



TRÜ

E. TALLMEISTER, S. LAANES,
A. LENZNER

**LABORATOORSED
TÖÖD
MIKROBIOLOOGIAS**

I

TARTU 1961

A - 23772

TARTU RIIKLIK ÜLIKOO

MIKROBIOLOOGIA, NAKKUSHAIGUSTE JA
DERMATOLOOGIA KATEEDER

E. TALLMEISTER, S. LAANES,
A. LENZNER

**LABORATOORSED
TÖÖD
MIKROBIOLOOGIAS
I**

TARTU, 1961

Тартуский государственный университет
ЭССР, г. Тарту, ул. Юликооли, 18
Е. Таллмейстер, С. Лаанес и А. Ленцнер
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ
На эстонском языке

Arh.



148

Vastutav toimetaja E. Tallmeister
Korrektor E. Oja

=====
TRÜ Rotaprint 1961. Trükipoognaid 11.
Tir. 600 eks. MB 02936. Tell. nr.493.

Hind 33 kop.

EESSÕNA.

Üldmikrobioloogia praktikum käsitleb mikroobide morfoloogiat ja füsioloogiat, infektsiooni- ja immuunsusõpetust.

Üldmikrobioloogia laboratoorsete tööde teostamiseks vajalik metoodika hõlmab igapäevases praktikas kõige sagedamini kasutatavaid uurimismeetodeid mikroobide mitmesuguste omaduste tundmaõppimiseks. Selleks, et mikroobi isoleerida ja samastada, s.t. anda talle nimetus ja paigutada klassifikatsiooni, tuleb kasutada mitmesuguseid uurimismeetodeid.

Mikroskoobilisel uurimisel määratakse peamiselt mikroobi morfoloogilisi omadusi ja iseärasusi, nagu kuju, asetust, värvust, raku ehitust jne.

Mikrobioloogiliste uurimismeetodite abil võib kindlaks teha mikroobi füsioloogilisi omadusi, biokeemilist aktiivsust, mikroobi tundlikkust mitmesuguste väliskeskonna tegurite toime suhtes jne.

Biooloogilist uurimismeetodit kasutatakse mikroobi makroorganismi kahjustava toime määramiseks. Selleks kasutatakse mitmesuguseid katseloomi, kellel määratakse mikroobi toksilisi, virulentseid ja patogeenseid omadusi ja uuritakse nakusprotsessi eksperimentaalse infektsiooni käigus.

Seroloogilist uurimismeetodit rakendatakse peamiselt nii makroorganismis mikroobi poolt esilekutsutud antikehade määramiseks kui ka mikroobi antigeense struktuuri uurimiseks tuntud immuunseerumite abil.

Biooloogilist ja seroloogilist uurimismetoodikat rakendatakse mikro- ja makroorganismi vaheliste suhete uurimiseks, mis on praktikas olulise tähtsusega immuunprofülaktika ja

-teraapia arendamisel ja väljatõotamisel. Vaktsiinidel ja immuunseerumitel on eriline tähtsus nakkushaiguste vältimises ja ravis.

Mikrobioloogilise tehnika tundmaõppimist alustatakse kõigepealt lihtsamate võtete omandamisega, siis minnakse kord-korralt keerukamate meetodite kasutamisele. Mikrobioloogilise tehnika üksikasjalik, täpne ja süstemaatiline omandamine on üheks tähtsamaks eelduseks teadmiste saamiseks vastaval erialal.

I p r a k t i k u m .

T e e m a : LABORATOORIUMIS TÖÖTAMISE KORD JA LABORATOO- RIUMI SISUSTUS.

Mikrobioloogia laboratooriumis peab olema lihtne ots-
tarbekas ja kergesti desinfitseeritav sisustus, nagu lihtsad
linoleumiga või polüvinüülkloriidplaadiga kaetud laboratoo-
riumilauad ja metallist kruvipingid. Laboratooriumis ei tohi
olla ülearust sisustust, eriti mitmesuguseid tolmu koguvaid
esemeid. Laboratooriumis peab valitsema puhtus ja kord.

Töölaual peavad olema tööks vajalikud vahendid teatud
kindlas käepärases korrastuses, mis võimaldab otstarbekat
töötamist ja kergendab koristamist.

Alljärgnevalt on kokkuvõtlikult esitatud töötamiskord
laboratooriumis ja vajalik esmaabi õnnetusjuhtumite puhul.

O h u t u s t e h n i k a i n s t r u k t s i o o n .

1. Töökoht ja töövahendid tuleb hoida puhastena ja korras.
2. Igal üliõpilasel peab olema seljas valge kittel ja peas
valge müts.
3. Laboratooriumi on keelatud kaasa tuua toiduaineid, samu-
ti on keelatud söömine, joomine ja suitsetamine.
4. Infitseeritud külvivaasad ja -nõelad tuleb enne käest pane-
mist steriliseerida leegil kuni hõõgumiseni. Pipeteerimise
peab ettevaatlikult, mitte materjali suhu tõmmates. Pipetid
tuleb pärast kasutamist asetada selleks ettenähtud nõusse,
mitte aga lauale.
5. Katsutite ja kolbide korke ei tohi asetada lauale.
6. Klaasnõude purunemisel ja infitseeritud materjali sattu-

misel lauale, esemetele, riinetele, nahale või limanahale tuleb kohe informeerida juhendajat õppejõudu desinfektsiooni või profülaktika läbiviimiseks.

7. Peale töö lõpetamist peab tööks kasutatud vahendid asetama neile ettenähtud kohale, käted desinfitseerima ja pesema puhtaks seebi ja veega.
8. Peale töö lõpetamist ei või kitlit mitte jätta üleriiete alla, vaid asetada sissepakitult portfelli.
9. Igaüks peab kasutama ainult temale ettenähtud töövahendeid, mitte naabrite omi.
10. Üliõpilased, kes ei allu korraldustele, kõrvaldatakse praktikumilt.

E s m a a b i ü r i t u s e d.

Infitseeritud materjali sattumisel -

- 1) tervele välisnahale: desinfitseeritakse vastav piirkond 3%-lise klooramiinilahusega ja seejärel pestakse seebi ja veega;
- 2) suhu ja kurku: mingil juhul ei tohi neelata!
Suud loputatakse 0,2%-lise soolhappe vesilahusega ja loputusvedelik sülitatakse selleks määratud nõusse. Korraldatakse suu loputamist ja hiljem juuakse mõned suutäied sama soolhappelahust;
- 3) silmalimaskestale: loputatakse silma 0,1%-lise elavhõbeda oksütsüaniidilahusega selleks ettenähtud loputusnõust. Seejärel määratakse silmalaugude alla silmalabidaga 0,1%-list elavhõbeda oksütsüaniidialvi;
- 4) ninalimaskestale: viiakse tamponiga nina limaskestale 0,1%-list elavhõbeda oksütsüaniidialvi;
- 5) nahale nahavigastuse kaudu: nahavigastust lastakse eelnevalt veritseda. Ei tohi suuga imeda!
Seejärel kaetakse vigastatud koht jooditinktuuriga ja asetatakse

peale steriilne side.

