

**ГОУ ВПО МАЙКОПСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ**

**Руководство
к практическим занятиям
по частной микробиологии
(УЧЕБНО- МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ)**

Н.С.ХИШТОВА

Майкоп

2010

**ГОУ ВПО МАЙКОПСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ**

**Руководство
к практическим занятиям
по частной микробиологии
(учебно – методическое пособие)**

Н.С.Хиштова

УДК 579.61 (075. 8)

ББК 52. 64 я 73

X 53

*Утверждено на совместном заседании учебно- методического совета
медицинского института ГОУ ВПО «Майкопский государственный
технологический университет» и Минздравсоцразвития РА
(протокол № 4 от 14 октября 2010 гда)*

р е ц е н з е н т ы : **Лысенков С.П.,** д.м.н., профессор, директор медицинского
института Майкопского государственного технологического
университета.

Хиштова Н.С.

Руководство к практическим занятиям по частной микробиологии: Учебное пособие /
Н.С. Хиштова. - Майкоп: ОАО «Полиграф-Юг» «Адыгея», 2010.- 69 с.

Руководство рекомендуется для подготовки к практическим занятиям студентов
медицинских вузов. Изложены современные методы изучения морфологии, физиологии и
экологии микроорганизмов, рассмотрены методы прикладной иммунологии. Представлены
методы лабораторной диагностики важнейших инфекционных болезней человека, а также
заболеваний, вызываемых условно- патогенными микроорганизмами.

Руководство предназначено для студентов медицинских вузов.

УДК 579.61 (075. 8)

ББК 52. 64 я 73

Содержание:

Список сокращений	5
1. Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций	6
2. Стрептококки, пневмококки, менингококки	9
2.1. Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций	9
2.2. Микробиологическая диагностика менингококковой инфекции	12
3. Микробиологический метод диагностики анаэробных инфекций	14
3.1. Бактериологический метод диагностики газовой гангрены	14
3.2. Бактериологический метод диагностики ботулизма	16
3.3. Бактериологический метод диагностики столбняка	18
4. Микробиологическая диагностика ГВЗ и ГСЗ, вызванных Гр (-) бактериями	20
4.1. Бактериологический метод диагностики протей	20
4.2. Бактериологический метод диагностики синегнойной инфекции	21
4.3. Бактериологический метод диагностики клебсиеллез	23
4.4. Бактериологический метод диагностики эшерихиозов	24
5. Микробиологическая диагностика заболеваний, передающихся половым путем	26
5.1. Микробиологический метод диагностики гонореи	26
5.2. Микробиологический метод диагностики сифилиса	28
6. Итоговое занятие по теме «Кокковые и анаэробные инфекции, ГВЗ»	
7. Микробиологический метод диагностики диареегенных эшерихий	30
8.1. Микробиологический метод диагностики дизентерии	32
8.2. Микробиологический метод диагностики кишечных иерсиниозов	34
9. Микробиологический метод диагностики сальмонеллез	36
10.1. Микробиологический метод диагностики холеры	44
10.2. Микробиологический метод диагностики хеликобактериоза	47
10.3. Микробиологический метод диагностики кампилобактериоза	48
11. Итоговое занятие по теме «Кишечные инфекции»	
12.1. Микробиологический метод диагностики дифтерии	49
12.2. Микробиологический метод диагностики коклюша и паракоклюша	52
13. Микробиологический метод диагностики туберкулеза	53
14.1. Микробиологический метод диагностики сибирской язвы	56
14.2. Микробиологический метод диагностики лептоспироза	59
15.1. Микробиологический метод диагностики бруцеллеза	61
15.2. Микробиологический метод диагностики туляремии	64
16. Микробиологический метод диагностики чумы	66
17. Итоговое занятие по теме «Факультативно- анаэробные грамположительные палочки, особо опасные инфекции»	
Литература	69

Список сокращений

АГ	- антиген
АТ	- антитело
Б/В	- биовар
БФ	- бактериофаг
ГВЗ	- гнойно- воспалительные заболевания
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ	- гиперчувствительность немедленного типа
ЖСА	- желточно- солевой агар
ИФА	- иммуноферментный анализ
КА	- кровяной агар
КОА	- ко- агглютинация
Л/У	- лимфотический узел
М/О	- микроорганизм
МПА	- мясопептонный агар
МПБ	- мясопептонный бульон
МПК	- минимальная подавляющая концентрация
МФА	- метод флуоресцирующих антител
ОКИ	- острая кишечная инфекция
ООИ	- особо-опасные инфекции
ОФР	- опсоно – фагоцитарная реакция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РА	- реакция агглютинации
РАГА	- реакция агрегатгемагглютинации
РИФ	- реакция иммунофлуоресцирующих антител
РЛА	- реакция латекс - агглютинации
РН	- реакция нейтрализации
РНаг	- реакция нейтрализации антигена
РНат	- реакция нейтрализации антитела
РНГА (РПГА)	- реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации
РНИФ	- реакция непрямой иммунофлуоресценции
РСК	- реакция связывания комплемента
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ЧК	- чистая культура

Занятие № 1.

Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций.

Возбудитель	Staphylococcus aureus.
Материал для диагностики	Пунктат из ограниченных очагов воспаления (абсцессы и др.), мазок из слизистой зева и носа, раневое отделяемое, моча, спинномозговая жидкость, рвотные массы, промывные воды желудка.
1. Бактериологический метод	
1 день (1 этап)	Посев материала тампоном на селективные (желточно - солевой агар (ЖСА)) или универсальные среды (кровяной агар). Для накопления культуры отсевают тампон на одну из жидких накопительных сред – солевой бульон или мясо – пептонный бульон (МПБ). Инкубируют при 37°C 18 ч (КА, солевой бульон, МПБ) и 48 ч (ЖСА).
2-3 день (2 этап)	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> На ЖСА: белые или кремовые колонии, гладкие с ровными краями, диаметром 2-3 мм. Учитывают количество выросших колоний. При наличии фермента лецитиназы вокруг колонии образуется радужный венчик. На КА: наличие или отсутствие гемолиза. На солевом бульоне, МПБ – равномерное помутнение, образование пленки. <i>Бактериоскопия:</i> Из ½ части подозрительной колонии готовят мазок, окрашивают по Граму. Обнаруживаются грам (+) кокки, расположенные поодиночке, парами, в виде гроздьевидных скоплений. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Оставшуюся часть колонии отсевают на скошенный мясо-пептонный агар (МПА) для накопления и сохранения чистой культуры (ЧК). С МПБ или солевого бульона делают высеv на одну из вышеперечисленных плотных сред и повторяют ход исследования Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
3-4 день (3 этап)	1.Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> со скошенного МПА ставят пробы: - определение фермента плазмакоагулазы (РПК). - определение ДНКазы. - ферментация маннита. - ферментация мальтозы.

	- наличие гемолиза. 2. Определяют чувствительность к антибиотикам. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.					
4-5 день (4 этап)	Учет биохимических свойств, чувствительности к антибиотикам.					
	Выдача результата.					
		РПК	ДНК-аза	гемолиз	манит	мальтоза
	S. aureus	+	+	+	+	+
	S. epidermidis	-	-	-	-	+
	S. saprophyticus	-	-	-	+	+
S. haemolyticus	-	-	+	+	+	
2. Исследование крови на стерильность.						
	Кровь в количестве 5-10 мл засевают асептически в 2 флакона с питательной средой в соотношении 1: 10. 1-й флакон - «двойная среда» для роста факультативных анаэробов - скошенный МПА с 50-100 мл МПБ с 1% глюкозой. 2-ой флакон- 100 мл тиогликолевой среды – для роста анаэробов. Посевы инкубируют 10 суток с ежедневным просмотром. При наличии визуального роста делают высев петлей на КА. Инкубируют 18-24ч при 37С. Идентификацию культуры проводят по вышеизложенной схеме. При подозрении на анаэробы инкубируют в условиях анаэробноза (анаэроостат с газовой смесью, эксикатор со свечой и т.д.).					
3. Фаготипирование S. aureus.						
	Проводят с целью определения источника внутрибольничной инфекции и выявления госпитальных штаммов стафилококка. Используют 23 типовых бактериофага, обозначенных цифрами или латинскими буквами. Предварительно расчерчивают дно чашек с МПА на 23 сектора соответственно бактериофагам. Выделенные культуры S. aureus от больных, медицинского персонала, объектов внешней среды засевают газонем на чашки с МПА. После подсушивания чашек в каждый сектор вносят инсулиновым шприцом по капле соответствующего бактериофага. Инкубируют 18-24 ч при 37С. Культуры, лизирующиеся одними и теми же бактериофагами имеют общее происхождение. Госпитальные штаммы, наиболее часто выделяющиеся при внутрибольничных инфекциях, имеют фаготипы 80 и 77.					
<i>Серологический метод.</i>						
	4. Определение стафилококковых энтеротоксинов. Используют метод иммуноферментного анализа (ИФА). Навеску					

	пищевого продукта вносят в лунку плашки, на которой предварительно адсорбированы антитела к энтеротоксинам типов А, В, С, Д, Е. При наличии энтеротоксина к образующемуся комплексу АГ+АТ присоединяются специфические АТ, меченными ферментом пероксидазой.
--	--

Методы постановки проб для идентификации.

1. Реакция плазмокоагуляции (РПК). В пробирку с 0,3 мл цитратной кроличьей плазмы вносят петлю суточной культуры бактерий. Результат регистрируют через 4, 18 часов инкубации при 37°C. при положительной реакции образуется студнеобразный сгусток плазмы.

2. Определение ДНК-азы. На поверхность МПА, содержащего ДНК наносят петлей штрихами культуру. После инкубации при 37°C в течение 18-24ч поверхность агара заливают 1N раствором соляной кислоты. Вокруг колоний, образующих ДНКазу образуется зона просветления.

3. Ферментация углеводов. Культуру петлей отсевают на МПА с 1% субстратом (углевод) и индикатором. Инкубируют при 37°C в течение 18-24ч. При ферментации углевода цвет выросших колоний меняется (с зеленого на желтый при использовании индикатора бромтимолового синего).

4. Наличие гемолиза. На сектор чашки с КА петлей засевают исследуемую культуру. После инкубации при 37°C в течение 18-24ч учитывают наличие гемолиза вокруг колоний.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Биологические свойства.

Характеристика токсинов и ферментов патогенности.

Патогенез стафилококковых инфекций, их роль в госпитальных инфекциях.

Особенности иммунитета.

Методы микробиологической диагностики стафилококковых процессов.

Препараты для специфической профилактики и терапии.

Занятие № 2. Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций.

Возбудитель	<i>S. pyogenes.</i>
Материал для диагностики	Материал – пунктат из ограниченных очагов воспаления (абсцессы и др.), мазок из слизистой зева и носа, раневое отделяемое, моча, спинномозговая жидкость, рвотные массы, промывные воды желудка.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день (1 этап)	Посев материала тампоном на кровяной агар (КА). Для накопления культуры отсевают тампон на одну из жидких накопительных сред – на мясо - пептонный бульон с 1% глюкозой (сахарный бульон). Инкубируют при 37°C 18 ч (КА, МПБ).
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: мелкие, диаметром 1-2 мм бесцветные колонии. Учитывают количество выросших колоний. Отмечают наличие или отсутствие гемолиза вокруг колонии: α – гемолиз – зеленая зона гемолиза; β – гемолиз – прозрачная зона гемолиза; γ – гемолиз – отсутствие видимого гемолиза. На сахарном бульоне – зернистый осадок (цепи), помутнение. <i>Бактериоскопия:</i> Из ½ части подозрительной колонии готовят мазок, окрашивают по Граму. Обнаруживаются грам (+) кокки, расположенные цепочками по 2-4 и более кокков, парами. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Оставшуюся часть колонии отсевают на скошенный кровяной агар (КА) для накопления и сохранения чистой культуры (ЧК). С сахарного бульона делают высев на КА и повторяют ход исследования Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> Со скошенного КА ставят пробы: - редукция метиленовой сини в молоке; - рост на среде с 40% желчью; - рост на среде с pH 9,0; - рост на энтерококковом агаре; - наличие гемолиза; - ферментация оптохима; - рост на стрептококковой среде;

	- реакция латекс- агглютинации на стекле с сывороткой гр. А. 2. Определяют чувствительность к антибиотикам. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.					
4 день (4 этап)	Проводят учет результатов.					
		редукция метиленовой сини	рост на 40% желчи	гемолиз	оптохим	рост на среде рН 9,0
	S. viridans	-	-	α	-	-
	S. pyogenes	-	-	β	-	-
	S. anhaemolyticus	-	-	γ	-	-
	S. faecalis (faecium)	+	+	α,β,γ	-	+
	S. pneumonie	-	-	α	+	-
На стрептококковой жидкой среде наблюдается рост: S. viridans, S. anhaemolyticus, S. faecalis (faecium), S. pneumonie – диффузное помутнение, осадок; S. pyogenes – придонно- пристеночный рост, бульон остается прозрачным.						
Серологический метод.						
	Для диагностики системных заболеваний (ревматизма, гломерулонефрита) определяют титр антител сыворотки больного к стрептолизину О.					
ПЦР – диагностика.						
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.					

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Биологические свойства.

Характеристика токсинов и ферментов патогенности.

Патогенез стрептококковых инфекций.

Особенности иммунитета.

Методы микробиологической диагностики стрептококковых заболеваний.

Этиологическая и патогенетическая роль стрептококков группы А при респираторных инфекциях, рожистом воспалении, ангине, скарлатине, остром гломерулонефрите, ревматизме, стоматологических заболеваниях, сепсисе и др.

Пневмококк. Биологические свойства.

Факторы патогенности.

Этиологическая и патогенетическая роль стрептококка пневмонии в патологии человека. Микробиологическая диагностика.

Патогенность для человека и животных.

Стрептококки группы В, их роль в патологии новорожденных.

Энтерококки. Биологические свойства.

Роль в патологии человека.

Энтерококки как показатель санитарного состояния окружающей среды.

