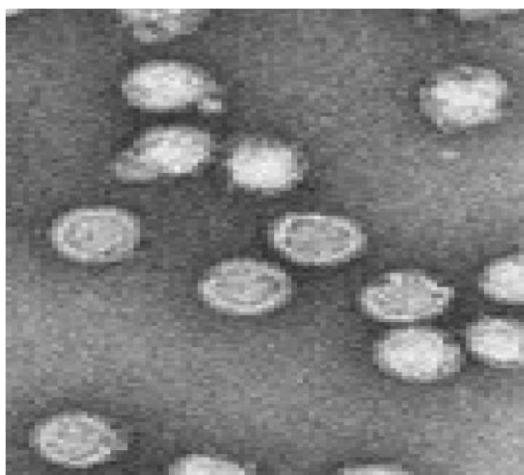
Морфологиялық белгілері. Кене энцефалитінің вирусы сфералық формаға ие. Вириондардың диаметрі 40-60 нм құрайды (196 сурет).

Кене энцефалиті вирусының **геномы** бір тізбекті плюс-РНҚ молекуласымен ұсынылған. Геном симметрияның кубтық түріне ие ақуыз капсидіне енеді (сурет 228). Нуклеокапсидтің пішіні - жиырма бұрышты. Нуклеокапсидтің құрамына С-ақуызы кіреді, сыртқы жағынан нуклеокапсид суперкапсидпен жабылған, ол липидті мембранадан және оған шамамен 10 нм гликопротеин шыбықтарынан тұрады. Гликопротеин омыртқаларында Е-ақуыз бар және гемагглютинациялық қасиеттері бар. Суперкапсидке М-ақуызы да енеді. Е ақуызы вирустық бөлшекті жасуша мембранасымен байланыстыруға және вирустық және жасушалық мембраналардың бірігуіне қатысады. Вирустық бөлшектердің бетінде Е ақуызы димермен ұсынылған (екі молекуладан тұрады). Бұл жағдайда әр димер молекуласы үш доменнен тұрады.

Кене энцефалиті вирусының геномында құрылымдық ақуыздардан басқа, NS1 – NS5 құрылымдық емес ақуыздар және вирус жұқтырған жасушада вирустың көбеюіне қатысатын вирустық РНҚ полимераза да кодталады.



196 сурет – Кене энцефалитінің вирусының құрылымы. Интернет желісінен алынған.



197 сурет – Кене энцефалитінің вирусы. Интернет желісінен алынған.

Зертханалық диагностика. Зерттелетін материал ретінде қан, науқастардың ми сұйықтығы, қайтыс болған адамдардың миы, иксод кенелері қолданылады. Кенелерде вирустық антигеннің бар – жоғын зерттеу иммуноферменттік талдау әдісімен, ал вирустық РНҚ-ның бар-жоғын ПТР әдісімен жүргізіледі.

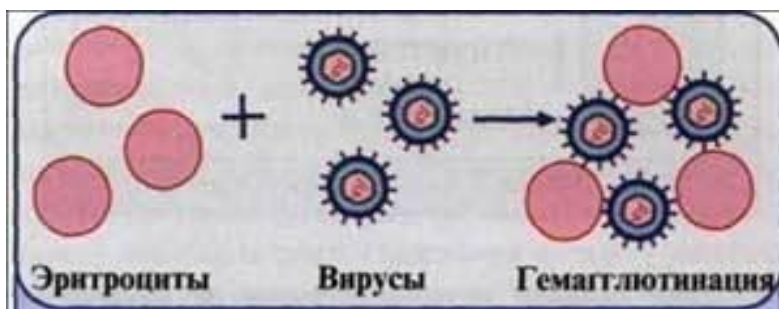
КЭ зертханалық диагностикасы аурудың өткір сатысында патогенді анықтауға, реконвалесценттерде арнайы антиденелер титрінің өсуін анықтауға, сондай-ақ инфекцияның табиғи ошақтарында ұсталған қан соратын буынаяқтылар мен олардың қоректендіргіштерінен вирустың бөлінуіне негізделген.

