

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2013

В.М. Благодатний, І.І. Касьяненко, М.І. Комасько,
Л.Г. Мороз

НОВІ ПІДХОДИ В ТЕХНІЦІ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика

Вступ. 20 років потому в 1990 році Хельсінський конгрес поділив методи мікробіологічних досліджень на 3 покоління. Ми започаткували IV покоління мікробіологічних методів: ІТ-технології (інформаційні технології) і новітні методи обробки діагностичного мікробіологічного матеріалу.

Мета. Розробка апарату (пристрою) для посіву мікроорганізмів на щільні поживні середовища.

Методи. Мікробіологічні, конструювання.

Результати. Сконструйований апарат АПМ 1 (пристрій), що забезпечує посів будь-якого мікробіологічного матеріалу на щільні поживні середовища при проведенні як окремих мікробіологічних досліджень, так і моніторингу системних порушень мікробіоценозів різних біотопів людини.

Висновки. Нова техніка мікробіологічних досліджень дозволяє якісно, стандартизовано, робити посів і отримувати ізольовані колонії принаймні тоді, коли досліджуваний матеріал містить мікроорганізми у великій кількості.

Ключові слова: техніка, мікробіологічні дослідження, пристрій, посів.

ВСТУП

20 років потому в 1990 році Хельсінський конгрес поділив методи мікробіологічних досліджень на 3 покоління.

I покоління — становили звичайні традиційні методи, такі як виділення чистої культури мікроорганізму, світлова і люмінесцентна мікроскопія (МФА), реакції аглютинації (РА), преципітації (РП), зв'язування комплементу (РСК), гемаглютинації (РГА), пасивної гемаглютинації (РПГА) та інш. [1,2,3].

II покоління — становили радіоімунний аналіз (РІА), імуноелектронно-мікроскопічний метод (ІЕМ), імуноферментний аналіз (ІФА), методи першого покоління, але з використанням моноклональних антитіл, тест-систем із машинною обробкою результатів, мультисистеми (баканалізатори) і таке інше.

III покоління — становили методи гібридизації нуклеїнових кислот (генетичних зондів), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) або метод ампліфікації генів, імуносенсорний і імунохроматографічний методи.

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

Ми започаткували IV покоління мікробіологічних методів: ІТ-технології (інформаційні технології) в мікробіології і новітні методи обробки діагностичного мікробіологічного матеріалу.

Мета роботи – розробка апарату для посіву мікроорганізмів на щільні поживні середовища.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ



Минуло 130 років, коли Луї Пастер (1822–1895) запропонував готувати ряд послідовних розведень випорожнень людини для посіву на поживне середовище з метою дослідження мікроорганізмів що там перебувають.

Нові підходи на той час стосувались того, що б понизити кількість мікроорганізмів, крапля засівного матеріалу вноситься в колбу або пробірку і так робиться 8-10 розведень. З наступним розведенням кількість мікробних клітин зменшується.

Потім Роберт Кох (1843–1910) запропонував вносити посівний матеріал в пробірки з МПЖ (желатин) або МПА при 40–45°C. Далі посівний матеріал переміщують бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою в іншу пробірку, рівномірно розмішують, обертаючи пробірку між долонями, краплю розведеного матеріалу із першої пробірки переносять в другу, із другої в третю і т. ін. Вміст кожної пробірки виливають в стерильні чашки Петрі. Таким чином кожна мікробна клітина розмножується тільки в тому місці, куди була внесена спочатку, і утворює видиме неозброєним оком скупчення мікроорганізмів (колонію), які відсівають на МПБ або зкошений МПА для отримання чистої культури.



Метод Дрігальського (метод фракційного засіва), заснований на механічному роз'єднуванні мікробних клітин одне від одної на поверхні щільного поживного середовища. Кожна мікробна клітина, фіксуючись в місці, де вона опинилась, починає розмножуватись і через 1-2 доби створює колонію. Використовують декілька чашек Петрі (зазвичай 3 чашки) із залитим у них щільним поживним середовищем (наприклад, МПА). На поверхню застиглого середовища в першу чашку вносять краплю матеріалу, що вміщує мікроорганізми. Потім за допомогою скляного або металевого шпателя чи бактеріологічної петлі краплю розтирають по всій поверхні агара після чого цим же шпателем (не обпалюючи його!) втирають по поверхні середовища в другій і в третій чашках. В процесі розтирання мікробні клітини відокремлюються одна від одної. Із ізольованих колоній виділяють чисту культуру.

Для одержання ізольованих колоній мікроорганізмів посів матеріалу також роблять ретельно, втираючи його тампоном, спочатку на периферії поживного середовища КУА у вигляді 4-5 бляшок, а потім Z-подібним штрихом у центрі чашки (рис. 1).



Рис. 1. посів матеріалу ізольованих колоній (а)

Широке розповсюдження отримав метод секторного засіву (або за Гоулдом, 1965, рис. 2), його модифікація (рис.3) [3].