Схема постановки антистрептолизиновой реакции с О- стрептолизинном

	Количество материала (мл)											
Компонент реакции	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	контроль
Исследуемая сыворотка, разв.1:50	0,4	0,2	0,15	0,1								
Исследуемая сыворотка, разв.1:250					0,4	0,3	0,25	0,2	0,1			
Исследуемая сыворотка, разв.1:1000										0,25	0,1	
Фосфатный буфер, мл	0,1	0,3	0,35	0,4	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,25	0,25	0,8 0,5
Стрептолизин О, мл	По 1 мл в каждую пробирку Инкубация 45 мин при 37С											0,3
Эритроциты 5%, мл	По 0,2 мл в каждую пробирку, Инкубация 1 час при 37С											
Число АЕ St-O/мл в МЕ	65	125	165	250	313	413	500	625	1250	2000	3000	
Результат (гемолиз)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	- -

АЕ St-O/мл- антитоксическая единица антистрептолизина О в 1 мл.

Это реакция нейтрализации антителами сыворотки больного, способности О- стрептолизина вызывать гемолиз.

Титр сыворотки - число единиц анти – О- стрептолизина в 1 мл- последняя пробирка (наибольшее разведение сыворотки) в которой сыворотка еще нейтрализует рабочую дозу О -стрептолизина (гемолиз отсутствует). Выражают числом АЕ St-O/мл.

Титр анти-О –стрептолизина до 250 АЕ St-O обнаруживается у здоровых людей.

При ревматизме с первых дней болезни антитела к О- стрептолизину выявляются в высоких титрах – 500 АЕ St-O/мл. и выше.

Занятие № 2. Микробиологическая диагностика менингококковой инфекции.

Возбудитель	<i>Neisseria meningitidis</i> .
Материал для диагностики	СМЖ, кровь, питехии, отделяемое носоглотки. Материал отбирают специальным носоглоточным тампоном (на 3/4 длины согнутый под углом 45°). материал предохраняют от охлаждения (доставляют с сумках – термостатах с грелкой).
<i>Бактериоскопический метод.</i>	
	1. По Граму, метиленовым синим. В мазках крови, питехий, отделяемого носоглотки - Гр (-) одиночные кокки или диплококки. В СМЖ - диплококки, расположенные в лейкоцитах (незавершенный фагоцитоз). 2. МФА.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день (1 этап)	Посев материала тампоном на кровяной агар (КА) и сывороточный агар (СА) с антибиотиком, подавляющим рост гр (+) бактерий (линкомицин). Инкубируют при 37°C 18 - 48 часов, при повышенном содержании CO ₂ (сосуд со свечой).
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: белые, круглые, диаметром 2 мм колонии. Учитывают количество выросших колоний. Отмечают отсутствие гемолиза вокруг колоний. На СА: рост круглых, прозрачных колоний с голубоватым оттенком. <i>Бактериоскопия:</i> ½ часть подозрительной колонии окрашивают по Граму: Гр (-) диплококки в виде кофейных зерен, расположенных уплощенной стороной друг к другу. Характерен полиморфизм (диплококки разной величины) и полихромизм (есть Гр (-) и Гр (+)). Оставшуюся часть агглютинируют с антисыворотками групп А, В, С в реакции агглютинации на стекле. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Отсевают на скошенный СА или КА. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> Со скошенного КА или СА ставят пробы: - рост на МПА при 37°C; - рост на СА при 22°C; - рост на СА при 37°C; - проба на оксидазу; - проба на каталазу; 2. Определяют чувствительность к антибиотикам. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.

4 день (4 этап)	Проводят учет результатов: - отсутствие роста на МПА при 37°C; - отсутствие роста на СА при 22°C - наличие роста на СА при 37°C; - оксидаза (+); - каталаза (+); Положительный ответ выдают при положительной РА на стекле с менингококковыми сыворотками групп А, В, С.
<i>Серологический метод.</i>	
	РПГА для выявления титра антител в сыворотке больных. Используются эритроцитарные антигенные (из капсульного полисахарида) диагностикумы группы А, группы В, группы С.
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.

Контрольные вопросы.

Нейссерии. Таксономия.

Биологические свойства.

Патогенные и условно-патогенные нейссерии.

Патогенность для человека.

Внутриклеточный паразитизм.

Менингококки. Таксономия.

Биологические свойства. Патогенез менингококковой инфекции.

Микробиологическая диагностика.

Препараты для специфической профилактики и этиотропного лечения.

Занятие № 3. Микробиологический метод диагностики анаэробных инфекции.

3.1. Бактериологический метод диагностики газовой гангрены.

Возбудитель	<i>часто – Clostridium perfringens</i>
Материал для диагностики	Раневое отделяемое, экссудат, гной, мышечная ткань, перевязочный материал, кровь при сепсисе. Для обеспечения анаэробных условий взятие материала проводят шприцом или кусочки - в транспортные среды (тиогликолевая среда).
Бактериоскопический метод	
	<i>Бактериоскопия</i> – грам (+) крупные палочки, образуют капсулу.
Бактериологический метод	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают в несколько пробирок со средой Кита – Тароцци, железо – сульфитный агар (среда Вильсона – Блера), молоком (по 4 пробирки каждой среды). Половину засеянных пробирок прогревают 20 мин при 80С для уничтожения неспорообразующих бактерий. Инкубируют при 37С до 8 сут .
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> <i>Clostridium perfringens:</i> В молоке – через 3-4 часа образуют губкообразный сгусток и прозрачную жидкость. На среде Кита – Тароцци – через 24 часа помутнение и газообразование На Вильсон – Блера – через 2-4 часа – образуются черные колонии в глубине агарового столбика и газообразование <i>Бактериоскопия – крупные грам (+) палочки.</i> <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Для получения изолированных колоний пересевают на КА с 1% глюкозой. Инкубируют при 37С 3-4 дня в строго анаэробных условиях.
4-6 день (3 этап)	1) Выросшие колонии пересевают в пробирки на среду Кита – Тароцци или тиогликолевую для получения чистой культуры. Инкубируют при 37°С 2-3 дня.
8-9 день (4 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> - культуральные признаки - постановка биохимического ряда: гидролиз желатины, разжижение свернутой сыворотки, яичного белка. - серологическая идентификация экзотоксинов в реакции нейтрализации с антительным диагностикумом. Инкубируют при 37°С 2-3 дня.
11-12 день (5 этап)	Учет результатов.
Биологический метод	
	Проводят реакцию нейтрализации (РН) на животных. Готовят ряд опытных и контрольных пробирок. В опытные вносят исследуемый

	материал (токсин) и моновалентные антитоксические сыворотки (<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i>). Смесь выдерживают при 37С 30-40 минут (для нейтрализации токсина антитоксином). В контрольные пробирки вносят только исследуемый материал. Подготовленный материал вводят п/к морским свинкам. При нейтрализации токсина животное выживает; при отрицательной реакции животное погибает через 40 минут – 4 часа после инъекции.
ПЦР	
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Экология.

Биологические свойства.

Анаэробноз.

Резистентность и факторы окружающей среды.

Факультативный паразитизм и патогенность для человека.

Локализация в организме.

Токсичность.

Генетический контроль токсинообразования.

Клостридии раневой анаэробной инфекции.

Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Факторы патогенности, токсины.

Энтеротоксин и его роль при пищевой токсикоинфекции.

Патогенез раневой анаэробной инфекции.

Роль микробных ассоциаций в патогенезе.

Антитоксический иммунитет.

Лабораторная диагностика.

Специфическое лечение и профилактика.

3.2. Бактериологический метод диагностики ботулизма.

Возбудитель	<i>Clostridium botulinum</i>
Материал для диагностики	Кровь до введения противоботулинической сыворотки, моча, испражнения, промывные воды желудка, остатки подозреваемого продукта.
<i>Бактериоскопический метод</i>	
	Грам (+) крупные палочки, споры расположены субтерминально.
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают в несколько пробирок со средой Кита – Тароцци, железо – сульфитный агар (среда Вильсона – Блера), молоком (по 4 пробирки каждой среды). Половину засеянных пробирок прогревают для уничтожения неспорообразующих бактерий. Инкубируют при 37°C 3-4 суток
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> В молоке – через 3-4 часа образуют губкообразный сгусток и прозрачную жидкость. На среде Кита – Тароцци – придонный рост На Вильсон – Блера – через 24-48 часов – образуются черные колонии в глубине агарового столбика. <i>Микроскопия</i> – крупные грам (+) палочки. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> для получения изолированных колоний пересевают на КА с 1% глюкозой. Инкубируют при 37°C 3-4 дня в строго анаэробных условиях.
4-6 день (3 этап)	1) на КА – рост нежных прозрачных колоний с небольшой зоной гемолиза. Выросшие колонии пересевают в пробирки на среду Кита – Тароцци или тиогликолевую для получения чистой культуры. Инкубируют при 37°C 2-3 дня в анаэробных условиях.
8-9 день (4 этап)	<i>Идентификация чистой культуры:</i> - культуральные признаки - постановка биохимического ряда - серологическая идентификация токсина в реакции нейтрализации с антительным диагностикумом. Инкубируют при 37°C 2-3 дня.
11-12 день (5 этап)	Учет результатов.
<i>Биологический метод</i>	
	Проводят реакцию нейтрализации (РН) на животных. Готовят ряд опытных и контрольных пробирок. В опытные пробирки вносят исследуемый материал (токсин) и антитоксическую поливалентную сыворотку. Смесь выдерживают при 37°C 30-40 минут (для нейтрализации токсина антитоксином). В контрольные пробирки вносят только исследуемый материал. Подготовленный материал вводят в/м белым мышам. При нейтрализации токсина животное выживает; при отрицательной реакции животное погибает. Для

	определения серотипа токсина реакцию ставят с моновалентными сыворотками типов А, В, С, Е. При соответствии типа токсина и типа антисыворотки животное выживает.
<i>ПЦР</i>	
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.
<i>Серологический метод</i>	
	Обнаружение токсина в патологическом материале: - в реакции ИФА; - РНГА с эритроцитарным антигеном. Ставят с поливалентной и моновалентными противоботулиническими сыворотками типов А,В,С,Е.

Контрольные вопросы.

Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Факторы патогенности, ботулотоксины, патогенез заболевания.

Антитоксический иммунитет.

Лабораторная диагностика.

Специфическое лечение и профилактика ботулизма.

3.3. Бактериологический метод диагностики столбняка.

Возбудитель	<i>Clostridium tetani</i>
Материал для диагностики	Кусочки ткани вокруг входных ворот инфекции, перевязочный материал, кетгут, у женщин после родов или аборта – выделения из матки, у новорожденных – выделения из пупочной раны.
<i>Бактериоскопический метод</i>	
	Грам (+) крупные палочки с терминальной спорой, образуют капсулу.
<i>Бактериологический метод</i>	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают в несколько пробирок со средой Кита – Тароцци, железо – сульфитный агар (среда Вильсона – Блера), молоком (по 4 пробирки каждой среды). Половину засеянных пробирок прогревают при 80С 20 мин для уничтожения неспорообразующих бактерий. Инкубируют при 37С 3- 10 суток
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> <i>Clostridium tetani</i> : В молоке – через 3-4 часа образуют губкообразный сгусток и прозрачную жидкость. На среде Кита – Тароцци – придонный рост На Вильсон – Блера – через 24-48 часов – образуются черные колонии в глубине агарового столбика. <i>Бактериоскопия</i> - крупные грам (+) палочки. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> для получения изолированных колоний пересевают на КА с 1% глюкозой. Инкубируют при 37С 3-4 дня в строго анаэробных условиях.
4-6 день (3 этап)	1) на КА – рост нежных прозрачных колоний (капельки росы) с малозаметной зоной гемолиза. Выросшие колонии пересевают в пробирки на среду Кита – Тароцци или тиогликолевую для получения чистой культуры. Инкубируют при 37°С 2-3 дня а анаэробных условиях.
8-9 день (4 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> - культуральные признаки - постановка биохимического ряда - серологическая идентификация тетаноспазмина в реакции нейтрализации с антитоксической сывороткой. Инкубируют при 37°С 2-3 дня.
11-12 день (5 этап)	Учет результатов.
<i>Биологический метод</i>	
	Проводят реакцию нейтрализации (РН) на животных. Материал растирают в стерильной ступке с песком, заливают физ.раствором, фильтруют через бумажный фильтр. Готовят ряд опытных и

	контрольных пробирок. В опытные вносят исследуемый материал (токсин) и антитоксическую сыворотку. Смесь выдерживают при 37С 30-40 минут (для нейтрализации токсина антитоксином). В контрольные пробирки вносят только исследуемый материал. Подготовленный материал вводят в/м белым мышам. При нейтрализации токсина животное выживает. При отрицательной реакции у животного через 1-2 суток появляются симптомы в мышцах на той стороне туловища, в которую был введен токсин: ригидность хвоста, задних конечностей, хвост поднимается в виде дуги из-за резкого сокращения хвостовых мышц, паралич сначала конечностей, затем остальных мышц тела, животное погибает. Зараженных животных наблюдают 4-5 дней, инкубационный период – 2-4 дня.
<i>ПЦР</i>	
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.
<i>Серологический метод</i>	
	Обнаружение токсина в патологическом материале в реакции ИФА

Контрольные вопросы.

Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Факторы патогенности, токсины.

Патогенез заболевания.

Столбняк у новорожденных детей.

Антитоксический иммунитет.

Лабораторная диагностика.

Специфическое лечение и профилактика столбняка.

Занятие № 4. Микробиологическая диагностика ГВЗ и ГСЗ, вызванных Гр (-) бактериями. 4.1. Бактериологический метод диагностики протей.

Возбудитель	Proteus vulgaris и P. mirabilis.
Материал для диагностики	Раневое отделяемое, гной, экссудат, моча, мазки со слизистых оболочек, кровь при подозрении на сепсис.
<i>Бактериоскопический метод.</i>	
	1. По Граму, метиленовым синим. 2. МФА.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на плотные питательные среды: КА, Эндо, ЖСА, Сабуро-агар, МПА. Инкубируют при 37°C 24 часа.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: серые слизистые колонии, феномен «роения», ползучий рост, специфический запах гниения. Учитывают количество выросших колоний. Отмечают наличие (отсутствие) гемолиза вокруг колоний. На Эндо: лак (-) круглые слизистые колонии или ползучий рост. На ЖСА, Сабуро-агаре роста нет. На МПА – серые круглые колонии или ползучий рост. <i>Бактериоскопия:</i> гр (-) палочки. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Подозрительные колонии снимают на полиуглеводную среду Клиглера и цитратный косячок. В среде Клиглера штрихами засевают столбик и скос. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> 1) Рост на среде Клиглера: Лактоза (-) Глюкоза КГ H ₂ S (+) Мочевина (+); Цитратный агар – изменение среды с зеленого цвета на синий (К +). 2) Ставят биохимический ряд, пробу с коли – протейным (или протейным) бактериофагом. На чашку со средой МПА, засеянную культурой «газоном» наносят каплю БФ. 2. Определяют чувствительность к АБ методом диффузии в агар. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
4 день (4 этап)	Проводят учет результатов: 1) б/х свойств: выраженная сахаролитическая и протеолитическая активность; 2) пробы с КПБФ или ПБФ: положительная. 3) антибиотикограммы. Выдают ответ на основании учета культуральных, биохимических свойств.