Серологиялық диагностика. ЭК диагностикалау үшін пайдаланылатын негізгі серологиялық әдістер - КБР, ГАТР, БР, сондай - ақ жедел диагностикалау әдістері-РИФ, ИФТ, ЖГАР, тікелей емес гемагглютинацияны тежеу реакциясы (ГАТР) (199 сурет).

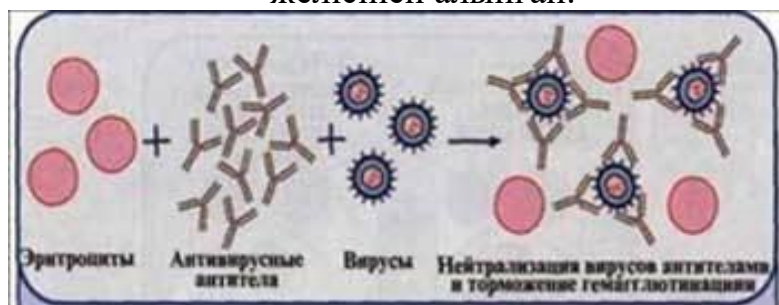
Гемагглютинацияны тежеу реакциясы (ГАТР).

Вирус бар препараттарға иммундық қан сарысуының қатысуымен эритроциттер агглютинациясының болмау феноменіне негізделген пациенттің қан сарысуындағы вирусты сәйкестендіру немесе вирусқа қарсы антиденелерді анықтау әдісі. ГАТР иммундық Сарысудың антиденелерімен вирустардың антигендерін басуға, блокадаға негізделген, нәтижесінде вирустар қызыл қан клеткаларын агглютинациялау қасиетін жоғалтады (198 сурет).

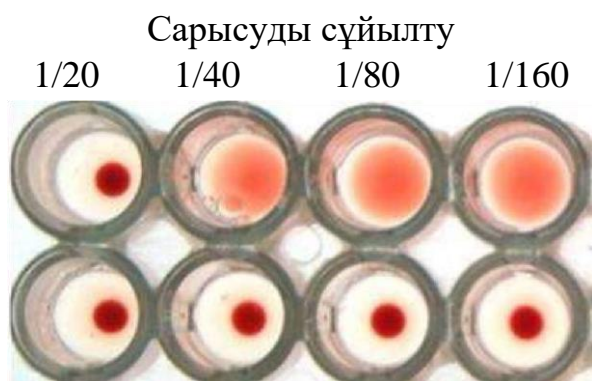
Гемагглютинацияның тежелу реакциясы вирустардың антигендерінің (гликопротеин тікенектерінің – гемагглютининдердің) иммундық сарысудың антиденелерімен қоршалуымен көрінеді, нәтижесінде вирустар қызыл қан клеткаларын агглютинациялау қасиетін жоғалтады. Сарысулар, егер олар гемагглютинацияны 1:10 және одан жоғары сұйылтуда басса, оң деп саналады. Екі рет сарысуды сұйылту құрамында 8 АЕ Аг бар антигеннің тұрақты дозасымен өзара әрекеттеседі. Сарысу титрі 8 АЕ Аг-мен гемагглютинацияның кідірісін шақылатын тудыратын ең жоғары сұйылту болып саналады (200 сурет).



198 сурет - Вирустық гемагглютинация реакциясының механизмі. Интернет желісінен алынған.



199 сурет - Гемагглютинацияны тежеу реакциясының механизмі. Интернет желісінен алынған.



200 сурет - Жұп сарысумен ГАТР. Интернет желісінен алынған.

ГАТР-да анықталған КЭ вирусына қарсы гемагглютининдер жедел инфекция кезінде аурудың 1-ші аптасында науқастардың сарысуында пайда болады, реконвалесценцияның 5-6-шы аптасында максималды титрлерге дейін артады. Антигемагглютининдердің жоғары титрлері реконвалесценттерде 6-8 ай бойы байқалады. Келесі 2 жылда антиденелер әдетте сақталады, біртіндеп титрлерде төмендейді.

Жұмыстың орындалу барысы

1. Ілеспе құжатта әрбір науқас туралы паспорттық деректермен қатар (Тегі, Аты, Әкесінің аты, жасы, кәсібі, тұрғылықты жері) кене шабуылының нақты қай жерде болғанын (аудан, ауыл), сондай-ақ аурудың басталу және материалды алу күнін көрсету керек.