Märkus: vanad haavad kätel kaetakse enne
töö algust kollooidiumis niisuta-
tud vatiga.

Töövahendid igale üliõpilasele.

Laboratoorseks tööks on igale üliõpilasele ette nähtud kindel töökoht koos kõige lihtsama, aga vajaliku sisustusega.

Igal töökohal on laual puustatiiv, millel on sifooniga varustatud veepudel ja kauss restiga selle ees. Veepudelit kasutatakse voolava vee saamiseks preparaadidelt värvi loputamisel. Loputusvesi voolab preparaadilt selleks ettenähtud klaaskaussi. Iga üliõpilasele on kasutamiseks vastavalt töökohta numbriga nummerdatud statiiv värvide komplektiga, külvinõel ja -aas ning mikroskoop, mille korrashoiu eest ta on vastutav.

Tööks vajalikud külvinõelad peavad olema valmistatud 0,4-0,8 mm läbimõelduga plaatina- või terastraadist. Võetakse 6-8 cm pikkune vastava läbimõelduga traat ja jõdetakse kas 20-25 cm pikkuse klaaskepikese või -torukese otsa ja nii saadakse külvinõel. Külviaas valmistatakse nii, et painutatakse ümara otsaga näpitsaga nõela ots vahetult vastu traadi küljeosa. Õigesti valmistatud aasa küljes püsib vedelikutilk hästi. Aasa läbimõeld võib olla 1-5 mm, olenevalt vajadusest. Normaalaas on valmistatud 0,6 mm läbimõelduga traadist ja aasa läbimõeld on 2 mm; sellise külviaasaga võib hoida umbes 2 mg mikroobikultuuri. Nii võih umbkaudu määrata normaalaasa kaudu ka mikroobide hulka, kui ei ole vaja erilist täpsust.

Klaasmaterjal ja metallesemed.

Mikrobioloogilisteks töödeks on vajalikud mitmesugused klaas- ja metallesemed, mis peavad olema eriliselt ette valmistatud ja steriilsed.

Preparaatide valmistamiseks mikrobioloogiliste tööde jaoks leiavad kasutamist eseme klaasid suurusega 26x76 mm, mille paksus on 1-1,2 mm. Rippuvtilgameetodiks kasutatakse sama suuri, õõnega varustatud esemeklaase, mille keskosas on 12-15 mm läbimõelduga küllalt sügav lihvitud lohk.

K a t t e k l a a s e kasutatakse suurusega 15x15 mm, 18x18 mm või 24x24 mm, nende paksus on 0,16-0,18 mm.

Mikrobioloogilisteks töödeks kasutatavad klaasnõud peavad olema leelisvabast klaasist ja hästi taluma korduvat steriliseerimist kõrges temperatuuris.

Mitmesuguseks otstarbeks kasutatakse erineva suurusega k a t s u t e i d, 16x160 mm, 18x200 mm, 10x80 mm jne. Mikroobide kasvatamiseks kasutatakse P e t r i t a s s e; need on kaanega kaetavad klaastassid, mille läbimõõt on tavaliselt 9 cm ja kõrgus 1,5-2 cm.

Mikroobide kasvatamisel leiavad samuti kasutamist lamendate külgedega mitmesuguses suuruses k u l t u u r i p u d e l i d, nagu Kolle ja Roux' pudelid.

Peale selle kasutatakse klaasmaterjalist mitmesuguse mahuga - 25-100-2000-5000 ml koonusekujulisi E r l e n m e y e r i k o l b e ja ka mitmesuguses suuruses ü m a r k o l b e.

Gradueeritud klaasnõudest kasutatakse m õ õ t k o l b e, m õ õ t s i l i n d r e i d ja p i p e t t e, kusjuures kõige sagedamini kasutatakse pipette 1-10 ml, millel on 1 ml jaotatud 1/10 või 1/100 osadeks. Väiksemate vedelikuhulkade mõõtmiseks kasutatakse m i k r o p i p e t t e.

Siis on kasutamisel veel k l a a s l e h t r i d mitmesuguse läbimõõduga, klaaskorgiga p u d e l i d ja p u r g i d jne.

Peale selle on kasutusel klaastorust valmistatud P a s t e u r i p i p e t i d.

Peale eelmainitud klaasmaterjali leiavad laboratooriumis tihti tarvitamist portselanuhmrid, metallspaatlid jne.

K l a a s m a t e r j a l i e t t e v a l m i s t u s s t e r i l i s e e r i m i s e k s.

Kõik mikrobioloogilisteks töödeks kasutatavad nõud ja klaasmaterjal üldse peavad olema hästi pestud, täiesti puhad, rasvavabad, sest halvasti ettevalmistatud klaasmaterjal võib põhjustada ebaõigeid töötulemusi.

Rasvast puhastamiseks keedetakse esemeklaase 10-15 min.

1%-lises soodalahuses, pestakse algul nõrgas soolhappelahuses ja siis destilleeritud vees. Puhtad klaasid säilitatakse alkoholis vähese ammoniaagi lisandusega. Juba varem tarvitatud esemeklaase keedetakse 5%-lises soodalahuses, asetatakse 1-2 päevaks kontsentreeritud väävelhappesse, seejärel loputatakse kraaniveega, siis keedetakse 15-20 min. 1%-lises soodalahuses, loputatakse destilleeritud vees ja asetatakse samuti alkoholisse. Alkoholis hoitud esemeklaas hõõrutakse enne preparaadi valmistamist kuivaks filterpaberiga või puhta marllapiga ja steriliseeritakse leegil. Täiesti puhtal esemeklaasil valgub veetilk ühtlaselt laiali.

Uus klaasmaterjal, mitmesugused klaasnõud pestakse hoolega kuumas seebivees vastavate harjadega või koguni keedetakse seebivees enne pesemist. Selle järel kõrvaldatakse esemeilt seep kraaniveega loputamisel. Klaasnõude neutraliseerimiseks keedetakse neid 30 min. 1%-lises soolhappes, loputatakse hästi voolavas kraanivees ja lõpuks destilleeritud vees.

Kasutatud klaasnõud steriliseeritakse enne pesemist autoklaavis 30 min. 115°C juures.

Terve rea laboratoorsete tööde teostamiseks peavad olema nõud keemiliselt puhtad. Selleks asetatakse tavaliselt pestud nõud mõneks tunniks järgmisesse lahusesse:

Kal.bichromati 50 g,
Ac.sulfur.techn. 100 g,
Aqua 1000 ml.