2. Бактериологический метод диагностики синегнойной инфекции.

Возбудитель	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Материал для диагностики	Раневое отделяемое, гной, экссудат, моча, мазки со слизистых оболочек, кровь при подозрении на сепсис.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на плотные питательные среды: КА, Эндо, ЖСА, Сабуро-агар, МПА, МПБ Инкубируют при 37°C 24 часа. Агар Сабуро инкубируют при 24°C 3-5 суток.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: круглые плоские слизистые колонии с сине-зеленым пигментом. Запах «земляничного мыла или жасмина». Учитывают количество выросших колоний. Отмечают наличие гемолиза вокруг колоний. На Эндо: лак (-) круглые плоские слизистые колонии с сине-зеленым пигментом. На ЖСА, Сабуро-агаре роста нет. На МПА – полупрозрачные круглые плоские слизистые колонии с сине-зеленым пигментом, феноменом радужного лизиса и специфическим запахом (жасмин, земляничное мыло), вызванного синтезом триинтиламина. Пигменты: водорастворимый пиоционин – сине-зеленый флюоресцеин - флюоресцирует при УФ, пиорубин – красный, пиомеланин – черный. На МПБ – серовато-серебристая пленка Грам (-), капсулоподобное вещество (+), <i>Бактериоскопия:</i> гр (-) палочки. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Подозрительные колонии снимают на полиуглеводную среду Клиглера и цитратный косячок. В среде Клиглера штрихами засевают столбик и скос. Инкубируют при 37°C 18-24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> 1) Рост на среде Клиглера: Лактоза (-) Глюкоза К (окисление) H ₂ S (-) Мочевина (-); Цитратный агар – изменение среды с зеленого цвета на синий (К +). 2) Ставят биохимический ряд, пробу с синегнойным бактериофагом. На чашку со средой МПА, засеянную культурой «газоном» наносят каплю БФ. 3) оксидаза (+), каталаза (+);

	2. Определяют чувствительность к АБ методом диффузии в агар. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
4 день (4 этап)	Проводят учет результатов: 1)б/х свойств: отсутствие сахаролитической активности (окисляют только глюкозу на среде Хью- Лейфсона а аэробных условиях) и выраженная протеолитическая активность: - разжижение желатина - гидролиз казеина - утилизация гемоглобина – гемолиз на КА 2) пробы с синегнойным БФ: положительная. 3) антибиотикограммы. Выдают ответ на основании учета культуральных, биохимических свойств.

3. Бактериологический метод диагностики клебсиеллезов

Возбудитель	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .
Материал для диагностики	Раневое отделяемое, гной, экссудат, моча, мазки со слизистых оболочек, кровь при подозрении на сепсис.
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на плотные питательные среды: КА, Эндо, ЖСА, Сабуро- агар, МПА, МПБ Инкубируют при 37°C 24 часа. Агар Сабуро инкубируют при 24°C 3-5 суток.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: круглые выпуклые пышные слизистые колонии. Учитывают количество выросших колоний. Отмечают наличие гемолиза вокруг колоний. На Эндо: лак (+) круглые выпуклые пышные слизистые колонии-красные с металлическим блеском или без металлического блеска. На ЖСА, Сабуро- агаре роста нет. На МПА – полупрозрачные круглые пышные слизистые колонии. На МПБ – диффузный рост. <i>Бактериоскопия:</i> - грам (-) палочки. - по Бури – Гинса - на темно – коричневом фоне видны красные диплобактерии, окруженные неокрашенной капсулой. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Подозрительные колонии снимают на полиуглеводную среду Клиглера и цитратный косячок. В среде Клиглера штрихами засевают столбик и скос. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> 1)Рост на среде Клиглера: Лактоза (+) Глюкоза КГ (бурное газообразование с разрывом столбика агара) H ₂ S (-) Мочевина (-); Цитратный агар – изменение среды с зеленого цвета на синий (К +). 2)Ставят биохимический ряд. 2. Определяют чувствительность к АБ методом диффузии в агар. Инкубируют при 37°C 18 -24 часа.
4 день (4 этап)	Проводят учет результатов: 1)б/х свойств: выраженная сахаролитическая активности (ферментирует углеводы с образованием КГ) и образует индол; 2) антибиотикограммы. Выдают ответ на основании учета культуральных, биохимических свойств.

--	--

4. Бактериологический метод диагностики эшерихиозов.

Возбудитель	<i>Escherichia coli</i>
Материал для диагностики	Раневое отделяемое, гной, экссудат, моча, мазки со слизистых оболочек, кровь при подозрении на сепсис.
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на плотные питательные среды: КА, Эндо, ЖСА, Сабуро-агар, МПА, МПБ. Инкубируют при 37°C 24 часа. Агар Сабуро инкубируют при 24°C 3-5 суток.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> На КА: круглые серые колонии. Учитывают количество выросших колоний. Отмечают наличие гемолиза вокруг колоний. На Эндо: лак (+) колонии - красные с металлическим блеском или красные без металлического блеска или розовые или бесцветные колонии - лак (-). На ЖСА, Сабуро-агаре роста нет. На МПА – полупрозрачные круглые колонии. На МПБ – диффузный рост. <i>Бактериоскопия: гр (-) палочки.</i> <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> Подозрительные колонии снимают на полиуглеводную среду Клиглера и цитратный косячок. В среде Клиглера штрихами засевают столбик и скос. Инкубируют при 37°C 18-24 часа.
3 день (3 этап)	1. Проводят видовую идентификацию микроорганизма. <i>Изучение биохимических свойств:</i> 1) Рост на среде Клиглера: Лактоза - К или (-) Глюкоза КГ или К H ₂ S (-) Мочевина (-); Цитратный агар – (-) 2) Ставят биохимический ряд. 2. Определяют чувствительность к АБ методом диффузии в агар, к коли-протейному бактериофагу. Инкубируют при 37°C 18-24 часа.
4 день (4 этап)	Проводят учет результатов: 1) б/х свойств: выраженная сахаролитическая активности (ферментирует углеводы с образованием КГ) и слабая протеолитическая активность - образует индол; 2) учет антибиотикограммы и КПБФ (+, -) Выдают ответ на основании учета культуральных, биохимических свойств.

Контрольные вопросы.

Протеи. Виды.

Культуральные и биохимические свойства.

Факторы патогенности.

Этиологическая и патогенетическая роль протея при гнойной и смешанных инфекциях, при пищевой токсикоинфекции.

Роль во внутрибольничных инфекциях.

Лабораторная диагностика.

Синегнойная палочка. Таксономия.

Экология.

Резистентность.

Синегнойная палочка. Биологические свойства.

Факторы патогенности.

Патогенность для человека.

Роль в возникновении внутрибольничных инфекций.

Лабораторная диагностика.

Препараты для профилактики.

Этиотропная терапия.

Клебсиеллы. Их роль в патологии.

Характеристика клебсиелл пневмонии, озоны, риносклеромы.

Микробиологическая диагностика.

Проблема специфической профилактики.

Этиотропная терапия.

Занятие № 5. Микробиологическая диагностика заболеваний, передающихся половым путем.

Занятие № 5.1. Микробиологический метод диагностики гонореи.

Возбудитель	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Материал для диагностики	Гнойное отделяемое, мазки со слизистых оболочек мочеполовых органов, глотки, прямой кишки, суставной и перитонеальный экссудат, отделяемое конъюнктивы при бленнорее.
<i>Бактериоскопический.</i> Диагноз ставят при острой гонорее до применения антибиотиков	
	1.мазок по Грамму – грамотрицательные диплококки бобовидной формы, находящиеся внутри лейкоцитов. 2. мазок метиленовым синим - диплококки бобовидной формы, находящиеся внутри лейкоцитов.
<i>Бактериологический.</i>	
1 день	Материал засевают на специальные среды – КА, сывороточный агар, КДС (МПА из бычьего сердца с добавлением казеина, дрожжевого экстракта, сыворотки крови). Инкубируют при 37С 24-72 часа при повышенном содержании CO₂ (не менее 3%)
2-5 день	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> рост круглых прозрачных колоний(капли росы) <i>Бактериоскопия:</i> грамотрицательные диплококки бобовидной формы. - оксидаза (+); Пересев подозрительных колоний для накопления и сохранения чистой культуры: - на скошенный сывороточный агар 37С; - на скошенный сывороточный агар 22С; - МПА 37С Инкубируют при 37С или 24С 24 часа при повышенном содержании CO₂.
6 день	<i>Изучение биохимических свойств:</i> Посев на среды пестрого ряда Гисса для изучения сахаролитических свойств - глюкоза (+) - мальтоза (–) - сахароза (–) - лактоза (–) - каталаза (+) <i>Определение чувствительности к антибиотикам .</i>
7 день	<i>Учет полученных результатов, выдача ответа.</i>
<i>Серологический.</i> Не нашел широкого применения.	
	1. РСК (реакция Борде -Жангу). Положительная с 3-4 недели заболевания.
<i>ПЦР.</i>	

Контрольные вопросы.

Гонококки. Таксономия.

Биологические свойства.

Патогенез гонококковой инфекции.

Микробиологическая диагностика острой и хронической гонореи.

Перспективы специфической профилактики.

Этиотропное лечение гонореи и бленореи.

5.2. Микробиологический метод диагностики сифилиса.

Возбудитель	<i>Treponema pallidum</i>
Материал для диагностики	I стадия болезни - отделяемое твердого шанкра, сыворотка крови; II стадия – сыворотка крови, аспират высыпных элементов, лимфоузлов.
Бактериоскопический (отделяемое твердого шанкра, аспират высыпных элементов, пунктат лиматических узлов).	
	1. темнопольная микроскопия. Готовят препарат «раздавленная капля». Видн тонкие извитые нити длиной 6-14 мкм, количество завитков – 10-12, их высота одинаковая, правильной формы, движения маятникообразные, поступательно- сгибательные. Дифференцируют с сапрофитными трепонемами слизистой полости рта. 2. метод серебрения по Морозову. <i>Treponema pallidum</i> выглядит черной или темно-коричневой. Мазки фиксируют высушиванием и 4% формалином; спирт разрушает оболочку. 3. окраска по Романовскому – Гимза - розовое окрашивание, непатогенные трепонемы – в фиолетовый или синий цвет. 4. окраска по Бури (вместо туши используют опаловый синий).
Серологический. Используют комплекс серологических реакций (КСР). Реакции положительны с 4 недели после появления твердого шанкра.	
	1. РСК (реакция Вассермана) с несколькими АГ: а) неспецифическим кардиолипидным - экстракт вытяжки сердца быка; неспецифически взаимодействует с реагинами – Ig M и G. Реагины появляются у больных сифилисом, у лиц с нарушением липидного обмена (беременные, алкоголики, с циррозом печени, сахарным диабетом). Реакция с этим АГ может быть ложноположительной, но никогда - ложноотрицательной. б) специфическим трепонемным - возбудитель культивируют в яичке кролика, инактивируют ультразвуком. Исследуемую сыворотку разводят от 1:5 до 1:1280 в пробирках Флоренского. Вносят антигенный диагностикум и комлемент. Выдерживают 1 час при 37С. Добавляют гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка). Выдерживают 1 час при 37С. Положительная реакция -задержка гемолиза, осадок эритроцитов на дне пробирки; отрицательная реакция – гемолиз, «лаковая кровь». 2. Реакция микропреципитации. Применяют при массовом обследовании населения. Ставят с неспецифическим кардиолипидным антигеном. В лунку полистероловой пластины вносят 3 капли инактивированной сыворотки больного и добавляют 1 каплю кардиолипидного антигена. Смесь встряхивают. Учитывают в течение 1 минуты. Положительная реакция – образование и выпадение хлопьев агглютината. 3. Реакция иммобилизации трепонем (РИТ). Принцип –

	угнетение движения (иммобилизация) трепонем антителами сыворотки крови пациента в присутствии комплемента. Взвесь тканевых подвижных трепонем смешивают с в пробирке с исследуемой сывороткой, добавляют комплемент. В 1-ю контрольную пробирку вносят сыворотку здорового человека, во 2-ю – инактивированный комплемент. Инкубируют при 35С в анаэробных условиях. Готовят препарат «раздавленная капля», определяют количество подвижных и неподвижных трепонем. Определяют процент иммобилизованных трепонем – положительный результат – выше 50%. Реакция специфическая. 4. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Инактивированную сыворотку больного разводят 1:200. на предметное стекло наносят каплю тканевых трепонем. Высушивают, фиксируют в ацетоне 5 мин. Наносят сыворотку больного, через 30 мин. высушивают и промывают. Препарат обрабатывают флюоресцирующей антиглобулиновой сывороткой. Изучают в люминесцентном микроскопе, учитывая степень свечения трепонем. 5. ИФА. Выявляют Ig G и M. 6. РПГА.
<i>Бактериологический метод</i> не применяют из-за отсутствия доступных методов получения культур.	
<i>ПЦР</i>	
	Обнаруживают ДНК возбудителя в клиническом материале.

Контрольные вопросы.

Возбудитель сифилиса.

Морфологические, культуральные свойства.

Патогенез и иммуногенез.

Микробиологическая диагностика и этиотропная терапия.

Возбудитель тропических трепонематозов – беджель, фрамбезия, пинта.

Морфологические и культуральные свойства возбудителей.

Пути заражения человека. Течение заболевания у человека.

Микробиологическая диагностика.

Занятие №7. Микробиологический метод диагностики диареегенных эшерихий.