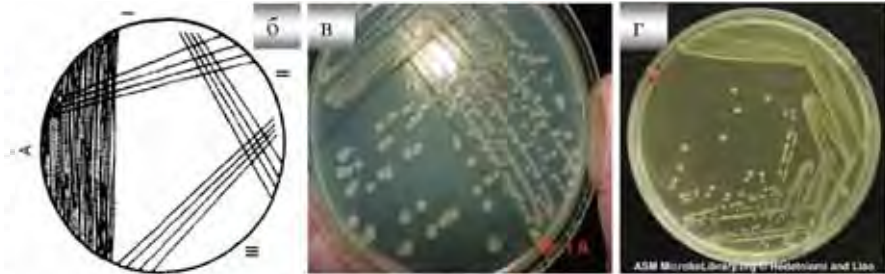


Рис. 2. Метод секторного засіву матеріалу (або за Гоулдом, 1965) (б, в, г)

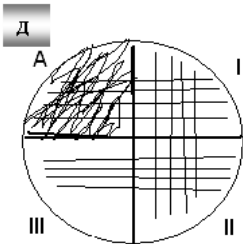


Рис. 3. Модифікація методу секторного засіву (д)

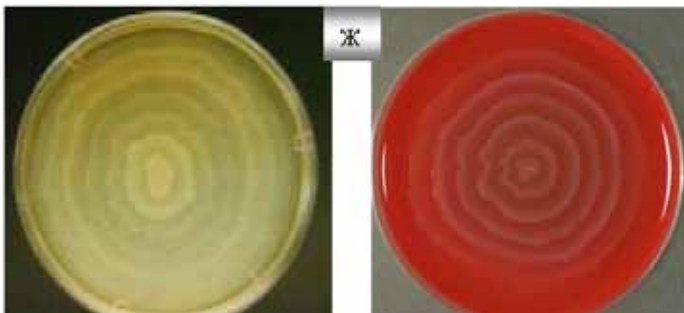


Рис. 4. Інші види посіву для визначення особливих якостей рухливих мікроорганізмів — роїння протей *P.тyхофасієns* (ж)
Зб. наук. праць співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика 22 (3)/2013

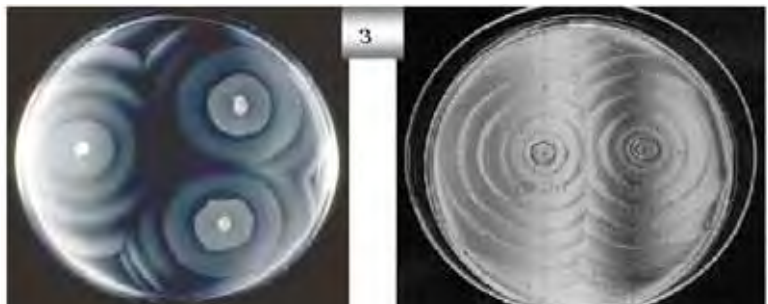


Рис. 5. Феномен Дінеса (Dienes) (з)

Інші види посіву для визначення особливих якостей рухливих мікроорганізмів — роїння протей *P.тyхоfасіеns* (рис. 4) або в практичних умовах для визначення ідентичності Н –антигенів (Н-АГ) використовують феномен Дінеса (Dienes), коли культури, що засіяні в різних частинах чашки дають злиття між собою зон роїння, якщо мають ідентичні Н-АГ (рис. 5).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наявні техніки мікробіологічних досліджень, які майже століття не змінювались мають певні вади, недоліки, трудові витрати, не функціональні і не сучасні, тобто не відповідають сучасному рівню поступу науки.

Перший варіант сконструйованого апарату (пристрою) відображений на рисунку 6. На ньому були відпрацьовані основні принципи посіву мікроорганізмів на щільні поживні середовища, на чашках що обертаються.

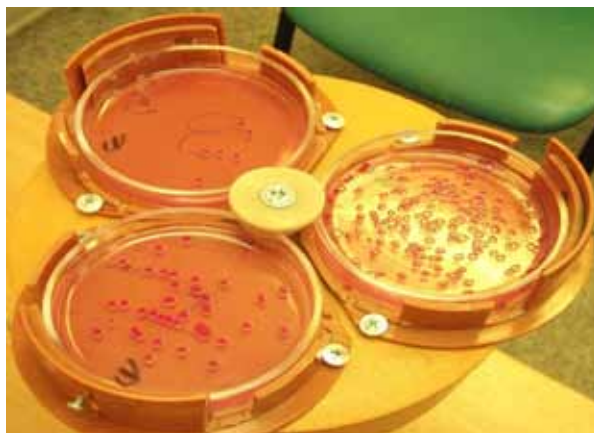


Рис. 6. Пристрій для посіву мікроорганізмів на чашки з поживним середовищем, що обертаються

Надалі конструкторська проработка пристрою привела до створення промислового зразку – апарату АПМ 1 (рис. 7), який реалізує сучасні вимоги щодо техніки мікробіологічних досліджень. Посів на чашку з поживним середовищем, що

обертається дає нові переваги перед застарілими техніками минулого, водночас при збереженні вже наявного інструментарію (петля, тампон, шпатель) (рис.8).