Siis loputatakse korduvalt leelise kaaliumpermanganaadilahusega, hiljem happelise raudsulfaadilahusega, lõpuks loputatakse nõud destilleeritud vees, kuni loputusvee reaktsioon muutub neutraalseks.

Puhtaks pestud nõud lastakse kuivada õhus, soojas kuivatuskapis või kuivatatakse alkoholi ja eetriga.

Puhtad ja kuivatatud klaasnõud valmistatakse ette steriliseerimiseks järgmiselt: klaasnõude, nagu katsutite, kolbide, kultuuripudelite avad kaetakse puuvillkorkidega, nii et 2/3 osa korgist on avases ja 1/3 osa väljaspool. Petri tassid, pipetid, uhmid, spaatlid, esemeklaasid ja lehtrid pakitakse valgesse paberisse ja kinnitatakse sidumisnõõriga.

S t e r i l i s e e r i m i n e .

1. Kõige lihtsamaks steriliseerimise meetodiks on p õ - l e t a m i n e leegil. Bunseni põleti leegi üla- ja küljeosas on temperatuur üle 1500°, selles põletatakse külvinõelad, -aasad, pipeti suuosa, katsutite ja kolvide avad jne. Leegis põletatakse ka väheväärtuslik infitseeritud materjal.

2. K u i v k u u m a õ h u sterilisatsioon teostatakse erilistes aparaatides, Pasteuri kappides. Seal steriliseeritakse kuivad puhtad pakitud klaasnõud: katsutid, Petri tassid, kolvid, mõõtsilindrid, pipetid, pudelid, esemeklaasid jne.

Pasteuri kapp on metallist seintega aparaat, mis on kaetud väljast soojust isoleeriva materjaliga. Aparaat on tavaliselt automaatselt reguleeriva elektriküttega ja keemilise kontrolltermomeetriga. Steriliseeritakse 2 tundi 160°C juures, kusjuures steriliseerimise aega määratakse alates vajaliku temperatuuri saavutamise momendist. Kõrgema kui 160°C juures pole steriliseerimine soovitav, kuna vatt ja paber süstuvad ning sel juhul vabanev tõrvaine avaldab bakteriostaatilist toimet, takistab mikroobide kasvu.

3. K e e t m i n e vees hävitab mikroobide vegetatiivsed vormid 1-3 minuti jooksul. Metallsterilisaatoris destilleeritud vees keedetakse süstlad, nõelad, pintsetid, käärid jne. 15-30 min.

4. Sterilisatsioon k u u m a s v o o l a v a s a u r u s 100°C juures viiakse läbi K o c h i aparaadis, mis on silindrikujuline metallist nõu, mille seinad on väljast vooderdatud linoleumiga ja pealt kaetud avaga varustatud kaanega. Nõu põhjas on vesi, mille kohale restile asetatakse võrestatud põhjaga panges steriliseeritavad esemed. Sterilisatsioon voolavas kuumas aurus toimub nõu põhjas oleva vee keemisel tekkiva auru voolamisel kaanes oleva ava suunas. Kochi aparaadis steriliseeritakse nõusid ja materjale 30-40 min., millise aja jooksul hävivad mikroobide vegetatiivsed vormid. Eoste hävitamiseks teostatakse steriliseerimist kolmel üksteisele järgneval päeval.

5. Sterilisatsioon k u u m a s a u r u s s u r v e all toimub a u t o k l a a v i s, mis võib olla mitmesugu-

se ehitusega aparaat. Tavaliselt on see paksude metallseintega pealt õhukindlalt suletav silindrikujuline metallkaanega nõu. Aparaadil on manomeeter, termomeeter ja aurukraanid.

Selle silindrikujulise nõu põhja asetatakse steriliseeritavad esemed samuti nagu Kochi aparati. Vee keemisel tekkiv aur surub algul õhu aparaadist välja väljavoolukraani kaudu. Kui väljuv aurujuga on ühtlase küllaldase tugevusega, suletakse auruväljavoolukraan, ja soovitava aurusurve, s.t. vajaliku temperatuuri saamist võimaldab küttekeha automaatne regulatsioon. Ülesurve teket väldib vastav kaitseventiil. Vajaliku sterilisatsiooniaja möödumisel lülitatakse välja küttekeha, autoklaav lastakse jahtuda, kuni surve langeb manomeetril 0-le, siis avatakse auruväljavoolukraan ja lõpuks autoklaav. Kuumalt autoklaavi avamisel tekib surve kiirel langemisel vedelikkude tormiline keemine, mis võib puuvillkorgid märjaks teha või need katsuteist ja kolbidest koguni välja suruda.

Kuumas aurus surve all hävivad nii mikroobide vegetatiivsed vormid kui ka nende eosed. Autoklaavis teostatakse sterilisatsiooni tavaliselt 20 minutit 115-120°C juures, suuremate nõude puhul 30-60 minutit sama temperatuuri juures.

Alljärgnevalt on esitatud temperatuuri vastavus aurusurvele nii atmosfäärides kui ka naeltes.

Rõhk Ätm	Temperatuur	Rõhk lbs	Temperatuur
0	100°	1	102°
0,5	111,7°	5	109°
1,0	120,6°	10	115°
1,5	127,2°	15	121°
2,0	133,9 ^u	20	126°

F i l t r i d j a u l t r a f i l t r i d.

Väikeste aineosakeste kõrvaldamiseks vedelikust kasutatakse filtrimist läbi vati, puusöe, liiva, filterpaberi jne.

Mikrobioloogias on suurema tähtsusega just bakterite eraldamine vedelikkudest.

Tänapäeval kasutatakse selliseks filtrimiseks kõigepealt a) k õ v u f i l t r e i d, nagu Chamberland'i küün-

laid, mis on valmistatud portselansavi ja räniliivasegust, kus urvete läbimõõt reguleeritakse räniliiva hulgaga. Filtrid märgitakse suuremate urvetega, alustades järgmiselt: $L_1 - L_{13}$, kusjuures $L_5 - L_{13}$ filtreid ei läbi bakterid. Meil on kasutusel samad filtrid: $\Phi_I, \Phi_2, \Phi_3, \Phi_5, \Phi_7, \Phi_{II}$, mille numbrid vastavad rahvusvahelisele numeratsioonile. Selliste urvetega filtreid toodetakse 10 tüüpi.

Berkefeldi filtrid on valmistatud ränimullast, urvete suuruse järgi märgitakse neid tähtedega W, N, V. Neid kõvu filtreid võib kasutada korduvalt, kusjuures puhastamiseks orgaanilisest ainest kuumutatakse neid vastavates põletusahjudes - muhvelahjudes.