Возбудитель	<i>Escherichia coli</i> .
Материал для диагностики	Испражнения.
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Инкубируют при 37°C 18- 24 часа.
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
2 день (2 этап)	1.) Изучают культуральные свойства бактерий. Морфология, культуральные, биохимические свойства одинаковые с нормальной (банальной) <i>E. coli</i>. Отличаются только по Аг структуре. С чашки Эндо агглютинируют не менее 10 колоний лас (+) и лас (-) с поливалентной сывороткой ОКА, содержащей АТ к 23 К-Аг. При # реакции остатки колонии отсевают на скошенный МПА для накопления и сохранения чистой культуры. Инкубируют при 37°C 18- 24 часа.
3 день (3 этап)	С косяка МПА проводят агглютинацию на стекле с сывороткой ОКА (повторно), при # реакции, с сыворотками ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ, входящими в состав ОКА. Если с одной из них реакция #, то агглютинируют с моновалентными адсорбированными сыворотками или иммуноглобулинами, входящими в состав данной группы (содержат О- и К –Аг). ОКВ: O20:K84; O26:K60; O55:K59; O111:K58. ОКС: O86:K61; O125:K70; O126: K71; O128:K67; O119:K69; O33:K-. ОКД: O118:K77; O25:K11; O44:K74; O75:K-; O114:K90; O142:K86; O143:K-; O151:K-; O «408»; ОКЕ: O124:K72; O142:K86; O143:K-; O144:K-; O151:K-. При # реакции с адсорбированными сыворотками ставят подтверждающую развернутую пробирочную реакцию агглютинации с «живой» и «гретой» культурой. К-Аг состоит из 3 фракций: L – разрушается при 60-90°C; В – при 90-100°C; А – 100°C 1 час; Культуру в физ. растворе делят на 2 части. Первую часть кипятят 1 час, чтобы разрушить Н- и К-Аг, остается только О-Аг. Вторую часть не обрабатывают – есть все 3 Аг. Готовят 2-кратные разведения агглютинирующей сыворотки в 2 ряда пробирок от 1:50 до титра сыворотки, указанного на этикетке. В первый ряд вносят «гретую» культуру, во второй – «живую». Учет через 24 часа. С иммуноглобулинами ставят только реакцию агглютинации на стекле с «живой» культурой. Ставят «пестрый ряд» Гисса для изучения б/х свойств, чувствительность к антибиотикам, коли-протейному бактериофагу

	(КПФ).
4 день (4 этап)	Идентификация чистой культуры: 1. Реакция агглютинации #, если в 1 ряду пробирок («гретая») есть агглютинация не менее, чем до половины титра, указанного на этикетке с сывороткой. 2. учет биохимического ряда: -выраженные сахаролитические свойства- ферментируют углеводы с образованием К или КГ. - H₂S не образуют - индол ± - подвижность ± - цитрат не утилизируют. 3. учет чувствительности к АБ и КПБФ. Выдача ответа.
<i>Серологический метод</i> не применяется, т.к. имеются перекрестные АТ с нормальными эшерихиями.	
<i>ПЦР</i>	
	Выявляют ДНК возбудителей <i>Shigella spp.</i> и ЕІЕС в испражнениях.

Контрольные вопросы.

Семейство Enterobacteriaceae.

Таксономия.

Общая характеристика, их эволюция.

Морфологические, культуральные, биохимические свойства.

Антигенная структура.

Ферменты.

Токсины.

Бактерионосительство.

Эшерихии. Их основные свойства.

Физиологическая роль в кишечнике человека и санитарно-показательное значение эшерихий, их значение в генетических и генно-инженерных работах.

Диареегенные эшерихии, их дифференциация от условно-патогенных.

Микробиологическая диагностика энтеральных и парентеральных эшерихиозов.

Этиотропное лечение.

Дисбактериоз: понятие, причина.

Принципы лечения дисбактериоза.

ИБП для коррекции нормофлоры кишечника.

Занятие № 8. Микробиологический метод диагностики дизентерии.

Возбудители	Бактерии рода <i>Shigella</i> .
Материал для диагностики	Испражнения, ректальные мазки.
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на дифференциально - диагностические среды Эндо и Плоскирева. Инкубируют при 37С 18- 24 часа.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> Отбирают лактозонегативные колонии, отсевают ½ часть колонии на дифференциально – диагностическую среду типа Клиглера, остатки колонии – на среду с цитратом натрия. Инкубируют при 37С 18- 24 часа.
3 день (3 этап)	1. Учитывают рост на среде Клиглера: - глюкоза – ферментируют до К или КГ (<i>S. flexneri</i> 6) - лактоза – не ферментируют - H₂S не образуют. - мочевины не утилизируют - цитрат не утилизируют. 2. Ставят реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой ФЗН (Флекснер, Зонне, Ньюкастл) и сывороткой ОКА (РА должна быть отрицательной). При # реакции с ФЗН, ставят РА отдельно с сыворотками Флекснер I-V, Зонне, Флекснери VI. При положительной РА с одной из этих антисывороток отсевают культуру на скошенный МПА для накопления и сохранения чистой культуры. 3. Ставят «пестрый ряд» Гисса для изучения б/х свойств. 4. определяют чувствительность к антибиотикам, дизентерийному бактериофагу (ДБФ).
4 день (4 этап)	<i>Идентификация чистой культуры:</i> 1. со скошенного МПА ставят РА с антисыворотками ФЗН, Флекснер I-V, Зонне, Флекснери VI (повторяют). При # реакции по схеме классификации шигелл для группы Флекснер определяют серовар и подсеровар возбудителя. Для определения серовара используют типовые антисыворотки (обозначены римскими цифрами), подсеровара – групповые антисыворотки (обозначены арабскими цифрами и латинскими буквами). 2. учет биохимического ряда: - сахаролитические и протеолитические свойства не выражены: - ферментируют только глюкозу с образованием К или КГ - не ферментирует лактозу - H₂S не образуют

	- индол ± - подвижность – отр. - цитрат не утилизируют. 3. учет чувствительности к АБ и ДБФ (должен быть #). Выдача ответа: <i>Shigella flexneri</i> 2a
<i>Серологический метод</i>	
	Ставят РПГА с сывороткой крови. У больных реакция будет отрицательная, т.к. заболевание имеет короткий инкубационный период и антитела в крови отсутствуют или их концентрация незначительная. Положительная реакция будет у переболевших (не леченых), бактерионосителей. Сыворотку крови разводят в 3 рядах лунок от 1:25 до 1: 3200. В каждую лунку первого ряда вносят эритроцитарный антигенный диагностикум шигелла Флекснери I-V, второго ряда - эритроцитарный антигенный диагностикум шигелла Зонне, третьего ряда – шигелла Флекснери VI. Титр сыворотки: последнее разведение сыворотки дающее положительную реакцию агглютинации на два креста. Диагностический титр 1: 100. Реакцию ставят в динамике: в день обращения и через 5-7 дней. Должно быть нарастание или снижение титра антител сыворотки.
<i>ПЦР</i>	
	Выявляют ДНК возбудителей <i>Shigella</i> spp. и EIEC в испражнениях.

Контрольные вопросы.

Шигеллы. Биологические свойства.

Патогенез дизентерии.

Роль факторов инвазии.

Распространение.

Токсины Шига и шигоподобные токсины.

Иммунитет.

Методы микробиологической диагностики.

Проблема специфической профилактики.

Этиотропная терапия.

Занятие № 10.

Микробиологический метод диагностики кишечных иерсиниозов.

Возбудитель	<i>Yersinia enterocolitica</i> .
Материал для диагностики	Испражнения, ректальные мазки, рвотные массы, желчь, моча, секционный материал.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день	Материал –Посев на дифференциально- диагностические среды (Эндо, Мак-Конки, Левина) и жидкие среды обогащения Посевы на плотных средах инкубируют при 37С 24 часа; Среды обогащения инкубируют при 8С 21 день с периодическими высевами на среду Эндо на 5,10,15, 21 день.
2 день	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> Мелкие прозрачные лактозонегативные колонии <i>Бактериоскопия:</i> грамотрицательные овоидные палочки <i>Изучение биохимических свойств:</i> подозрительные колонии отсевают на среду Клиглера для изучения биохимических свойств и для накопления и сохранения чистой культуры - H ₂ S (-); - мочевины (+); - глюкоза (-); - лактоза (-) Инкубируют 24 часа при 37С.
3 день	Учет биохимических свойств со среды Клиглера. При наличии положительных тестов ставят 1.развернутый биохимический ряд; 2.чувствительность к антибиотикам; 3.РА на стекле с О – антисыворотками;
<i>Серологический метод.</i>	
	Развернутая реакция РПГА с эритроцитарным антигенным диагностикумом. Сыворотку больного разводят методом серийных разведений от 1:50 до 1:3200 в трех рядах лунок. В каждую лунку ряда вносят по 1 капле соответствующего диагностикума: <i>Yersinia enterocolitica</i> O3 <i>Yersinia enterocolitica</i> O9 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . Положительная реакция – «зонтик». Диагностический титр 1: 200 и выше. Обязательна постановка реакции методом парных сывороток – в начале заболевания и через 5-7 дней. Должно быть нарастание (или снижение в результате антибиотикотерапии) титра антител.

<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Выявляют ДНК <i>Yersinia enterocolitica</i> spp., <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Контрольные вопросы.

Иерсинии – возбудители кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Биологические свойства.

Патогенность для человека и животных.

Лабораторная диагностика иерсиниозов.

Этиотропная терапия.

Занятие № 9. Микробиологический метод диагностики сальмонеллезов.

Возбудители	Бактерии рода <i>Salmonella</i> .
Материал для диагностики	Испражнения, ректальные мазки, рвотные массы, кровь, моча, пищевые продукты при ПТИ.
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
1 день (1 этап)	Клинический материал засевают на дифференциально - диагностические среды Эндо и Плоскирева, ВСА. Параллельно делается посев на среды обогащения (селенитовый бульон). Инкубируют при 37С 18- 24 часа, ВСА – 48 часов.
2 день (2 этап)	<i>Изучают культуральные свойства бактерий.</i> С плотных сред отбирают лактозонегативные колонии, с ВСА - черные, с почернением среды под колонией. отсевают ½ часть колонии на дифференциально – диагностическую среду типа Клиглера, остатки колонии – на среду с цитратом натрия. Инкубируют при 37С 18- 24 часа.
3 день (3 этап)	1. Учитывают рост на среде Клиглера: - глюкоза – ферментируют до К или КГ; - лактоза – не ферментируют; - H₂S образуют (есть штаммы отрицательные); - мочевины не утилизируют; - цитрат утилизируют. 2. Имеются 3 основных АГ: О-, Н-, Vi. На основе О-Аг разделены на 67 серогрупп, в каждой группе один общий О-Аг: гр. А – О2, гр. В- О4; гр.С -О6; гр Д – О9 –АГ и т.д. Выделены Н-Аг I (специфической) и II (неспецифической) фазы. По Н- АГ сальмонеллы подразделяются на серовары. Н-Аг I фазы встречаются лишь у данного серовара (обозначены англ. буквами), Н-АГ II фазы встречаются у разных сероваров сальмонелл (обозначены арабскими цифрами и англ. буквами). На каждый О- и Н-АГ получены монорецепторные агглютинирующие сыворотки. 1. Ставят реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой групп АВСДЕ и сывороткой ОКА (РА должна быть отрицательной). 2. При # реакцией с поливалентной сывороткой АВСДЕ ставят: - «пестрый ряд» Гисса для изучения б/х свойств. - определяют чувствительность к антибиотикам, сальмонеллезному бактериофагу (СБФ). - отсевают культуру на скошенный МПА для сохранения и накопления чистой культуры.

4 день (4 этап)	<i>Идентификация чистой культуры:</i> 1. Со скошенного МПА ставят РА с монорецепторными О-сыворотками: О2, О4, О6, О9, О3,10; О7, О8, О12, Vi; по О-Аг сальмонеллы разделяют на серогруппы. 2. При # реакция с одной из них - с сыворотками Н –I фазы, соответствующие по схеме Кауфмана -Уайта; 3. По обнаруженным О-АГ и Н-АГ I фазы ставят РА с сыворотками Н-II фазы, соответствующим схеме К-У. По Н-Аг сальмонеллы разделяют на серовары. Например: О-Аг- 1,9,12 # Н-Аг I фазы g, m # Н-Аг II фазы 1,7 # Salmonella enteritidis. 4. учет биохимического ряда: - сахаролитические и протеолитические свойства выражены: - ферментируют глюкозу с образованием К или КГ - не ферментирует лактозу - H₂S образуют (иногда нет) - индол (-) - подвижность (+) - цитрат утилизируют. - фенилаланин не образуют 3. учет чувствительности к АБ и СБФ (должен быть #). Выдача ответа: Род Salmonella включает 2 вида: S. bongori и S. choleraesuis 5 подвигов: S. choleraesuis (1) S. salamae (2) S. arizonae (3a) S. diarizonae (3b) S. houtenae (4) S. indica (5) и около 2000 серовариантов. Правильно называть: Salmonella choleraesuis serovar <i>enteritidis</i>. Salmonella choleraesuis serovar <i>typhi</i> Salmonella choleraesuis serovar <i>paratyphi A</i>
<i>Серологический метод</i>	
	Ставят РПГА с сывороткой крови больных, контактных по ОКИ (переболевших, бактерионосителей). Сыворотку крови разводят в 2 рядах лунок от 1:50 до 1: 3200. В каждую лунку первого ряда вносят эритроцитарный антигенный комплексный сальмонеллезный диагностикум (АВСДЕ), второго ряда - эритроцитарный антигенный сальмонеллезный диагностикум Vi. Титр сыворотки: последнее разведение сыворотки дающее положительную реакцию агглютинации на два креста. Диагностический титр 1: 200. Реакцию

	ставят в динамике: в день обращения и через 5-7 дней. Должно быть нарастание или снижение титра антител сыворотки. При положительной реакции с комплексным сальмонеллезным диагностиком определяют серогруппу сальмонелл в РПГА с антисыворотками серогрупп А, В, С, Д, Е. Ответ выдают по наибольшему титру антител серогруппы.
ПЦР	
	Выявляют ДНК возбудителя <i>Salmonella</i> spp. в испражнениях.

Микробиологическая диагностика брюшного тифа и паратифов

Судьба возбудителя б/тифа в организме.