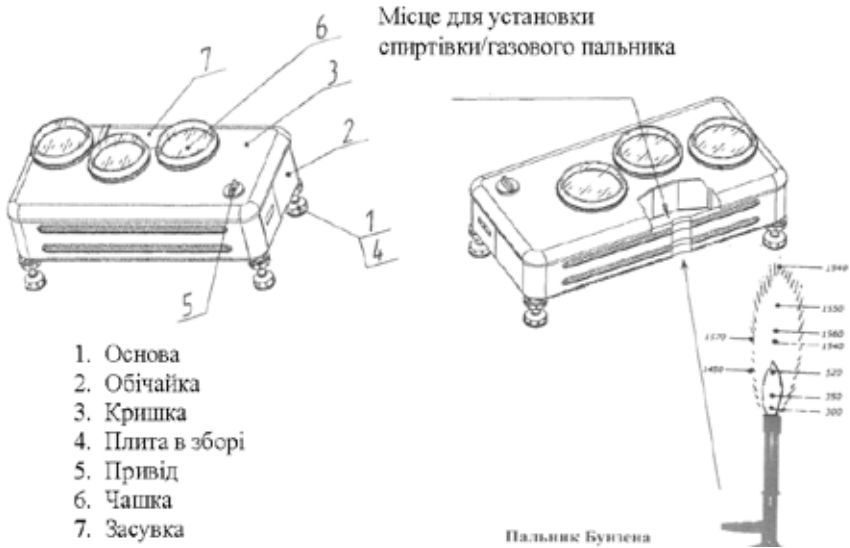


Рис. 7. Апарат для посіву мікроорганізмів АПМ 1



Рис. 8. Результати посіву мікроорганізмів, отриманих за допомогою нової техніки мікробіологічних досліджень

ВИСНОВКИ

Нова техніка мікробіологічних досліджень дозволяє якісно, стандартизовано робити посів і отримувати ізольовані колонії принаймні тоді, коли досліджуваний матеріал містить мікроорганізми у великій кількості.

Література

1. Медицинская микробиология. Под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. М.: ГЭОТАР-МЕД. 2002.

2. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. М.: изд-во БИНОМ. 2008, I.

3. Шелкова Н.Г., Прокопеч В.П. Метод кількісного дослідження вмісту бактерій у клінічних матеріалах, що відібрані за допомогою ватного тампону. Зб. наук. праць співроб. НМАПО імені П.Л.Шупика. Київ. 2008, 17 (2): 698-702.

В.Н. Благодатный, И.И. Касьяненко, Н.И. Комасько,
Л.Г. Мороз

Новые подходы к технике микробиологических исследований

Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л.Шупика

Вступление. 20 лет назад в 1990 году Хельсинки конгресс разделил методы микробиологических исследований на 3 поколения. Мы создали IV поколение микробиологических методов: ИТ-технологии (информационные технологии) и новые методы обработки диагностического микробиологического материала.

Цель. Разработка аппарата (устройства) для посева микроорганизмов на плотные питательные среды.

Методы. Микробиологические, конструирования.

Результаты. Сконструирован аппарат АПМ 1 (устройство), который обеспечивает микробиологический посев любого материала на плотные питательные среды при проведении как отдельных микробиологических исследований, так и при мониторинге системных нарушений микробиоценоза человека.

Выводы. Новая техника микробиологических исследований позволяет качественно, стандартизовано проводить микробиологический посев и получать изолированные колонии даже при высокой степени обсеменения материала.

Ключевые слова: техника, микробиологические исследования, устройства, посев.

V.M. Blagodatnyi, I.I. Kas'ianenko, M.I. Komas'ko, L.H. Moroz

New approaches to microbiological researches technics

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Introduction. 20 years ago in 1990 Helsinki Congress had divided the methods of microbiological researches into 3 generations. We founded fourth generation of microbiological methods: information technologies (IT) and modern processing methods of diagnostic microbiological material.

Aim. To develop the apparatus (device) for inoculation of microorganisms of dense medium.

Methods. The microbiological and design methods were used in the research.

Results. The designed apparatus APM 1 (device) provides the inoculation of any microbiological material of dense medium within the conduction of separate microbiological researches and the monitoring of microbiocenosis systematic disorders of different biotypes of human.

Conclusion. The new technique of microbiological researches allows qualitatively and standardized to spend microbiological inoculation and to get the isolated colonies even when the investigated material containing microorganisms in large quantities.

Key words: technique, microbiological researches, devices.