Kõige sagedamini leiavad aga ühekordset kasutamist b) p e h m e d f i l t r i d, eriti just Seitzi asbestkettad, mis kasutamisel asetatakse erilisesse metallstatiivi. Filtrereerivate viiruste suhtes kasutatavat materjali filtritakse ka läbi nitrotselluloosi või kolloidmembraanide, kusjuures näit. kolloidmembraani urvete läbimõõt reguleeritakse kollooidumi kontsentratsiooni muutmiseega lahustajas.

Filtrid steriliseeritakse enne kasutamist ja vastav vedelik või materjal filtritakse, kasutades sealjuures kas negatiivset või positiivset rõhku veejoapumba või vaakuum-aparaadi abil.

Filtrimisel kasutatakse imikolbi, mis on ühendatud kummivooliku ja klaastoru abil vaakumpumbaga ühelt poolt ja filtriga teiselt poolt.

Nii filtrid kui ka kõik teised filtrimiseks vajalikud seadmed, nagu kolvid, klaastorud, kummivoolikud jne. peavad olema steriliseeritud ja kuni kasutamiseni säilitatud korralikult paberisse pakituna.

M i k r o o b i d e u u r i m i n e m i k r o s k o o b i s.

Mikroskoopi kasutatakse mikroobide uurimisel nende kuju, asetuse, ehituse, suuruse ja värvumuse määramiseks.

Üldse kasutatakse: 1) elusate mikroorganismide uurimist peamiselt mikroobi kuju, kuid pealeselle ka liikuvuse määra-

miseks. Siin uuritakse mikroorganisme eseme- ja kattedklaasi vahelises preparaadis, rippuvtilga-, pimevälja- ja faaskont- rastse meetodi järgi; 2) surmatud mikroorganismide uurimist, mis toimub peamiselt mikroobide kuju, asetuse ja ehituse mää- ramiseks mitmesuguste erimeetodite järgi valmistatud äigepre- paraatides ja peamiselt värvitud preparaates.

Kõige sagedamini leiab rakendamist surmatud mikroobide uurimine värvitud äigepreparaates.

Ä i g e p r e p a r a a t i d e v a l m i s t a m i n e .

1. Äigepreparaadi valmistamiseks võetakse kas vedelkul- tuurist või suspensioonist külviaasaga materjali, mis hõõru- takse ühtlase õhukese kihina esemeklaasi keskmises kolmandi- kus laiali.

2. Äigepreparaadi valmistamiseks asetatakse külviaasaga esemeklaasi keskosale väike veetilk, võetakse siis tanke sööt- me pinnalt külvinõelaga kultuuri, suspendeeritakse mikroobi- de kultuur ühtlaselt veetilgas ja hõõrutakse laiali õhukese kihina.

3. Kui on tiheda konsistentsiga materjal, nagu röga, mäda jne., siis pannakse väike materjali osake külviaasaga ese- meklaasile otsa lähedale ja asetatakse sellele teine eseme- klaas, nii et mõlemal jääksid otsad kätega hoidmiseks vabaks. Materjal hõõrutakse kahe esemeklaasi vahel ühtlaselt laiali ja eemaldatakse libistades esemeklaasid teineteisest, nii et äigepreparaat katab ühtlase õhukese kihina võrdselt $2/3$ osa kummagi esemeklaasi pinnast.

4. Verest kui ka mikroobide suspensioonist võib valmis- tada äigepreparaati, nii et esemeklaas fikseeritakse vasaku käega horisontaalsel pinnal, materjali tilk asetatakse eseme- klaasi paremale otsmisele kolmandikule. Siis võetakse parema käega lihvitud härttega klaas ja lähendatakse see vasakult paremale esemeklaasi peal 45° nurga all vedeliku tilgale, nii et vedelik valgub lihvitud klaasiserva ja esemeklaasi vahel laiali. Siis libistatakse lihvitud klaas samas asendis kiire ühtlase liigutusega paremalt vasakule; nii saadakse ühtlase pakusega äigepreparaat esemeklaasil.

Preparaadi valmistamise skeem:

1. Materjal asetatakse ühtlase kihina esemeklaasile.
2. Preparaat lastakse õhus kuivada.
3. Fikseeritakse.
4. Värvitakse.
5. Loputatakse veega.
6. Lastakse kuivada õhus.
7. Asetatakse esemeklaasile 1 tilk seedriõli ja uuritakse mikroskoobis.

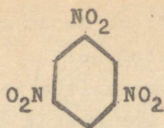
Preparaadi fikseerimisel on tähtsus selle tõttu, et
1) mikroobid surmatakse, 2) nad kleepuvad esemeklaasile ja
3) muutuvad värvidale vastuvõtlikumaks.

Kõige lihtsam fikseerimise viis on leegil kuumutamine
1-3 sek. Kui mikroobid kuumutamisel deformeeruvad, siis kasu-
tatakse teisi fikseerimismeetodeid, nagu
etüülalkoholi 10-15 minutit,
metüülalkoholi 2-3 minutit,
atsetooni 5 minutit,
alkoholi ja eetrit ää 10-15 minutit, või kasutatakse fiksee-
rimist osmiumhappe auruga.

B i o l o o g i l l i s e d v ä r v i d .

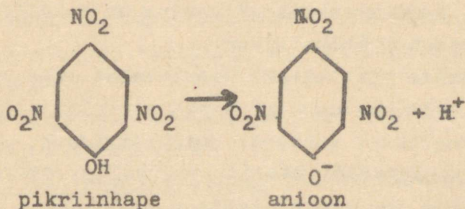
Bakterid on värvusetud, mistõttu nad on tavalisel mik-
roskoobilisel uurimisel ka raskesti nähtavad. Seetõttu on
neid vajalik värvida. Varem kasutati mikroobide värvimiseks
looduslikke värve, nüüd on kasutusel peamiselt aniliin- või
õigemini kivisõetõrvavärvid, kuna lähteaineks valmistamisel
on kivisõetõrv.

Värvid on orgaanilised ühendid, kus benseoltuumas on
mõned vesinikuaatomid asendatud nii kromofoorse kui ka aukso-
kroomse rühmaga. Kromofoorne rühm annab värvuse värvile. Ühend,
sisaldades kromofoorset rühma, pole aga veel värv, sest ta
pole suuteline ühinema värvitavate esemetega. Selleks on va-
jalik auksokroomne rühm, mis on elektrolüütilise dissotsiat-
siooni võimega ja ühtlasi ühendis sooli moodustavate omadus-
tega. Näiteks: $\text{-NO}_2\text{-}$ nitrorühm on kromofoorne rühm



trinitrobensool

See on kollast värvi ühend - kromogeen, kuid mitte värvaine, sest ta ei dissotsieeru elektrolüütiliselt, seega ei moodusta sooli hapetega ega alustega. Et sellest värvaine saada, on vajalik auksokroomne rühm, näiteks -OH rühm, ja saame pikriinhappe.