1. Стадия инвазии. Палочки проникают в организм через рот, попадают в тонкий кишечник. Находятся в его просвете несколько часов, затем внедряются в солитарные фолликулы и пейеровы бляшки, частично проникают в регионарные л/у. В лимфоидном аппарате они находятся в течение всего инкубационного периода. – 14 дней.

2. Стадия бактеремии и токсимии- первая неделя болезни. По л/сосудам палочки проникают в кровь, частично разрушаются, высвобождая **эндотоксин**. Проявляются симптомами болезни: интоксикация, температура. Продолжается 1 неделю.

3. Стадия паренхиматозной диффузии. Макроорганизм старается удалить возбудитель из крови и в конце 1-ой и начале 2-ой недели болезни палочки оседают в органах богатых РЭС (печень, селезенка, костный мозг, почки, кожа). На коже появляются пятна – розеолы.

На 2-ой неделе заболевания в крови появляются АТ, ставят развернутую пробирочную РА Видаля с целью определения титров АТ.

4. Выделительно – аллергическая стадия. Под влиянием антител и фагоцитоза палочки уничтожаются во внутренних органах, но часть их сохраняется в печени и желчном пузыре, т.к. желчь элективная среда для *Salmonella*. С порцией желчи сальмонеллы снова попадают в тонкий кишечник, снова внедряются в солитарные фолликулы, уже сенсибилизированные предыдущим внедрением. В лимфатическом аппарате кишечника развивается бурное аллергическое воспаление с некрозом. Некротические ткани отторгаются и вместе с возбудителем выбрасываются наружу. Образуются язвы, перфорации кишечника. Диареи не наблюдается. **Это 3-я неделя заболевания.** В этот период исследуют фекалии (копрокультура).

5. стадия выздоровления.

Бактериологический метод диагностики	
Материал для диагностики	Возбудители брюшного тифа и паратифов – бактерии рода <i>Salmonella</i>. 1. Стадия бактеремии и токсимии- первая неделя болезни. В этот период берут кровь для выделения гемокультуры (чистая культура возбудителя, выделенная из крови). Из вены больного асептически берут не менее 10 мл крови и делают высеив на среду Рапопорт для накопления возбудителя, т.к. его обычно мало в крови. Можно использовать «двойную среду» (для факультативных анаэробов) + тиогликолевую (для облигатных анаэробов). Среды

	берут не менее 100 мл, т.к. в крови могут быть антитела, которые в небольшом объеме среды могут подавлять размножение возбудителя. В большом объеме среды АТ разводятся и не вызывают задержки роста. 2. Стадия паренхиматозной диффузии. В этот период в неясных случаях со 2-ой недели заболевания выделяют возбудителя из: - костного мозга (миелокультура). Пункция грудины под анестезией; - розеол (розеолокультура). Кожу протирают спиртом, на розеолу наносят каплю желчного бульона, скарифицируют, выступившую лимфу смешивают с желчью, отбирают пипеткой, засевают в желчный бульон. Через 24 часа пересеваяют на среду Эндо и т. д.; - мочи (уринокультура). Осадок мочи после центрифугирования засевают в желчный бульон. Инкубируют 1 сутки, затем высев петлей на среду Эндо и т.д.; - желчь (биликультура). Три порции желчи по 1 мл засевают на желчный бульон и т.д. На 2-ой неделе заболевания в крови появляются АТ, ставят развернутую пробирочную РА Видаля с целью определения титров АТ. 3. Выделительно – аллергическая стадия- 3 неделя заболевания. В этот период исследуют фекалии (копрокультура).
1 день (1 этап)	<u>Клинический материал, полученный на 2-3 недели заболевания</u> засевают на дифференциально - диагностические среды Эндо и Плоскирева, ВСА. Параллельно делается посев на среды обогащения (селинитовый бульон). <u>Исследование копрокультуры.</u> Взвесь фекалий в физиологическом р-ре 1:5 засевают в объеме 1 капли. <u>Исследование уринокультуры.</u> Проводят прямой посев мочи или осадка на плотные питательные среды и жидкие среды обогащения. <u>Исследование биликультуры.</u> Каждую порцию или смесь 3 порций желчи (А, Б, С) в объеме 0,5 мл засевают на плотные среды и (питательный бульон, т.к. желчь- хорошая среда для роста сальмонелл). Остатки желчи инкубируют при 37°C, периодически высевают на плотные среды на 3, 5, 7 и 10 сутки. Инкубируют при 37°C 18- 24 часа, ВСА – 48 часов. <u>Посев крови на гемокультуру (1 неделя заболевания).</u> Состав среды Рапопорт: МПБ + глюкоза + индикатор Андрее + желчь + поплавок. Функции желчи: - стимулирует рост б/тифозных бактерий и тормозит рост E. coli; - растворяет сгустки крови, в которых может находиться возбудитель; - подавляет активность б/тифозных АТ, которые могут находиться в исследуемом материале и вызывать задержку размножения возбудителя.

	Посевы инкубируют 10 суток, с высевом на 2, 3, 5, 7, 10 день на среду Эндо. При наличии роста на среде Рапорт наблюдается помутнение и порозовение среды в результате ферментации глюкозы. При наличии газообразования, поплавков всплывает. Т.к. начало заболевания установить трудно, кровь на гемокультуру необходимо брать у всех лихорадящих больных (неясной этиологии, длительно температурающие) в течение всего периода.
2 день (2 этап)	Изучают культуральные свойства бактерий. С плотных сред отбирают лактозонегативные колонии, с ВСА - черные, с почернением среды под колонией. Отсевают $\frac{1}{2}$ часть колонии на дифференциально – диагностическую среду типа Клиглера для накопления и сохранения чистой культуры и изучения биохимических свойств (ферментация глюкозы, лактозы, утилизации мочевины, образования сероводорода, газа), остатки колонии – на среду с цитратом натрия. Инкубируют при 37С 18- 24 часа.
3 день (3 этап)	1.Учитывают рост на среде Клиглера: - глюкоза – ферментируют до К или КГ - лактоза – не ферментируют - H₂S образуют (есть штаммы отрицательные). - мочевины не утилизируют - цитрат утилизируют. 2. Изучают антигенную структуру в РА на стекле. Ставят реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой групп АВСДЕ и сывороткой ОКА (РА должна быть отрицательной). 3. При # реакцией с поливалентной сывороткой АВСДЕ ставят: - «пестрый ряд» Гисса для изучения б/х свойств. - определяют чувствительность к антибиотикам, сальмонеллезному или брюшнотифозному бактериофагу (СБФ или БТБФ). - отсевают культуру на скошенный МПА для сохранения и накопления чистой культуры.
4 день (4 этап)	Идентификация чистой культуры: На каждый О- и Н-АГ получены морцепторные агглютинирующие сыворотки. Выделенная культура со скошенного МПА агглютинируется: 1. с поливалентной сывороткой групп АВСДЕ, # р-ция; 2. ставят РА с монорецепторными О-сыворотками: О2, О4, О6, О9, О3,10; О7, О8, О12, Vi; 2. При # реакция с одной из них - с сыворотками Н – I фазы, соответствующие по схеме Кауфмана -Уайта; 3. По обнаруженным О-АГ и Н-АГ I фазы ставят РА с сыворотками Н-II фазы, соответствующим схеме К-У. Относятся к разным серологическим группам. <u>Изучение АГ структуры по схеме Кауфмана – Уайта.</u> - S. typhi - палочка Эберта – Гаффки; (группа D) О - Аг - 9, 12, Vi;

	Н – Аг I фазы – d; Н - Аг II фазы – отсутствует. - S. paratyphi A – палочка Бриона –Кайзера (группа A): О - Аг – 1, 2, 12; Н – Аг I фазы – а; Н - Аг II фазы – 1,5. - S. paratyphi B - палочка Шотмюллера (группа B): О - Аг – 1, 4, 5, 12; Н – Аг I фазы – b; Н - Аг II фазы – 1,2. - S. paratyphi C – палочка Хиршфельдта. (группа C): О - Аг – 6, 7, Vi; Н – Аг I фазы – c; Н - Аг II фазы – 1,5. 4. учет биохимического ряда: <table><tr><th>м/о</th><th>лактоз а</th><th>глюкоз а</th><th>маннит</th><th>сахар оза</th><th>створаж и-вание молока</th><th>индол</th><th>H₂S</th></tr><tr><td>S. typhi</td><td>-</td><td>к</td><td>к</td><td>-</td><td>нет</td><td>-</td><td>+</td></tr><tr><td>S. paratyphi A</td><td>-</td><td>кг</td><td>кг</td><td>-</td><td>нет</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>S. paratyphi B</td><td>-</td><td>кг</td><td>кг</td><td>-</td><td>нет</td><td>-</td><td>+</td></tr><tr><td>Esherichia coli.</td><td>кг</td><td>кг</td><td>кг</td><td>кг</td><td>нет</td><td>+</td><td>-</td></tr></table> - подвижность (+) - цитрат утилизируют (+) 3. учет чувствительности к АБ и СБФ или БТБФ (должен быть #). Выдача ответа.	м/о	лактоз а	глюкоз а	маннит	сахар оза	створаж и-вание молока	индол	H ₂ S	S. typhi	-	к	к	-	нет	-	+	S. paratyphi A	-	кг	кг	-	нет	-	-	S. paratyphi B	-	кг	кг	-	нет	-	+	Esherichia coli.	кг	кг	кг	кг	нет	+	-
м/о	лактоз а	глюкоз а	маннит	сахар оза	створаж и-вание молока	индол	H ₂ S																																		
S. typhi	-	к	к	-	нет	-	+																																		
S. paratyphi A	-	кг	кг	-	нет	-	-																																		
S. paratyphi B	-	кг	кг	-	нет	-	+																																		
Esherichia coli.	кг	кг	кг	кг	нет	+	-																																		

Серологический метод диагностики

	<u>Реакция агглютинации Видаля.</u> 1. На 2-ой недели заболевания появляются О- сальмонеллезные АТ, на 3-ей – Н- АТ. Т.к. О-АТ появляются первыми, они в дальнейшем опережают титры Н-АТ. В процессе выздоровления О-АТ постепенно исчезают из крови, у переболевших сохраняются только Н-Ат. 2. Для профилактики б/тифа применяют вакцину, состоящую из О-АГ, т.е. в крови привитых обнаруживаются только О-АТ. Это затрудняет диагностику, т.к. трудно отличить РА у привитых от РА больных. На 2-ой неделе в обоих случаях в сыворотке обнаруживаются только О-АТ. Реакцию повторяют через 5-7 дней: - в случае болезни увеличивается титр О-АТ и появляются Н-АТ; - у привитых вторая реакция не отличается от первой. Т.к. клиника б/ тифа и паратифов сходна и имеются общие АГ (О-
--	--

	12), то РА ставят с б/т и паратифозными АГ диагностикумами и всегда 2-кратно, с интервалом 5-7 дней, т.к. наиболее доказательным считается нарастание титра АТ, хотя диагностическим титром считается 1: 200 с б/тифозным О-АГ диагностикумом. Теперь эту реакции ставят с первых дней заболевания для ускорения диагностики. При первой постановке она (-), при 2-ой (#), что рассматривают как динамику титра АТ. Исходное разведение сыворотки больного 1:100 (0,1 сыв-ки +9,9 физ. р-ра). Готовят последовательные 2-кратные разведения сыворотки в 4 рядах пробирок. - в 1-й ряд закапывают б/тифозный О- диагностикум; - во 2-й ряд – Б/тифозный Н- диагностикум; - в 3-й – комплексный ОН диагностикум паратифа А; - в 4-й – комплексный ОН диагностикум паратифа В. Ставят контроль сыворотки на спонтанную агглютинацию и контроли всех диагностикумов. Учет через 18-20 часов. Просматривают контроли и сравнивают каждую пробирку в ряду начиная с последней. Титр сыворотки – наибольшее разведение сыворотки в котором есть РА. <u>РПГА с эритроцитарными сальмонеллезными диагностикумами.</u> Готовят разведение сыворотки больного в 2-х рядах лунок. - в 1-й ряд вносят комплексный сальмонеллезный эритроцитарный О- АГ диагностикум (групп А,В,С1,С2,Д,Е); - во 2-ой – эр. Vi АГ эритроцитарный диагностикум. При # реакции с комплексным диагностикумом разворачивают РПГА с эр. диагностикумами группы А, группы В, С, С1, Д, Е. При # реакции (зонтик) в титре 1:200 и выше, выдают ответ: напр., сальмонеллы группы А. С Vi АГ эритроцитарным диагностикумом реакция #.
<i>Диагностика брюшнотифозного носительства</i>	
	После перенесенного заболевания в 3-5% случаев формируется <u>б/тифозное носительство</u>: возбудитель сохраняется в печени, желчном пузыре, костном мозге. Б/тифозные палочки имеют Vi-АГ, значит, в крови будут обнаруживаться Vi – АТ. Как и О-АТ, они держаться недолго, исчезают через месяц после заболевания. Обнаружение Vi – АТ говорит об остром заболевании или бактерионосительстве. Для выявления б/тифозного носительства всех переболевших обследуют в РПГА (Vi - гемагглютинация). К разведениям сыворотки больного добавляют эритроцитарный Vi-Аг диагностикум (на эритроцитах сорбирован Vi- АГ). Положительная реакция – «зонтик». Диагностический титр 1:100. Доказательством б/тифозного носительства является выделение возбудителя: - копрокультура - уринокультура

	- биликультура. Проводится многократно. Перед выпиской больной 3-кратно обследуется на носительство и ставится на учет. Периодически обследуется.
--	---

Контрольные вопросы.

Сальмонеллы. Классификация по Кауфману-Уайту.

Патогенность для человека и животных.

Сальмонеллы – возбудители брюшного тифа и паратифов А, В.

Биологические свойства.

Антигенная структура.

Патогенез заболеваний.

Патогенетические основы микробиологической диагностики.

Особенности иммунитета.

Бактерионосительство.

Специфическая профилактика и этиотропная терапия.

Сальмонеллы – возбудители сальмонеллезов.

Патогенез.

Роль энтеро- и эндотоксинов в возникновении диарейного синдрома.

Микробиологическая диагностика.

Этиотропная терапия.

Сальмонеллы – возбудители госпитальных инфекций.

Занятие № 10. Микробиологический метод диагностики холеры.