2. Серодиагностика үшін қан сарысуының жұптасқан сынамалары қажет. Біріншісі аурудың бірінші аптасында, екіншісі - біріншісінен 10-15 күн

өткен соң алынады. Субакутты немесе созылмалы процесс кезінде Сарысудың тағы бір сынағы 1-2 айдан кейін алынады.

3. РТГА-да екі рет сарысуды сұйылту тұрақты антиген дозасымен құрамында 8 ГАЕ антигені бар сұйылтумен өзара әрекеттеседі. Реакцияны 4 тамшы көлемінде қояды: антиген мен Сарысудың 1 тамшысынан және фосфат буферіндегі эритроциттердің 0,4% суспензиясының 2 тамшысынан. Реакция екі кезеңде жүреді:

* біріншісі-сарысулар мен антигендердің қосылуы және олардың 4 °С температурада 18-20 сағат бойы жанасуы;

* екіншісі-қызыл қан клеткаларын қосу, экспозиция 20-40 минут және нәтижелерді есепке алу.

Сарысудың титрі 8 ГАЕ антигенімен гемагглютинацияның кешеуілдеуін тудыратын ең жоғары сұйылту болып саналады. Сарысулар, егер олар гемагглютинацияны 1:10 және одан жоғары сұйылтуды басса, оң деп саналады.

Хаттама №16

Кене энцефалитінің серологиялық диагностикасы

Күні	Зерттеу материалы	Зерттеу барысы	Нәтиже
1.	Науқастың жұп сывороткасы	1. Зерттеуге жолдама жазу 2. Жұпталған сарысулардағы гемагглютинацияны тежеу реакциясының нәтижесін ескеру (көрсету бойынша) 3. Суретін салу 4. Аурудың серологиялық диагнозын негіздеумен қорытынды жасаңыз. 5. Зерттеу нәтижесін жазу.	

Әдебиеттер:

1. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық жұмыстарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы // профессор В.Б. Сбойчаковтың редакциясымен, доцент м. м. Карапац, - ГЭОТАР-Медиа, - 2012,- б. 181-183.
2. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Ресей ғылым академиясының академигі РАН В.В.Зверев және проф. М.Н.Бойченко редакциясымен, - ГЭОТАР-Медиа, - 2015,- б. 256-260.

Қорытынды

Осылайша, микробтық этиология ауруларын микробиологиялық диагностикалау үшін келесі әдістер қолданылады:

1. Микроскопиялық әдіс ең жылдам, қарапайым және қол жетімді, бірақ кемшіліктері де жоқ емес: төмен сезімталдық пен ақпараттылық. Дегенмен, ол микоздарды, протозойлық және кейбір бактериялық инфекцияларды өздігінен диагностикалау үшін кеңінен қолданылады, басқа жағдайларда - басқа әдістермен бірге.

2. Дақылдық (бактериологиялық, вирусологиялық, микологиялық, протозоологиялық) – өсірілмейтін қоздырғыштарды қоспағанда, жұқпалы ауруларды диагностикалаудың негізгі әдісі.

3. Биологиялық әдіс (биопробалар) - зерттелетін материалмен сезімтал жануарларды жұқтырудан, содан кейін қоздырғыштың таза дақылын бөліп алудан және анықтаудан тұрады. Токсиндердің болуын және олардың түрін анықтау, патогендік факторларды анықтау және қоздырғыштың вируленттілігін бағалау үшін қолданылады.

4. Серологиялық әдіс науқастардан, ауырып тұрған, вакцина алған адамдардың қанындағы немесе басқа материалдағы антиденелерді анықтау үшін серологиялық реакцияларды қолданудан тұрады. Қазіргі уақытта бактериялық және вирустық инфекцияларды диагностикалау үшін иммундық-ферменттік талдау (ИФА), иммуноблотинг кеңінен қолданылады.

5. Аллергологиялық әдіс тері сынақтары арқылы микробтық, сондай-ақ микробтық емес антигендерге (аллергендерге) жоғары сезімталдықты анықтаудан тұрады. Әдістің артықшылығы-нәтижелерді алу жылдамдығы, ЖСЖТ кезінде ерте әдіс, десенсбилизациялық терапия жүргізу мүмкіндігі. Кемшіліктері-ЖСБТ кезінде кеш әдіс, асқыну қаупі (in vivo).