Värviosa on negatiivse laenguga, see on happeline värv ja suuteline moodustama alustega sooli.


Auksokroomsed rühmad on: happelised -OH, sulfoonrühm -SO₂OH; viimased on eriti tugevalt happelised sooli moodustavate omadustega ühendid, aluseline on -NH₂ - rühm.

Aluseline ehk baasiline värv ioniseerub, nii et värviosa molekul ehk katioon on positiivse laenguga.

Värvid on tavaliselt värvitute hapete soolad, nagu äädikhappe (CH₃COOH), vävelhappe - (H₂SO₄) või soolhappe - (HCl) soolad; need on aluselised värvid.

Happelised värvid on K-, Na-, Ca-soolad.

Värvid rühmitatakse kromofoorsete rühmade järgi:

- 1) asovärvid -N=N-
- 2) asiinvärvid

- 3) indamiinvärvid -N= jne.

Tuumaine värvub baasiliste värvidega ja tsütoplasma happeliste värvidega.

Mikroorganismide värvumine sõltub nende raku isoelektrilisest täpist ja ka keskkonna reaktsioonist.

Mikroobide värvumise kohta füüsikalise teooria järgi arvatakse, et värvumine toimub kahe komponendi ühinemisel, kusjuures uut ühendit ei moodustu. Värvumine toimub kapillaarsuse, osmoosi, adsorptsiooni või absorptsiooni alusel. Keemilise teooria järgi värvumisel moodustub ühinemisel uus ühend, mille füüsikalised ja keemilised omadused on erinevad lähteainete omadusist. Vasturhääkivaks sellele teooriale on mikroobide dekoloreerumine happe ja alkoholi toimel.

Arvata võib, et mikroobide värvumine on keemilise kui ka füüsikalise protsessi kombinatsioon.

Mikroorganismide värvimiseks kasutatakse väga mitmesuguseid värve, peamiselt aga baasilisi ehk aluselisi värve.

Nendest on kasutusel sinised: metüleensinine, azuur, toluidiinsinine jne.; punased: baasiline fuksiin, safraniin, rubiin, neutraalpunane jne.; violetsed: gentsiaanaviolett, metüülviolett, kristallviolett jne.; rohelised: malahhiitroheline, briljantroheline; pruunid: vesuviin, bismarkpruun; mustad: induliin ja koliinmust.

Happelitest värvidest kasutatakse eosini, happelist fuksiini ja neutraalsetest värvidest metüleenvioletti ja azuureosinaate.

Mikroobide värvimiseks lahustatakse värvid enamikul juhtudel algul alkoholis ja edasi lahjendatakse alkoholset värvilahust destilleeritud veega. Värvimiseks kasutatavad värvilahused on tavaliselt madala kontsentratsiooniga, kõige intensiivsemad on kuni 1%-lised lahused. Värvimisel madalama kontsentratsiooniga värvilahusega on pikemaajalisel värvimisel paremad tulemused kui lühema aja kestel kasutatava kontsentreeritud värvilahusega.

Värvilahustele lisatakse mõningaid aineid nn. intensiivistajaid, mis põhjustavad mikroobide parema värvumise. Happeliste värvide puhul on tähtis, et värvilahus oleks enam happeline ja leeliste värvide puhul leelisem. Seepärast kasutatakse intensiivistajatena happeid, leelisi, fenooli, aniilini jne. Värvimisel sageli kasutatav soojendamine või

kuumutamine on sama intensiivistava toimega.

Peale selle kasutatakse mikroobide värvimise protsessis aineid, millel on tugev keemiline affiinsus nii värvile kui ka mikroorganismile. Sellised ained on peitsid ja nendega toimimisel saab värvida objekte, mis muidu ei värvuks. Tüüpiline peits on ac.tannicum.

V ä r v i l a h u s t e v a l m i s t a m i n e .

Ziehl'i karboolfuksiini lahuse valmistamine.

1 g aluselist fuksiini lahustatakse uhmris hõõrumisel 10 ml alkoholis, mida vähehaaval lisatakse, siis pannakse 5 ml veeldatud ac.carbol.cryst. ja lõpuks 100 ml destilleeritud vett.

Värvilahusel lastakse 24 tundi seista ja siis filtritakse läbi filterpaberi.

Löffleri metüleensinise lahuse valmistamine.

Kõigepealt valmistatakse metüleensinise küllastatud alkoholne lahus, milleks võetakse 2-3 g värvi 100 ml alkoholi kohta.

Siis võetakse

30 ml küllastatud alkoholset metüleensinise lahust,
0,5 ml 2%-list kaaliumhüdrosüüdi ja
100 ml destilleeritud vett.

L i h t v ä r v i m i n e .

Lihtvärvimist teostatakse ükskõik millise ühe värvilahuse kasutamiselega. Sel juhul fikseeritud äigepreparaat värvitakse kas Löffleri metüleensinise või Ziehl'i karboolfuksiiniga 1:10 jne. Lihtvärvimisega värvuvad mikroobid preparaadis ühtlase värvusega ja seda kasutatakse just mikroobi puhas-kultuuri puhul mikroobide nähtavaks tegemiseks ja nende kuju määramiseks.

Mikroobe värvitud äigepreparaadis uuritakse mikroskoobis.

M i k r o s k o o p .

Mikroobid on väga väikesed, nende mõõdud on tavaliselt mõõdetavad mikronites (1/1000 mm) ja seetõttu saab neid nähtavaks teha ainult mikroskoobis.

Mikroskoop koosneb mehaanilisest ja optilisest osast. Mehaanilise osa moodustab statiiv, millest alumine osa on jalg, mis on šarniiriga ühenduses ülemise osaga, mille külge on kinnitatud esemelaud ja üleval on tuubus. Tuubuse ülemises otsas on okulaar ja alumises revolvriga kinnitatud objektivid. Tuubus liigub makromeeter- ja mikromeeterkruvi abil, kusjuures mikromeeterkruvi üks ring on 0,1 mm.

Optiline osa on Abbé kondensor, okulaar, objektivid, kusjuures valgusaparaat koosneb peeglist ja kondensoriga diafragmaga.

Objektiividest kasutatakse kuivi ja immersioonsüsteeme. Objektiivi suurendus oleneb fookuse kaugusest: mida vähem on fookuse kaugus, seda suurem on suurendus. Mikrobioloogiliste värvitud preparaatide uurimisel on Abbé kondensor võimalikult üleval, diafragma täiesti avatud, päevavalguse puhul kasutatakse tasapeeglit ning kunstliku valguse puhul nõguspeeglit.

Objektiiv annab tõelise suurendatud ümberpööratud kujutise; vaadeldes seda kujutist okulaariga, mis toimib luubiina, saame näiva suurendatud päripidise kujutise.