Возбудители	<i>Vibrio cholerae</i> .
Материал для диагностики	Испражнения, ректальные мазки, рвотные массы, промывные воды желудка, пищевые продукты при ПТИ.
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
(1 этап) 0 часов	Клинический материал засевают пипеткой на I среду накопления (1% пептонная вода) Инкубируют при 37С 6-8 часов.
(2 этап) через 6-8 часов от начала исследования	1.С I среды накопления бактериологической петлей делают высев на ЩА (щелочной агар) и/или среду TCBS (тиосульфат- цитрат- бромтимоловый –сахарозный агар); 2.Пересевают петлей на II среду накопления (1% п.в. с теллуридом калия). Инкубируют при 37С 12-16 часов.
(3 этап) Через 12- 14 часов	Высевают бактериологической петлей со II среды накопления (1% п.в.) на ЩА. Инкубируют при 37С 6-8 часов.
(4 этап) 18-20часов	1.изучают культуральные свойства бактерий с I среды накопления. ЩА – круглые, плоские, гладкие, голубоватые колонии с ровными краями; TCBS – ярко- желтые, полупрозрачные, мелкие колонии на синем фоне среды. 2.подозрительные колонии проверяют в реакции агглютинации на стекле с холерными сыворотками O1, O139 и RO в разведениях 1:50 и 1:100; 3.готовят препарат по Грамму: Гр(-), изогнутые или прямые палочки, спор и капсул не образуют; 4.готовят препарат «раздавленная капля» - подвижные изогнутые или прямые палочки. 5. готовят препарат МФА. Ярко-зеленое свечение по контуру изогнутых палочек. 6. остатки подозрительных колоний отсевают на полиуглеводные среды (Клиглера, Ресселя, лактозно- сахарозный агар) и на косячок ЩА для выделения, сохранения чистой культуры и изучения биохимических свойств вибриона. Инкубируют при 37С 18- 24 часа.

(5 этап) 24-26 часов	1. со II среды накопления на ЩА изучают культуральные, антигенные, морфологические свойства вибрионов, подозрительные колонии откалывают на полиуглеводные среды (см. 4 этап).																		
36-38 часов	2.Учитывают рост на полиуглеводных средах: - глюкоза –ферментируют до К; - лактоза – не ферментируют; - H ₂ S не образуют; - мочевины не утилизируют; - цитрат не утилизируют; - сахарозу ферментируют до К. 3. с чистой культуры проводят идентификацию микроорганизмов: - бактериоскопия; - реакция иммобилизации с холерными сыворотками O1, O139, RO. Готовят два препарата «раздавленная капля», в один вносят холерную сыворотку. Вибрионы теряют свою подвижность. - ставят пробу с оксидазой – «+» - ставят РА на стекле с холерными сыворотками 1:50 и 1:100 O1, O139, RO, Огава, Инаба; - определяют чувствительность к антибиотикам; - ставят полный биохимический ряд; - определяют биовары Эль-Тор и классика: А) ставят РГА (реакция гемагглютинации) с куриными эритроцитами; В) определяют гемолиз на чашке КА с эритроцитами барана; С) отсевают на агар с полимиксином; Д) проба с фагами Эль-Тор и С IV;																		
56-72 часа	Идентификация чистой культуры: 1. учет биохимического ряда: - сахароза К - лизин + - манит + - мальтоза + - пептонизация молока + - крахмал + - индол +; 3. учет чувствительности к АБ; 4. определение биоваров: <table><tr><td>Признак</td><td>Vibrio cholerae asiatica</td><td>Vibrio cholerae el-tor</td></tr><tr><td>Лизис фагом С IV</td><td>#</td><td>-</td></tr><tr><td>Лизис фагом Эль-Тор</td><td>-</td><td>#</td></tr><tr><td>РГА с куриными эритроцитами</td><td>-</td><td>#</td></tr><tr><td>Рост на агаре с полимиксином</td><td>-</td><td>#</td></tr><tr><td>Гемолиз эритроцитов барана</td><td>-</td><td>#</td></tr></table>	Признак	Vibrio cholerae asiatica	Vibrio cholerae el-tor	Лизис фагом С IV	#	-	Лизис фагом Эль-Тор	-	#	РГА с куриными эритроцитами	-	#	Рост на агаре с полимиксином	-	#	Гемолиз эритроцитов барана	-	#
Признак	Vibrio cholerae asiatica	Vibrio cholerae el-tor																	
Лизис фагом С IV	#	-																	
Лизис фагом Эль-Тор	-	#																	
РГА с куриными эритроцитами	-	#																	
Рост на агаре с полимиксином	-	#																	
Гемолиз эритроцитов барана	-	#																	

	Выдача ответа: Vibrio cholerae O1, серовар Инаба, биовар asiatica Vibrio cholerae O1 серовар Инаба, биовар el-tor Vibrio cholerae O139
<i>ПЦР</i>	
	Выявляют ДНК возбудителя Vibrio cholerae в испражнениях

Контрольные вопросы.

Семейство Vibrionaceae.

Таксономия.

Характеристика основных свойств.

Холерные вибрионы, биологические свойства, биовары.

Классификация вибрионов по Хейбергу.

Факторы патогенности.

Токсины и их характеристика.

Патогенез и иммунитет при холере.

Роль экосистемного механизма в распространении холеры.

Вибрионосительство.

Методы микробиологической диагностики.

Специфическая профилактика и терапия холеры.

Занятие № 10. Микробиологический метод диагностики хеликобактериоза.

Возбудитель	<i>Helicobacter pylori</i> .
Материал для диагностики	Биоптат из пораженного участка слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки.
Бактериологический метод диагностики	
1 день	Испражнения засевают на селективные питательные среды через мембранные фильтры с диаметром пор 0,65 мкм. Используют плотные питательные среды с добавлением гемолизированной крови (КА или ША), нейтрального угля (для удаления токсичных продуктов метаболизма), аминокислот, 3-4 антибиотиков для подавления сопутствующей флоры (ванкомицин, налидиксовая кислота, амфотерицин В), сердечно- мозговой настоей. Инкубируют 48-72 часов при 37С в микроаэрофильных условиях (не более 5% O ₂ , 10% CO ₂ , 90% N). Используют газогенераторные пакеты, которые смачиваю водой перед помещением в анаэроустат.
3-4 день	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> мелкие блестящие прозрачные размером 1 мм. <i>Бактериоскопия.</i> Мазки окрашивают по Грамму – мелкие S-образные или спиралевидно (2-3 завитка) изогнутые грамотрицательные палочки. Темнопольная микроскопия – характерные штопорообразные движения. <i>Изучение биохимических свойств:</i> - гемолитическая активность (α- гемолиз); - уреазная активность; - каталазная активность (+); - оксидаза (+); - образование H₂S (+); - отсутствие роста при 25 и 42С; - свертывание молока (-). Инкубируют 24-48 часов при 42С в микроаэрофильных условиях.
6-7 день	Учет биохимических свойств.
ПЦР	
	Выявляют ДНК возбудителя <i>Campylobacter spp.</i> в испражнениях
Серологический метод	
	ИФА. Выявление в сыворотке крови специфических антител. Наиболее доступный и надежный метод. Позволяет следить за динамикой титра антител в ходе лечения больного.
Биохимические методы.	

	- определение уреазной активности в биоптате. Биоптат помещают в бульон с мочевиной и индикатором pH. Происходит изменение цвета в результате гидролиза мочевины с образованием аммиака; - дыхательный тест на уреазу. После перорального приема мочевины, меченной радиоактивным изотопом, определяют присутствие меченной двуокиси углерода в выдыхаемом воздухе, что говорит об активности уреазы.
--	---

Занятие № 10. Микробиологический метод диагностики кампилобактериоза.

Возбудители	Campylobacter fetus, C. jejuni, C. coli, C. lari.
Материал для диагностики	Материал – испражнения, ректальные мазки, при генерализованной форме – кровь, ликвор.
Бактериологический метод диагностики	
1 день	Испражнения засевают на селективные питательные среды через мембранные фильтры с диаметром пор 0,65 мкм. Используют плотные питательные среды с добавлением гемолизированной крови или нейтрального угля (для удаления токсичных продуктов метаболизма), аминокислот, 3-5 антибиотиков для подавления сопутствующей флоры, вещества, снижающие ОВП (тиогликолят натрия, метабисульфит натрия, пируват натрия). Инкубируют 48-72 часов при 42С в микроаэрофильных условиях (не более 5% O₂, 10% CO₂, 90% N). Используют газогенераторные пакеты, которые смачиваю водой перед помещением в анаэробстат.
3-4 день	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> плоские влажные слизистые сероватые колонии с неровными краями или мелкие блестящие выпуклые размером 1-2 мм. <i>Бактериоскопия.</i> Окрашивают по Грамму – мелкие S- образные или спиралевидно (2-3 завитка) изогнутые грамотрицательные палочки. Темнопольная микроскопия – характерные штопорообразные движения. <i>Изучение биохимических свойств:</i> - гемолитическая активность (-); - каталазная активность (+); - гидролиз гиппурата (C. jejuni +); - образование H₂S (±); - восстановление нитритов (±); - чувствительность к налidikсовой кислоте (±); Инкубируют 24-48 часов при 42С в микроаэрофильных условиях.
6-7 день	Учет биохимических свойств (для дифференцирования видов Campylobacter).
ПЦР	
	Выявляют ДНК возбудителя Campylobacter spp. в испражнениях

Контрольные вопросы.

Кампилобактерии.

Хеликобактерии.

Таксономия.

Морфологические, культуральные, биохимические и серологические свойства.

Патогенность для человека и животных.

Патогенез кампилобактериозов у человека.

Роль хеликобактерий в возникновении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Микробиологическая диагностика.

Этиотропная терапия.

Занятие № 12. Микробиологический метод диагностики дифтерии

Возбудитель	<i>Corynebacterium diphtheria</i> , токсигенный штамм.
Материал для диагностики	Мазки из зева и носа, пленки с миндалин и носоглотки. Материал берут двумя стерильными тампонами, один используют для посева, другой – для приготовления мазков.
<i>Бактериоскопический метод.</i>	
	Мазки окрашивают по Грамму, метиленовым синим по Леффлеру. Обнаруживаются палочки расположенные «частоколом», «иероглифами», «римскими пятерками – V» с зернами волютина на концах. Грамположительные; при окраске метиленовым синим – явление метакромазии – неравномерное окрашивание палочек, интенсивное окрашивание зерен волютина (темно-синий, черный цвет).
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
1 день	Посев материала с тампонов на чашку с КТА (кровяно - теллуриновый агар). От одного больного делают посев с двух тампоном на 1 чашку. Инкубируют при 37°C 24-48 часов.
3 день	<i>Изучение морфологии</i> выросших колоний: <i>v. gravis</i> - серовато – черные колонии с радиальной исчерченностью поверхности - «цветок маргаритки», <i>v. mitis</i> - выпуклые черные гладкие колонии. <i>Микроскопия</i> подозрительных колоний. <i>Изучение биохимической активности:</i> 1. Наличие цистиназы (основной признак) – посев уколом в столбик среды Пизу; 2. Ферментации углеводов – глюкозы, сахарозы, крахмала, мочевины. Вносят 1 петлю материала в 0,3 мл физ.раствора, затем вносят бумажные диски с углеводами и индикаторами pH (СИБ – система индикаторных бумаг). Если материала недостаточно для изучения сахаролитических свойств, остатки колонии отсевают на скошенный сывороточный агар для накопления и сохранения выделенной культуры. <i>Изучение наличия токсигенности</i> (тест Илика, реакция

	преципитации в агаре). В чашку с питательным агаром кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной антитоксином (антитоксической противодифтерийной сывороткой). По краям от полоски засевают культуру бляшками на расстоянии 0,5 см от полоски и 0,5 см между бляшками. Инкубируют при 37С 24-48 часов.						
4 день	Учет биохимических свойств:						
	Вид, биовар	ферментация			цистин аза	уреаза	токси- генност ь
		глюкоз ы	сахароз ы	крахмал а			
	C.difhtheria v. gravis	+	-	+	+	-	±
	C.difhtheria v. mitis	+	-	-	+	-	±
	C.xerosis	+	+	-	-	-	-
	C. pseudodiph- thericum (палочка Хофманна)	+	-	-	-	+	-
Учет токсигенности через 24 часа. Постановка биохимического ряда со скошенного сывороточного агара. Инкубируют при 37С 24-48 часов							
5 день	Учет токсигенности через 48 часов. При размножении токсигенной культуры в месте соединения токсина с антитоксическими антителами образуется преципитат в виде белых линий – «усов». Учет биохимических свойств со скошенного агара. Выдача результата: выделена культура Corynebacterium difhtheria v. gravis (v. mitis), токсигенный (атоксигенный) штамм.						
ПЦР – диагностика, ИФА.							
	Материал для исследования – мазки из зева и носа, пленка с миндалин, подозрительные колонии с КТА. Обнаруживают tox – ген, контролирующий синтез дифтерийного токсина.						
Серологический метод.							
	РПГА (реакция пассивной гемагглютинации). Исследуют: - сыворотку больного до введения ему антитоксической сыворотки. - сыворотку здоровых лиц на наличие защитного титра антитоксических антител. В норме титр защитных антител должен быть не ниже 1:40 - 1: 320. У больного антитела отсутствуют или титр ниже защитного уровня. Здоровые лица при низком уровне антител подлежат ревакцинации						

	противодифтерийным анатоксином. Исследуемую сыворотку разводят методом серийных разведений от 1:10 до 1:1280. В каждую лунку вносят каплю эритроцитарного антигенного диагностикума (токсин). Положительная реакция – «зонтик», отрицательная – «пуговка». Титр сыворотки – последнее разведение, где есть реакция агглютинации на ++.
--	--

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Экология.

Возбудитель дифтерии.

Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Резистентность.

Биовары.

Дифференциация возбудителя дифтерии и условно-патогенных коринебактерий.

Факторы патогенности, дифтерийный токсин.

Патогенез дифтерии.

Антитоксический иммунитет.

Бактерионосительство.

Лабораторная диагностика.

Специфическое лечение и профилактика.