6. Молекулалық-генетикалық әдіс ПТР, масс-спектрометрия, ДНҚ будандастыру және молекулалық биологияның басқа әдістері арқылы нуклеотидтер тізбегін анықтау арқылы зерттеу материалынан қоздырғышты анықтау және идентификациялаудан тұрады.

Қолданыстағы әдістермен қатар, қоздырғыштарды идентификациялау үшін жаңа тиімді технологиялар және олардың антибиотикке сезімталдығын қысқа мерзімде анықтаудың әдістерін әзірлеу жалғасуда (экспресс-әдістер).

Медицинаның тағы бір проблемасы-патогендік және сапрофитті микроорганизмдердің соңғы уақытта жеделдетілген эволюциясы, бұл жаңа аурулардың пайда болуына және ескі жұқпалы аурулардың оралуына әкеледі. Созылмалы, аралас, ауруханаішілік инфекциялардың саны өсті, жұқпалы аурулардың ауқымы кеңейді. Мұның бәрі бүгінгі студенттер үшін ертең сауатты дәрігер болу үшін медициналық микробиология, вирусология, иммунология негіздерін зерттеуді өзекті етеді.

Авторлар оқырмандарға оқуда және медицинаның кез-келген саласында жоғары білікті маман болуға ұмтылуда сәттілік тілейді!

Қолданылған әдебиеттер тізімі

1. Жалпы микробиология бойынша практикалық дағдылар мен дағдыларды игеруге арналған нұсқаулық: Оқу құралы/ Б. В. Засорин, Б. С. Урекешов, С. Ж. Мұсабаева.- Ақтөбе, 2017.- 65б.

2. Медициналық микробиология, вирусология және иммунология бойынша Атлас: атлас/ ред.: Быков А.С., Воробьев а. а., Зверев В. В. - 2-ші басылым., қосымша-М.: Бал. ақпарат. агенттік, 2008. 272 б.: ил.
3. Клиникалық микробиология: клиникалық зертханалық диагностика мамандарына арналған нұсқаулық/ Э. Г. А. Донецк, – М.: ГЭОТАР -Медиа, 2011. -480с.
4. Микробиология, вирусология және иммунология негіздері: оқу құралы/ К. С.Камышева. - 2-ші басылым. – Ростов н / Д: Феникс, 2009, 2012. – 281 б.
5. Микробиология, вирусология және иммунология: зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық: Оқу құралы / ред.: В.Б. Сбойчаков, М.М. Карапац. М.:ГЭОТАР -Медиа, 2012. -320 б.
6. Клиникалық микробиологияға кіріспе: оқу құралы/ Л. А. Омарова. - Астана: АҚНҰР, 2017. -314 Б.
7. Жалпы микробиология: оқу - әдістемелік құрал/ Б. К. Рахимжанова, Ы. О.Кайрханова. -Алматы: ССК, 2018. -76 б.
8. Микробиология, вирусология және иммунология, зертханалық сабақтарға арналған нұсқаулық. Оқу құралы / / редакциялаған профессор В.Б. Сбойчаков, доцент М.М. Карапац, - ГЕОТАР-Медиа, - 2012,- б. 181-183.
9. Микробиология, вирусология. Практикалық сабақтарға нұсқаулық. акадөндеген. РАН В.В. Зверева және проф. М.Н. Бойченко, - ГЕОТАР-Медиа, 2015, - 256-260 б.б.
10. Жалпы микробиология және жалпы санитарлық микробиология: оқу құралы/2-ші басылым. Сахарова О.В., Сахарова Т. Г. Санкт-Петербург: ООО «Лань баспасы», 2022. – 224б.
11. Жұқпалы аурулардың зертханалық диагностикасы: оқу құралы 3-ші басылым. / Госманов Р.Г., Равилов Р.Х., Галиуллин А. К., Нұрғалиев Ф.М., Идирисов Г. Г.: - Санкт-Петербург. Лань баспасы, 2021. – 196 б.
12. Микробиологиялық зерттеу техникасы бар жалпы және санитарлық микробиология: Оқу құралы 5-ші басылым. стер ./А.С. Лабинская - СПб.: Лань, 2021. – 588б.
13. Микробиология бойынша практикум: Оқу құралы/О.В. Казимирченко, М.Ю. Котлярчук, СПб. Лань, 2020. – 124б.
14. Микробиология: теория және практика 2 бөлімнен. 1-бөлім: бакалавриат пен магистратураға арналған оқулық/А. И. Нетрусов, И. Б. Котов. Мәскеу: Юрайт баспасы, 2019. - 315 б.
15. Жеке микробиология: оқу құралы. 1-ші бөлім. Медициналық бактериология / Ғ. Т. Алимжанова [и др.]. - Алматы : CyberSmith, 2017. 380 б.
16. Микробиология және иммунология жөніндегі нұсқау: оқу құралы/ Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко [және т.б.]. - 2-ші шығарылым. - М.: ИНФРА-М, 2017. - 230 б.
17. Микробиология: Оқулық/Кисленко В. Н. Азаев Мамедьяр Шакир ұлы Москва: Баспа: ИНФРА-М, 2017. - 270, [1] б.
18. Микробиология және иммунология негіздері: Оқу құралы/Бір томдық. Камышева К. С., - Ростов-на-Дону: Баспа: Феникс, 2015. - 381, [1] с.