Mikrobioloogias kasutatakse värvitud preparaatide uurimiseks immersioonobjektive, mille kasutamisel asetatakse preparaadile 1 tilk seedriõli, millel on valguskiirte murdemiskoeffitsient 1,51, mis vastab peaaegu klaasi omale (1,52). Sel puhul ei teki kiirte hajumist, ja see homogeenne süsteem võimaldab objektiivitava ja mikroskoobi töövõime suurendamist.

Tavalistel mikroskoopidel on eraldusvõime 0,2 μ . Suurendus on 600-1000 - 2500 kordne.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Teostada klaasnõude ettevalmistus steriliseerimiseks; valmistada puuvillkorgid katsutile, kolvile, pakkida paberisse pipett, Petri tass ja portselanuhmer.
2. Tutvuda Kochi ning Pasteuri aparaadiga ja autoklaaviga.
3. Õppida tundma bakterite filtreid ja jälgida filtrite kasutamist.
4. Vaadata demonstratsiooniks väljapandud bakterite värve kuivaineina.
5. Rühmaviisi valmistada Ziehli karboolfuksiini ja metüleensinise värvilahused.
6. Valmistada preparaat stafülokokkide suspensioonist, värvida Ziehli karboolfuksiiniga 1:10 10 minutit ja uurida.
7. Valmistada preparaat sartsiinide lüagagar-kultuurist, värvida Löffleri metüleensinisega 10 minutit ja uurida.

II p r a k t i k u m .

T e e m a: BAKTERITE VÄRVIMINE JA NENDE MORFOLOOGIA.

L i i t v ä r v i m i s m e e t o d i d .

Eelmine praktikum käsitles mikroobide värvimist üldse ja liitvärvimismeetodeid, mille abil on võimalik nähtavaks teha paljude mikroobide kuju ja asetust, kui preparaad on valmistatud mikroobide kultuurist. Kui on aga vaja kindlaks teha mikroobide esinemist preparaatides, kus esinevad erinevad mikroobiliigid või kudede rakulised elemendid, sel juhul on raske vahet teha mikroobide üksikliikide vahel ja samuti eristada neid rakulistest elementidest. See asjaolu tingib keerulisemate liitvärvimismeetodite kasutuselevõtmise, mis põhinevad mikroobirakkude füüsikalise-keemilise koostise iseärasustel. Selliseid liitvärvimismeetodeid kasutatakse mikroobide eristamiseks koeelementidest kui ka erinevate mikroobiliikide omavaheliseks eristamiseks.

Grami meetod.

Kõige üldisemalt ja enam kasutatavam sellistest meetoditest on Grami meetod, mille Christian Gram võttis 1883.a. kasutusele mikroobide värvimiseks koelõikudes.

Seda värvimismeetodit on täiendatud ja veidi muudetud. Oluline on kasutada värvimist alati ühtlastes tingimustes ja ühtlaste aegadega, siis võib vastavalt hinnata ka tulemusi.

Värvides mikroobe aluseliste värvilahustega, tavaliselt gentsiaana- või kristallvioletiga, kinnistades värvi mikroobidele peitsidega, Lugoli lahusega või pikriinhappega, vär-

vub osa mikroobe selle põhilahusega, nii et teatud aja kestel alkoholi või atsetooniga toimimisel nad ei dekoloreeru, ei anna värvust ära. Neid mikroobe, mis säilitavad oma tumevioletse värvuse, nimetatakse gram-positiivseteks. Teine osa mikroobe annab aga värvi ära alkoholiga toimimisel ja neid saab nähtavaks teha järelvärvimisel kasutatava kontrastse värvilahusega. Neid nimetatakse gram-negatiivseteks. Vastavalt Grami järgi värvumisele liigitatakse kõiki mikroobe kahe sugusteks: gram-positiivseteks ja gram-negatiivseteks. Eriti oluline on selline jaotus just bakterite osas.

Grami meetodi järgi värvimisel on aluseks rakus asetleidvad keemilised protsessid, mis on seotud fosforit sisaldavate ühenditega peamiselt nukleinhapete kujul. Gram-positiivsete mikroobide isoelektriline täpp on madalam, pH 2-3 piirides, gram-negatiivsetel aga kõrgem, pH 4-5 piirides. See erinevus kahe erinevate mikroobide tüüpide rakuplasma reaktsiooni happelisuses on tingitud madala isoelektrilise täpiga fosforit sisaldavast ühendist - ribonukleinhapest. Rakuplasma reaktsiooni mõjustav magneesiumribonukleaat on seoses teiste ühenditega rakus. Gram-positiivsetel mikroobidel on struktuuri iseärasuse või rakukompleksi seoste erinevuse tõttu palju tugevamad happelised omadused ja selle tõttu on nad suutelised adsorbeerima suuremal hulgal aluselist värvi ning seda siduma tugevamini kui gram-negatiivsed mikroobid.

Gram-positiivselt värvuvad elusad mikroobid, gram-negatiivselt surnud mikroobid. Peale selle Grami meetodi järgi värvimisel esineva erinevuse võib leida mikroobide vahel ka teisi erinevusi: nii annavad gram-negatiivsed mikroobid kergemini plasmolüüsi, on madalamate antigeensete omadustega, tundlikumad fagotsütoosile jne.

1. Valatakse karboolgentsiaanaviolett filterpaberiga kaetud fikseeritud preparaadile, lastakse toimida 2 minutit.

- (1 g gentsiaanavioletti,
- 10 ml 96° alkoholi,
- 2 ml veeldatud ac.carbol.cryst.,
- 100 ml destilleeritud vett).

2. Pannakse peale Lugoli lahus ja lastakse toimida 1 minut.
 - (1 g Jodi puri,
 - 2 g Kal.jodati,
 - 300 ml destilleeritud vett).
3. Valatakse peale 96^o-ne alkohol, lastakse toimida kuni nähtava värvi eraldumiseni - 1 minut.
4. Loputatakse veega.
5. Järelvärvitakse Ziehli karboolfuksiiniga 1:10 30 sekundit. (Karboolfuksiini asemel võib kasutada igasugust teist kontrastset värvainet).

Preparaadis on gram-positiivsed mikroobid tumevioletsed ja gram-negatiivsed mikroobid helepunased.

Ziehl-Neelseni meetod.

Ziehl-Neelseni värvimise meetod on üks kõige sagedamini kasutatavaid liitvärvimismeetodeid, mida kasutatakse *G.Mycobacterium*'isse kuuluvate mikroobide kiirikseente ja batsillide endosporide jne. uurimisel. Siin kasutatakse suhteliselt kontsentreeritud värvilahust raskesti värvuvate mikroobide nähtavaks tegemiseks. Need mikroobid oma keemilise koostise tõttu, eriti rakus leiduvate rohkete lipoidide sisalduse tõttu, mida leidub kõige enam rakuplasma membraanis ja inklusioonides, olles kord värvunud, erinevad teistest mikroobidest sellega, et nad ei dekoloreeru mineraalhapete ja enamikul juhul ka alkoholi toimel. *G.Mycobacterium*'isse kuuluvatel mikroobidel põhineb selline omadus osalt ka rakus esineval ainevahetusproduktil - mükoolhappel. Kasutades Ziehl-Neelseni meetodit, on võimalik jaotada mikroobe värvumise järgi happekindlateks ja mittehappekindlateks.