Занятие № 12. Микробиологический метод диагностики коклюша и паракоклюша

Возбудитель	коклюша - <i>Bordetella pertussis</i> ; паракоклюша - <i>Bordetella parapertussis</i> .
Материал для диагностики	Мокрота, слизь из носоглотки. «Метод кашлевых пластинок» – подносят чашку с питательным агаром ко рту кашляющего ребенка, держат в течение 6-8 кашлевых толчков.
<i>Бактериологический метод диагностики</i>	
1 день	Материал засевают на КУА (кровяно – угольный агар), среду Борде – Жангу (картофельно- глицериновый кровяной агар). В агар добавляют пенициллин для угнетения посторонней флоры. Инкубируют 48-72 часа при 37С.
3-4 день	<i>Изучение морфологии</i> выросших колоний. Рост мелких выпуклых влажных блестящих колоний. На КУА – серовато- кремового цвета, на среде Борде-Жангу – жемчужный или ртутный блеск. <i>Бактериоскопия.</i> В мазках по Грамму видны овоидные грамотрицательные палочки. <i>Иммунологическая реакция.</i> С подозрительными колониями ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с коклюшной и паракоклюшной сыворотками. При положительном результате ставят реакцию агглютинации с сыворотками к факторам 1, 7, 14, 12. Учет: <i>Bordetella pertussis:</i> положительная реакция с антисыворотками к факторам 1, 7; <i>Bordetella parapertussis:</i> к факторам 7, 14; <i>Bordetella bronchiseptica:</i> к факторам 7,12. <i>Изучение биохимических свойств.</i> Определяют уреазную активность.
5день	<i>B. pertussis</i> и <i>B. parapertussis:</i> уреазы #
<i>ПЦР – диагностика, ИФА.</i>	
	Материал для исследования – мокрота, слизь из носоглотки, подозрительные колонии с КУА. Обнаруживают ДНК возбудителя.
<i>Серологический метод.</i>	
	ИФА, РСК. Ретроспективный диагноз. Агглютинины появляются на 3-4 неделе заболевания в титрах 1:20 и выше. В условиях массовой вакцинации имеет значение нарастание титра антител в динамике заболевания через 4-5 дней.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Характеристика основных свойств бордетелл.

Возбудитель коклюша. Морфологические, культуральные, антигенные свойства.

Патогенность для человека и локализация в организме.

Патогенез заболевания у человека. Иммунитет.

Лабораторная диагностика.

Дифференциация возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхосептикоза.

Специфическая профилактика.

Этиотропная терапия.

Занятие № 13. Микробиологический метод диагностики туберкулеза

Возбудитель	Mycobacterium tuberculosis M. bovis M. avium
Материал для диагностики	При легочном tbc- мокрота, отделяемое свищей, моча, промывные воды бронхов, бронхоальвеолярная жидкость, плевральный экссудат, промывные воды желудка; При внелегочном – материал в зависимости от локализации поражения (кровь, ликвор, моча, синовиальная жидкость, тканевые биоптаты, испражнения).
Бактериоскопический метод.	
	1. Материал обрабатывают муколитическими агентами (N – ацетил-L-цистеин). Мазки готовят с применением методов накопления: гомогенизации и флотации. Окраска по Цилю – Нильсену выявляет красные кислотоустойчивые палочки. Метод положительный при содержании возбудителя 5-10 тыс. в 1 мл материала. Метод гомогенизации: материал смешивают с равным объемом NaCl и NaOH, встряхивают, инкубируют 30 минут при 21С, центрифугируют, супернатант удаляют, осадок нейтрализуют 30% раствором уксусной кислоты, готовят мазки. Метод флотации: в материал вносят раствор NaOH, дистиллят и ксилол (бензин), длительно встряхивают. Пленку из капель бензина с захваченными микобактериями отсасывают, из нее готовят мазки. 2.МФА (ЛСМ). Мазки обрабатывают антисывороткой, меченой флюорохромом (ауромин- родамин). Микобактерии окрашиваются в бело- желтый цвет. Метод позволяет обнаружить формы с измененными культуральными и тинкториальными свойствами.
Бактериологический метод.	
1 день	1.Материал обрабатывают 15% раствором кислоты (H ₂ SO ₄), центрифугируют, отмывают физиологическим раствором и засевают, втирая, на плотные питательные среды (Левенштейна – Йенсена, среда Финна II). Инкубируют при 37С при содержание CO ₂ 5-10%. от 2 до 8 недель. Минимальный срок инкубации 8 недель. Метод положительный при содержании возбудителя 10-30 жизнеспособных клеток в 1 мл материала.

	2.Метод микрокультур Прайса. На предметных стеклах делают толстые мазки, высушивают обрабатывают несколько минут в 2-6% H ₂ SO ₄ и нейтрализуют. Погружают в флаконы с гемолизированной цитратной кровью, инкубируют 7-14 дней.
Просмотр: 3-5 день; далее 2 раза в неделю; с 5 недели – 1 раз в неделю; отсутствие роста через 8 недель – отрицательный результат.	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> 1.На среде Левенштейна – Йенсена – светло- кремовые сухие, морщинистые, крошковатые, приподнятые над поверхностью среды колонии с приятным запахом. <i>Бактериоскопия</i> по Цию – Нильсену выявляет красные кислотоустойчивые палочки или ганулы (зерна Муха). <i>Изучение биохимических свойст:</i> - рост при 20С (+); - рост при 37С (+); - рост при 52С (+); - каталаза (+); - оксидаза (+); - рост на МПА (-); - ниациновая проба (синтез никотиновой кислоты) (+); -пигментообразование; - скорость роста; 2. По Прайсу: предметные стекла с выросшей культурой фиксируют, окрашивают по Цию – Нильсена, микроскопируют. Вирулентные штаммы растут в виде жгутов или кос (действие корд- фактора). Инкубируют 2 до 12 недель при 37С. 3. Параллельно засевают выделенную культуру обработанную антибиотиками методом серийных разведений на плотные питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Инкубируют 3 недели- 3 месяца. МПК <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : стрептомицин 5 мкг/мл, ПАСК – 10 мкг/мл, тубазид- 1 мкг/мл, циклосерин и этионамид – 30 мкг/мл. Бактерии резистентны, если более 1% клеток чистой культуры образуют колонии при указанной концентрации.
80-90 суток	Учет биохимических свойств, чувствительности к антибиотикам. Выдача результата.
<i>Биологический метод.</i>	
	2-3 мл материала, обработанного серной кислотой и нейтрализованного, вводят подкожно морской свинке и кролику с отрицательными туберкулиновыми реакциями. Через 4 мес, животное забивают проводят макро- и микроскопическое исследование органов. Делают посевы. <i>M. tuberculosis</i> высокопатогены для морских свинок, малопатогены для кроликов; <i>M. bovis</i> высокопатогены для кроликов.
<i>Аллергический метод.</i>	

	Проба Манту ставят с 2 ТЕ для выявления больных и отбора контингента, подлежащего ревакцинации БЦЖ. Детям и подросткам проводится ежегодно независимо от предыдущих результатов. Вводят 0,1 мл в/к. Учет через 72 часа. - отрицательный результат: отсутствует инфильтрат и гиперемия-ребенок здоров, но отсутствует иммунитет. Нужна ревакцинация; - папула до 5 мм в диаметре - норма, человек здоров и имеет специфический надежный иммунитет. Вторичное поступление МБТ ведет к активации Т-клеток, цитотоксической реакции и образованию папулы. Это кладбище погибших клеток. Реакция строго специфична; - положительная – папула более 5 мм – тубинфицированность. Манту с 5 и 10 ТЕ – только в противотуберкулезном диспансере для клинической диагностики и лечения больных.
<i>Серологический метод.</i>	
	ИФА, РСК, РНГА. Антитела выявляются не только при активном процессе, но и при инфицировании и вакцинации.
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаружение н.к. бактерий в клиническом образце после обогащения - ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis</i>; - комплекс <i>M. avium</i> и <i>M. kansasii</i>; - комплекс <i>M. tuberculosis</i>, <i>M. bovis</i>/ BCG, <i>M. africanum</i>.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Экология.

Возбудитель туберкулеза. Морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и аллергенные свойства.

Особенности химического состава и резистентность.

Факторы патогенности.

Патогенез туберкулеза.

Особенности иммунитета.

Лабораторная диагностика.

Специфическое лечение и профилактика.

Антимикробные препараты.

Возбудители микобактериозов.

Возбудитель лепры. Морфология, культивирование.

Патогенез заболевания.

Иммунитет.

Лабораторная диагностика.

Антимикробные препараты.

Занятие № 14. Микробиологический метод диагностики сибирской язвы.

Возбудитель	Bacillus anthracis.
Материал для диагностики	Материал – экссудат из очага поражения (сибиреязвенного карбункула), мокрота, фекалии, кровь, потенциально инфицированное сырье животного происхождения. От павшего животного берут ухо с той стороны, на которой лежал труп, туго перевязывают в двух местах и отрезают. Разрез между перевязками делают осторожно, чтобы кровь не попала на землю. Место разреза прижигают. Ухо, в перевязанном состоянии, заворачивают в пергаментную бумагу, смоченную 3% р-ром карболовой кислоты, упаковывают в металлический ящик, отправляют в лабораторию с нарочным.
<i>Бактериоскопический метод.</i>	
	Павших животных не вскрывают! Готовят мазки крови из перефирических вен уха. Мазки высушивают на воздухе, не фиксируют, тщательно упаковывают. Место надреза прижигают и смачивают креолином. Кровь берут только у свежего трупа. - окрашивают по Грамму; В препаратах - мазках – капсульные палочки; - МФА.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день	Посев на плотные среды (КА, МПА). Посев крови на среды обогащения (МПБ) Инкубируют при 37С 18-20 часов.
2 день	<i>Изучение морфологии выросших колоний:</i> На бульоне рост в виде хлопьевидного осадка, бульон остается прозрачным (R-форма). В S –форме – равномерное помутнение. На агаре вирулентные штаммы образуют колонии в R- форме – крупные 3-5 мм, матовые, непрозрачные, шероховатые, с изрезанными краями. Авирулентные или слабовирулентные штаммы образуют S- форму - круглые гладкие колонии с ровными краями. На КА гемолиз отсутствует. <i>Бактериоскопия:</i> 1.Под малым увеличением микроскопа колония имеет вид «головы

	медузы» или «львиной гривы» из-за цепочечного расположения палочек, которые образуют нити, отходящие от центра. 2. Готовят мазок, окрашивают по Грамму – видны крупные грамположительные палочки, расположенные цепочкой («бамбуковая трость»). Спора располагается центрально, не деформирует клетку. Имеется капсула. 3. МФА. <i>Получение чистой культуры для изучения биохимических свойств:</i> посев на скошенный МПА. Инкубируют при 37С 18-20 часов.
3 день	<i>Изучение биохимических свойств:</i> - посев на среды «пестрого ряда» - ферментирует сахара с образованием кислоты без газа; - биостаза (+); - медленно разжижает желатин (елочка верхушкой вниз); - цитохромоксидаза (+); - каталаза (+); - пероксидаза (+); уреазная, лицитиназная, фосфатазная активность (-) (NB !) - гемолитическая активность (-); - образует H₂S; - феномен «жемчужного ожерелья». На агаре содержащем 0,05-0,5 ЕД/мл пенициллина через 3 часа роста бациллы переходят в L-форму: образуются шаровидные формы, располагающиеся цепочкой - феномен «жемчужного ожерелья»; - чувствительность к бактериофагу (+) Инкубируют при 37С 18-20 часов.
4 день	Учет биохимических свойств, чувствительности к антибиотикам. Выдача результата.
<i>Биологический метод.</i>	
	Материал вводят подкожно белым мышам у корня хвоста 0,1 мл, морским свинкам в область спины 0,2 мл. Гибель через 36-48-72 часов; <i>Бактериоскопия.</i> Павших животных вскрывают, готовят мазки из паренхиматозных органов и крови. - окрашивают по Грамму; В препаратах - мазках – капсульные палочки; - МФА. После 5-18 ч после заражения палочки можно обнаружить в экссудате. <i>Делают посевы для выделения чистой культуры.</i>
<i>Аллергический метод.</i>	
	Внутрикожно вводят 0,1 мл антраксина на внутреннюю поверхность предплечья. Антраксин - белково-полисахаридно-нуклеиновый комплекс, извлекаемый при гидролизе из бацилл. При положительной реакции через 24 часа появляются гиперемия и инфильтрат. Положительная проба выявляет сенсibilизацию у больных (со 2-ой нед. заболевания), переболевших и привитых

	(РГЗТ). Проявляется в первые дни болезни или после вакцинации и сохраняется несколько (30) лет.
<i>Серологический метод.</i>	
	1.ИФА, РНГА - исследуемый материал и выделенная культура исследуется на наличие «протективного антигена» и токсинов; 2.Реакция термопреципитации Асколи.. Обнаруживают термостабильный О-Аг. Из материала (животное сырье, трупы) извлекают гаптен (простерилизованный в автоклаве материал измельчают, экстрагируют 16-20 часов при 8-14 °С в физ. растворе и фильтруют). Экстракт наслаивают на сибиреязвенную сыворотку. Преципитирующую сибиреязвенную сыворотку получают путем гипериммунизации лошадей убитой культурой <i>B. anthracis</i>. В «+» случае в течении 15 сек, но не позже 2 мин образуется кольцо преципитации на границе 2-х сред. 3.Для выявления антител: латекс-агглютинация и пассивная агглютинация с протективным сибиреязвенным антигеном.
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК возбудителя: - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Экология.

Возбудитель сибирской язвы.

Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

Резистентность.

Патогенность для человека и животных.

Факторы патогенности, токсины.

Патогенез заболевания у человека, иммунитет.

Микробиологическая диагностика.

Специфическое лечение и профилактика сибирской язвы.

Возбудители пищевых токсикоинфекций.

Занятие № 14. Микробиологический метод диагностики лептоспироза.