- 19.Микробиология: оқулық/Ред. В.В.Зверев, - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 384 б.
- 20.Микробиология: Оқу құралы/С.А. Беляев. - СПб.: Лань П, 2016. - 496 б.
- 21.Жеке микробиология: Оқу құралы/Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова. - М. РУДН, 2016. - 222 б.
- 22.Санитарлық микробиология: Оқу құралы/Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова. - СПб.: Лань, 2018. - 260 б.
- 23.Микробиология: Оқу құралы/Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин және т.б. СПб.: Лань, 2019. - 496 б.
- 24.Микробиологиялық зерттеу техникасымен жалпы және санитарлық микробиология: Оқу құралы/М.А. Дейша-Сионицкая. - СПб.: Лань, 2016. - 588 б.
- 25.Микробиология: Бакалаврларға арналған оқулық/В.Т. Емцев. Әуесқойлар: Юрайт, 2016. - 445 б.
- 26.Жалпы микробиология. 1-бөлім. 2 томдық. Ветеринариялық микробиология және иммунология Оқулық/В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. - М.: Инфра-М, 2017. - 624 б.
- 27.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария және гигиена: 2бөлім, Ч. Корольев, А.А., - М. Академия, 2018. - 288 б.
- 28.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария және гигиена. Оқулық/А.А. Королев, Ю.В. Несвижский, Е.И. Никитенко. - М.: Academia, 2017. - 640 б.
- 29.Микробиологиялық зерттеу техникасы бар жеке медициналық микробиология: Оқу құралы/А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина және т.б. - СПб: Лань, 2017. - 624 б.
- 30.Медициналық микробиология және иммунология/У. Левинсон. - М.: Бином, 2015. - 1181 с.
- 31.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария және гигиена, Оқулық/А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2016. - 480 б.
- 32.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария және гигиена: 2 бөлім. 2: Оқулық/А.Н. Мартинчик. - М.: Академия, 2016. - 192 б.
- 33.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария, Оқулық/А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2017. - 480 б.
- 34.Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария, Оқулық/А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2018. - 399 б.
- 35.Микробиология: Оқулық/А.И. Нетрусов. - М.: Academia, 2016. - 416 б.
36. Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария: Оқулық/Е.А.Рубина, В.Ф. Малыгина. - М.: Форум, 2019. - 320 б.
37. Микробиология, тамақтану физиологиясы, санитария: Оқулық/Е.А.Рубина, В.Ф. Малыгина. - М.: Форум, 2018. - 248 б.
38. Микробиология, вирусология және/О Рыбальченко. - СПб: Арнайы лит,2018. - 81 б.

39. Микробиология, эпидемиология негіздері және микробиологиялық зерттеу әдістері/В.Б. Сбойчаков. - СПб: Арнайы лит, 2017. - 608 б.
40. Оқулық/О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Вой. - М.: Инфра-М, 2017. - 29 б.