1. Fikseeritud äigepreparaadile asetatakse filterpaber, sellele valatakse Ziehli karboolfuksiinilahus, soojendatakse leegil kuni auru ilmumiseni ja lastakse toimida 2-5 minutit.

(1 g alusl.fuksiini,
 10 ml 96^o alkoholi,
 5 ml veeld. ac.carbol.cryst.,
 100 ml destilleeritud vett).

2. Peale värvilahuse äravalamist valatakse peale 5%-line H_2SO_4 lahus (või 25%-line HNO_3 või 3%-line HCl 70^o-ses alkoholis) lastakse toimida 10-20 sek. (kuni punase värvuse eraldumiseni).
3. Loputatakse preparaati veega.
4. Valatakse preparaadile 70-96^o-ne alkohol ja lastakse toimida 30 sek.-1 minut.
5. Loputatakse veega.
6. Järelvärvitakse Löffleri metüleensinisega 1:3 20-30 sek.
7. Loputatakse veega.
8. Preparaat lastakse kuivada.

Värvitud preparaadis värvuvad happekindlad mikroobid punaselt, teised mikroobid ja koeelemendid siniselt.

V i t a a l n e v ä r v i m i n e .

Fikseeritud ja värvitud preparaatides muutuvad mikroobid morfoloogiliselt, nende kuju deformeerub. Mikroorganismide tõelise raku kuju ja mõõtude määramiseks, samuti nende kasvu ja pooldumise uurimiseks võib kasutada elusate mikroobide rakkude värvimist - vitaalset värvimist.

Vitaalseks värvimiseks kasutatakse võimalikult mikroobe vähe kahjustavaid indiferentseid värve madalates kontsentratsioonides. Kõige sagedamini võetakse selleks metüleensinise või neutraalpunase lahuseid lahjenduses 1:500, 1:5000, 1:10000, 1:100000. Harvem leiavad rakendust toluidiinsinine ja eosiin. Preparaat valmistatakse kas eseme- ja katteklaasi vahel või rippuvtilgameetodi järgi; võib kasutada eseme- ja katteklaasi vahel preparaadi valmistamist Fickeri järgi filterpaberiga. Fickeri meetodi järgi valmistatakse preparaati järgmiselt: esemeklaasile pannakse 1 tilk mikroobide suspensiooni füsioloogilises lahuses või 2,5%-lises isotoonilises glükoosilahuses ja kaetakse katteklaasiga. Ühe sentimeetri kaugusele katteklaasist asetatakse esemeklaasile 1 tilk vastavat värvilahuse lahjendust (metüleensinine 1:5000) ja ühendatakse siis aasaga ettevaatlikult värvitilk katteklaasi servaga. Nüüd võetakse pintseti vahele filterpaberi

riba, asetatakse see värvitilgale vastassuunas oleva kattekläasi äärele ja imetakse sel viisil värvilahus läbi mikroobide suspensiooni. Mõne minuti järel on mikroobid värvunud ja võib uurida värvitud elusaid mikroobirakke mikroskoobis.

F a a s k o n t r a s t m i k r o s k o o p .

Elusate mikroobide morfoloogia uurimiseks kasutatakse veel faaskontrastmikroskoopi.

Üldiselt on teada, et mikroskopeerimisel sõltub nähtavus uuritava eseme kontrastsusest. Kõige kontrastsemad on need esemed, millel valguse neeldumine on erinevates eseme osades ebaühtlane. Kui valguskiired neid läbivad, muutub valguskiire intensiivsus ja sellele reageerib hästi inimese silm. Sellise kontrastsusega on kõik värvitud preparaadid.

Uuritavad esemed, millel on ühtlane valguse neeldumine kõikjal, on halvasti nähtavad. Neil võib olla erinev paksus ja sellega erinev optiline tihedus. Valguse intensiivsus ei muutu nende esemete läbimisel, toimuvad ainult valguslaine faasi nihked ja seda inimsilm ei registreeri. Sellised on preparaadid värvimata elusmikroobidest.

Selliste uuritavate esemete kontrastsust võib tõsta mikroskoobi diafragma ava muutmisega ja kondensori langetamisega, kuid sel juhul väheneb mikroskoobil ka valgustustugevus.

Selleks et paremini nähtavaks teha elusaid värvimata mikroobe, kasutatakse faaskontrastmikroskoopi. See võeti kasutusele esmakordselt Zernicke poolt 1932.a. Mikroskoobis on värvimata esemed tehtud nähtavaks nii, et valguskiirte faasilised nihked muudetakse amplituudseteks ja seda saavutatakse erilisi ketaskondensoreid ja rõngasobjektiive kasutades. Siin on valguslaine kiirte suunda muudetud 90° võrra ja ketaskondensori läbimisel neeldub tsentraalseist valguskiirtest 50%.

Mikroobide negatiivne värvimine
ehk tausta värvimine.

Selleks, et mikroobe uurida, võib värvida preparaadil tausta, kusjuures kontrastselt on nähtavad värvuseta bakterirakukehad. Kõige enam leiab selleks kasutust Burri tušimeetod. Hiina tuš lahjendatakse 1:10 destilleeritud vees, lastakse seista suuremate osakeste sadestamiseks ja steriliseeritakse pinnavedelik autoklaavis 15 minuti kestel 115°C juures. Siis asetatakse 1 tilk tuši klaaspulgaga esemeklaasi otsale ja selle tilga kõrvale asetatakse 1 tilk mikroobide suspensiooni. Mõlemad tilgad segatakse ja valmistatakse preparaat, nagu tuleb valmistada vere äigepreparaati. Preparaat lastakse õhus kuivada, siis asetatakse sellele 1 tilk seedriõli ja mikroskopeeritakse.

Tuši asemel võib kasutada 10%-list aluselist metüleensinist, nigrosiinilahust või 3%-list kongopunase lahust.

Sellisel preparaadi tausta värvimisel on taust kas must või kasutatud värvilahuse värvusega ja mikroobid on värvuse-tute objektidena mikroskoobilisel uurimisel hästi nähtavad.

B a k t e r i t e p õ h i v o r m i d.

Kuju poolest liigitatakse bakteritel 3 põhivormi:

- 1) kerasarnased ehk kokid,
- 2) silindrilised ehk pulgasarnased ja
- 3) spiraalsed ehk kruvisarnased.