Возбудитель	<i>Leptospira interrogans</i>
Материал	Кровь, ликвор, моча.
<i>Бактериоскопический метод.</i>	
	Кровь, ликвор – исследуют в первые 5 дней, мочу - с 10 дня болезни. Готовят препарат «раздавленная капля», микроскопируют в темном поле зрения. Видны серебристые лептоспиры в виде изогнутых нитей длиной 6-9 мкм с первичными и вторичными завитками и загнутыми крючкообразными концами (S- образная форма). Характерны движения: поступательное, вращение на месте, перемещение по кругу.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день	Посев на: - водно – сывороточную жидкую среду; - фосфатно- сывороточную среду. Материал засеваю у постели больного в 2-3 пробирки, заливают вазелиновым маслом. Инкубируют при 28С 2месяца.
Через каждые 5-6 дней	<i>Бактериоскопия:</i> - готовят препарат «раздавленная капля», смотрят в темном поле зрения. - МФА. <i>Изучение морфологии культур.</i> <i>Серологическая идентификация: ставят РА с набором диагностических сывороток</i>
2 месяца	Учет биохимических свойств, чувствительности к антибиотикам. Выдача результата.
<i>Биологический метод.</i>	
	Материал вводят внутрибрюшинно морским свинкам. Наблюдают 1 месяц. <i>Бактериоскопия.</i> Павших или заболевших животных вскрывают, готовят мазки из крови, мочи, паренхимы почек. - готовят препарат «раздавленная капля», смотрят в темном поле зрения. - МФА.

	<i>Делают посевы для выделения чистой культуры.</i>
<i>Серологический метод.</i>	
	Антитела можно выявить с конца 1 недели болезни. РМАЛ (реакция микроагглютинации и лизиса). К разведениям сыворотки больного вносят живые культуры лептоспир разных серогрупп и сероваров (13). Инкубируют 1 час при 28С. Готовят препарат «раздавленная капля», смотрят в темном поле зрения. При положительной реакции отмечают агглютинацию (агломераты в виде паучков) и лизис лептоспир (полное или частичное расплавление лептоспир). Диагностический титр 1:100. Максимальный титр на 15-30 день болезни 1:1000- 1:10 000.
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК <i>Leptospira species</i> (патогенные геновиды) - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Характеристика.

Дифференциация основных свойств.

Возбудители лептоспироза.

Морфологические, культуральные свойства.

Серовары лептоспир.

Патогенность для человека и животных.

Патогенез лептоспирозов.

Иммунитет.

Микробиологическая диагностика.

Специфическая профилактика.

Лечение.

Занятие № 15. Микробиологический метод диагностики бруцеллеза.

Возбудитель	Brucella abortus, B. Melitensis, B. suis
Материал для диагностики	Острый, лихорадочный период: кровь, ликвор, пунктат грудины (при нейробруцеллезе). Хронический период: моча, желчь, мокрота (редко), секционный материал. Пунктат из сустава брать бесполезно, т.к. это проявление аллергической реакции. От животных - абортированный плод, содержимое желудка (легко получить материал), молоко.
<i>Бактериологический метод.</i>	
	Культуру трудно выделить. Выделяют только у больных с B. melitensis в лихорадочном периоде, у хронических больных не выделяется. - по Костанеда: 5-10 мл крови из локтевой вены засевают в 3 флакона с 50-100 мл печеночного бульона. Два из них инкубируют в условиях 10% CO₂. Рост через 10 дней- 1-1,5 мес (45 дней): помутнение, слизистый осадок, в мазках грамотрицательные коккобациллы. Ставят РА на стекле с агглютинирующими сыворотками, определяют чувствительность к фагу. - посев на плотные среды с ингибиторами посторонней м/ф (генцианвиолет, пенициллин). Преимущества: рост через 2-3 сут, быстрый ингибируется посторонняя микрофлора посев min количества крови. Засевают 5-6 чашек по 0,2- 0,3 мл культура сохраняет Ag состав в свернутой крови выделить нельзя. Вид бруцелл определяют по: -потребности в CO₂ (# у B.abortus); -образованию H₂S (B. melitensis не образует); -росту на средах с бактериостатиками (фуксин, тионин) - (B. suis не растет с тионином); -агглютинации специфическими сыворотками; -уреазной активности (нет у B.abortus);

	-пробе с ТБ (тбилисский бактериофаг) - (# только у V.abortus);
<i>Биологический метод.</i>	
	Биопроба. Для выделения культуры из загрязненного материала. Вводят п/к, в/брюшино, н/к морским свинкам и белым мышам. Вскрывают через 20- 30 дней. Кусочки органов и л/у засевают на питательные среды для получения ч.к.
<i>Серологический метод.</i>	
	В начале инкубационного периода и заболевания появляются неполные АТ, держаться долго – до 5-10 лет. Полные АТ появляются через месяц после заболевания, максимальных титров достигают к 6 мес и держаться до года. 1. реакция Хеддельсона. Неразведенную сыворотку больного раскапывают на стекле в объемах 0,04, 0,02, 0,01 мл; в каждый объем вносят концентрированный единый бруцеллезный диагностикум. Учет: РА в объеме А) 0,04 – слабоположительная реакция; Б) 0,04 и 0,02 мл – положительная; В) во всех трех объемах – резко положительная. Реакция положительная в начале заболевания (неполные АТ), в остром и хроническом периоде. Р-ция качественная, говорит о заражении, но не о заболевании. При отрицательном результате р. Райта можно не ставить. 2. реакция Райта. Пробирочная реакция агглютинации. Сыворотку больного разводят от 1:25 до 1:800, вносят разведенный 1:10 бруцеллезный диагностикум. РА в титре 1:100 – слабоположительная; 1:200-1:400 – положительная; 1:800 – резко положительная. Реакция положительная в острой и подострой стадии заболевания. Выявляет только полные АТ. Феномен «зоны или прозоны» - т.к. много неполных АТ агглютинации не наблюдается в низких разведениях сыворотки, в следующих разведениях РА положительная. 3. РНГА (выявляет неполные АТ, положительна в начале заболевания и до 1 года); 4. р-ция Кумбса (выявляет неполные АТ, положительная в начале заболевания и на протяжении всего периода). У хр. больных р. Хеддельсона сомнительная, р. Райта отрицательная, р.Кумбса положительная, т.к. выявляет неполные АТ. Серологические реакции могут быть отрицательными у людей с иммунодефицитами; 5. ИФА. Положительный титр 1:400; 6. РСК, ОФР, МФА;
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК Brucella species - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.

Аллергический метод	
	<u>Кожно-аллергическая реакция Бюрне с бруцеллином.</u> Ставится в комплексе с серологическими реакциями. Положительная у больных, переболевших, вакцинированных. В основе лежит РГЗТ, алергизация наступает через 3 мес. Пока в организме есть единичные клетки бруцелл реакция положительная. Держится более 10 лет. Тяжелым больным реакция не ставится, могут развиваться некрозы. Ставят здоровым людям перед вакцинацией, при обследовании очага, хроническим больным в стадии ремиссии.
<i>Сроки постановки реакций</i>	- бактериологический, р. Хеддельсона, р. Райта, РНГА – острый и подострый период. -р. Кумбса, р. Бюрне, р. Хеддельсона – хронический бруцеллез. -р. Хеддельсона, р. Райта – эпидобследование.

Контрольные вопросы.

Таксономия.

Характеристика основных свойств.

Морфологические, культуральные, биохимические признаки.

Антигенное строение.

Дифференциация бруцелл.

Патогенность для человека и животных.

Факторы патогенности.

Патогенез и иммунитет при бруцеллезе.

Методы микробиологической диагностики.

Препараты для специфической профилактики и терапии.

Занятие № 15. Микробиологический метод диагностики туляремии

Возбудитель	Francisella tularensis.
Материал для диагностики	Материал: гной из бубонов, пунктат лимфатических узлов, мокрота, кровь, секционный материал.
<i>Бактериоскопический метод</i>	
	Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают: 1. по Граму. Характерен полиморфизм. В мазках чистой культуры - мелкие кокки, в мазках из органов – палочковидные формы. Грамотрицательны, спор и капсул не образуют. В мазках биоптатов располагаются вне- и внутриклеточно. 2. метиленовым синим – биполярность окраски. 3. МФА – мазок окрашивают люминесцентной противотуляремийной сывороткой – видны светящиеся бактерии.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день	От больного возбудитель не выделяется, сначала используют биологический метод, а затем из посевов крови и органов выделяют чистую культуру. Посев на свернутую яично-желточную среду с пенициллином (для подавления сопутствующей флоры). Изучают морфологические, культуральные, антигенные (РА со специфической сывороткой) свойства.
2 день	Рост колоний в S – форме: мелкие, гладкие, беловато-голубоватого цвета.
<i>Биологический метод.</i>	
	чувствительны морские свинки, белые мыши. Материал вводят подкожно. Используют ослабленных животных (предварительное введение желтка или гидрокортизона)
<i>Серологический метод.</i>	
	-обнаружение антител со 2-ой недели заболевания: - РПГА, - пробирочная РА, - РНГА -ИФА

	Диагностический титр 1:100. Обязательно прослеживается нарастание титра АТ в парных сыворотках. - Экспресс- метод - кровяно-капельная реакция: капля крови больного в дистиллированной воде (лизис эритроцитов) смешивают с диагностикумом. При титре 1:100 немедленно появляется агглютинация. <u>-обнаружение антигенов</u> в РПГА (РНАг, РТПГА), ИФА при исследовании материала внешней среды (трупы грызунов, погадки, помет).
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.
Аллергический метод	
	<u>кожно – аллергическая проба</u> с тулярином (взвесь убитых нагреванием до 70°С бактерий). Положительна при в/к пробе с 3-5 дня, н/к- с 6-8 дня заболевания у больных, а также у переболевших и вакцинированных.

Контрольные вопросы.

Возбудитель туляремии.

Биологические свойства.

Факторы патогенности.

Патогенез.

Иммунитет.

Методы микробиологической диагностики.

Специфическая профилактика туляремии.

Занятие № 16. Микробиологический метод диагностики чумы.

Возбудитель	<i>Yersinia pestis</i> .
Материал для диагностики	Гной из бубонов, язв, соскоб кожных элементов, пунктат лимфатических узлов, мокрота, слизь из зева, кровь, промывные воды желудка, секционный материал (паренхиматозные органы, лимфатические узлы). Материал доставляют с нарочным.
<i>Бактериоскопический метод</i>	
	Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают: 1. по Граму. Грамотрицательные овоидные палочки, спор не образуют. В мазках биоптатов располагаются вне- и внутриклеточно. 2. метиленовым синим – биполярность окраски- ярче окраска по полюсам клетки. 3. МФА – мазок окрашивают люминесцентной противочумной сывороткой – видны светящиеся бактерии.
<i>Бактериологический метод.</i>	
1 день	1. Посев на агар Хоттингера с генцианвиолетом (ингибитор посторонней споровой флоры) и сульфитом натрия (стимулятор роста)- среда Туманского; 2. МПА; 3. МПБ; Инкубируют 28С 2 суток.
3 день	Рост колоний в R – форме: - через 12 часов – «битое стекло», смотрят под малым увеличением микроскопа; - через 24 часа - «кружевной платочек»; - через 48 часов – зрелые колонии коричневого цвета. Тесты для идентификации: - бактериоскопия - гр(-)п; - МФА (АГ) с чумной флуоресцирующей сывороткой; - морфология колонии- R – форма; - характер роста на жидкой среде: – образуется пленка со

	спускающимися «сталактитами», со временем выпадает в осадок, при всряхивании - агглютиногенный рост. С чистой культуры проводят идентификацию: - чувствительность к бактерифагу; - утилизация мочевины на среде ЦДС (цветная дифференциальная среда) –отр; - подвижность: 22С – отр, 37С – отр; - проба с пестицином (детерминанта вирулентности) - #. К 2 суточной культуре подсевают культуру E.coli – роста нет. - РПК- #; - фибринолизин - #; - пуринозависимость - #; - Са- зависимость - #; - пигментообразование - #. На среде с гемом – колонии вирулентных штаммов черно- коричневого цвета, авирулентных – цвета среды; - выявление капсульного К-Аг (FI). Рост на агаре Хоттингера с экстрактом селезенки при 37С 2 сутки – рост слизистых колоний при наличии капсулы. -
<i>Биологический метод.</i>	
	Чувствительны белые мыши. Материал вводят ослабленным животным- вводят гидрокартизон 0,2 мл п/к, через 4 часа вводят культуру - внутрибрюшино. Гибель на 2-3 сутки или забивают на 10 сутки. - накожно - гибель на 2 суток позже. 1.Готовят мазки – отпечатки, окраска по Гаму и метиленовым синим; 2. МФА (АТ); 3.РНГА; 4 ИФА; 5. Посев на агар Хоттингера с генцианвиолетом. Инкубируют 28С 2 суток. С чистой культуры определяют LD₅₀ на 6 белых мышах: гибель от 100 кл/мл - высоковирулентный штамм.
<i>Серологический метод.</i>	
	<u>-обнаружение антител</u> со 2-ой недели заболевания: - непрямой МФА – сыворотка больного в разведениях обрабатывается чумным диагностиком затем после промывания флуоресцирующей антиглобулиновой сывороткой? -РНГА; -РНАт; -ИФА. <u>-обнаружение антигенов</u> (иммуноиндикация) с колоний и при исследовании материала внешней среды (трупы грызунов, погадки, эктопаразиты).: - РПГА

	- РНГА - РП - ИФА - МФА
<i>ПЦР – диагностика.</i>	
	Обнаруживают ДНК - в исследуемом образце материала; - в выделенной чистой культуре.
<i>Аллергический метод</i>	
	<u>Кожно – аллергическая проба</u> с пестицином (взвесь убитых нагреванием до 70°C бактерий). Положительна при в/к пробе с 3-5 дня, н/к- с 6-8 дня заболевания у больных, а также у переболевших и вакцинированных.

Контрольные вопросы.

Иерсинии.

Возбудитель чумы, история изучения.

Биологические свойства.

Роль отечественных ученых в изучении чумы.

Патогенез.

Иммунитет.

Методы микробиологической диагностики.

Специфическая профилактика.

Литература:

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: «Медицина» 1982.- 462 с.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2001. - 736с.
3. Борисов Л.Б., Козьмин – Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие. – М.: Медицина, 1993. – 240 с.
4. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: Учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений.- М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464с.
5. Королук А.М., Сбойчаков В.Б. Медицинская микробиология. Часть первая.- СПб, 2002.- 267 с.
4. Королук А.М., Сбойчаков В.Б. Медицинская вирусология. Часть вторая.- СПб, 2002.- 163 с.
6. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник.- СПб: «Специальная литература», 1998. – 592с.
7. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 600 с.
8. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998.-1200 с.

9. Райкис Б.Н., Пожарская В.О., Казиев А.Х. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении). Учебное пособие.- М.: «Триада-X2, 2002.-352 с.
10. Тэц В.В. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. - М.: Медицина, 2002. – 352 с.