Vastavalt kuju iseärasustele ja asetusele võib jaotada veel neid põhivorme.

Kokid on kerasarnased mikroobid, mille läbimõõt on 1-2 μ . Vastavalt pooldumisele asetuvad üksikud liigid erinevalt.

Kui kokid peale pooldumist eralduvad üksteisest, nimetatakse neid mikrokokkideks - m i c r o c o c c u s. Peale pooldumist, jäänud kahekaupa, paaristikku, nimetatakse kaksikkokkideks, diplokokkideks - d i p l o c o c c u s. Neljakaupa esinevaid kokke nimetatakse nelikkokkideks ehk tetrakokkideks

t e t r a c o c c u s. Kui kokid asetuvad peale pooldumist segipaisatud viinamarjakobarate taoliselt, on kobarkokid ehk stafülokokid - s t a p h y l o c c o c c u s. Ahelas asetunud kokke nimetatakse ahelkokkideks ehk streptokokkideks - s t r e p t o c c o c c u s. Kui aga pooldumisel kolmes erinevas perpendikulaarses teljes on kokid asetunud pakikestena 8-kaupa, nimetatakse neid kaheksikkokid ehk sartsiinid - s a r c i n a.

Peale selle ei ole kokkidel alati ühtlane kerasarnane kuju, vaid nad võivad olla oa- või neerukujulised, mõnikord ka lantsetikujulised või ovaalsed.

Pulgasarnased mikroobid võivad olla mitmesuguse asetusga üksteise suhtes ja erineda kujult. Kõigepealt võib pulgasarnaseid mikroobe liigitada: 1. Mikroobi, mille transversaalne läbimõõt pole longitudinaalsest palju lühem, nimetatakse bakteriks - b a c t e r i u m. Kui mikroobi mõõtude vahe on väga väike, nim. seda kokkobakteriks - c o c c o b a c t e r i u m. Peale selle värvuvad bakterid gram-negatiivselt. 2. Kui mikroobi longitudinaalne mõõt on palju pikem transversaalsest, siis nim. batsilliks - b a c i l l u s. Peale selle on osal batsillidel omadus moodustada eoseid ja nad värvuvad gram-positiivselt.

Vastavalt asetusele liigitatakse neid: kui batsillid on koos kahekaupa - d i p l o b a c i l l u s, ahelas - s t r e p t o b a c i l l u s, kobaras - s t a p h y l o b a c i l l u s.

Pulgasarnased mikroobid pole aga alati ühtlase konfiguratsiooniga:

- 1) neil võib olla kohati pundumisi või okslikke moodustisi - M y c o b a c t e r i u m;
- 2) neil võivad olla nuiataolised otsad - C o r y n e b a c t e r i u m;
- 3) nende otsad on teravad, väljaveninud, mikroob on värtnakujuline - F u s o b a c t e r i u m;
- 4) batsill on paksenenud või pundunud eose asetuse kohalt - C l o s t r i d i u m.

Kruvisarnastele - spiraalsetele mikroobidele on iseloomustav rakkude kõverdumine või keerdumine pikitelje

suhtes:

- 1) V i b r i o - vibrioon on kõverdunud komasarnane pulgake;
- 2) S p i r i l l u m - spirill - pulgasarnane mikroob, mille rakukeha teeb 1-2 keerdu ümber kesktelje.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Valmistada Staphylococcus + Proteus vulgaris'e suspensioonist äigepreparaat, värvida Grami meetodi järgi ja uurida.

2. Värvida tuberkuloosihaige rögest tehtud valmispreparaat Ziehl-Neelseni järgi ja uurida.

3. Valmistada preparaat stafülokokkide suspensioonist, värvida Fickeri järgi metüleensinise lahusega 1:500 ja uurida.

4. Tutvuda demonstratsiooni korras väljapandud Proteus vulgaris'e kultuurisuspensioonist valmistatud preparaadiga faaskontrastmikroskoobis.

5. Valmistada preparaat stafülokokkidest Burri tušimeetodi järgi ja uurida mikroobide kuju ja asetust.

6. Õppida tundma bakterite põhivorme demonstratsiooni korras väljapandud preparaatides.

III p r a k t i k u m.

T e e m a: BAKTERITE EHITUS.

Bakteriraku peenstruktuuri on võimalik uurida peamiselt elektronmikroskoobis. Võib uurida nii bakterirakku tervikuna kui ka bakterirakust tehtud ultraõhukesti lõike, mille paksus on kuni $0,1\mu$. Selline ultraõhukeste lõikude meetodika võimaldab uurida bakteriraku kesta, tuumainet, rakuplasmas olevaid inklusioone ja samuti kõigi teiste raku üksikosade, nagu näit. endospooride ehitust.

Tavalisel mikroskoobilisel uurimisel on võimalik bakterirakust uurida peamiselt eoseid, kihnu, vibureid ja inklusioone. Üksikute rakuosade nähtavaks tegemiseks ja eristamiseks kasutatakse erilisi värvimismeetodeid. Käesolevas juhendis on kirjeldatud sagedamini kasutatavaid ja lihtsamaid meetodeid selleks otstarbeks.

E o s t e v ä r v i m i n e.

Üle 100 aeroobsel ja 50 anaeroobsel batsilliliigil tekib teatud kasvumomendil rakus eos ehk endospor. Selline eoste moodustumine on sigimise protsess, milles tuuma ühtesulamisele järgneb tuumaine vähenemine. Osa tuumainet ja suurem osa rakuplasmas kaob pärast seda, kui fertiilne osa sulgub tihedasse eoskesta. Eosed on kas ovaalsed või ümarad moodustised. Eose kuju, suurus ja asetus on suhteliselt püsivad liigile spetsiifilised omadused ja selle järgi on võimalik batsille diferentseerida. Eos võib bakterirakus olla asetunud ekvatoriaalselt - raku keskosas, terminiaalselt - raku otsas, subterminiaalselt - raku keskosa ja otsa vaheosas. Rakk kui sporangium

ümbritseb eost kas mõne tunni või päeva, puruneb ja vabastab sellega eose, mis võib jääda soikeolekusse aastaiks. Kui mikroobi eosed satuvad sobivasse keskkonda, siis areneb eos vegetatiivseks vormiks. See areng on erinev ja iseloomulik mikroobiliigile. Tavaliselt pikeneb eos. Arenev vegetatiivne vorm võib läbi murda eoskesta ühes tema otsas, sama võib toimuda ekvatoriaalselt, kusjuures siis eoskest jääb mütsina. esialgu mõlemasse rakuotsa. Mõnede batsillide juures ei esine sellist eoskesta lõhkemist, vaid vegetatiivne vorm areneb pidevas eose pikenemise protsessis, kusjuures eoskest absorbeerub või lahustub.

Eoste esinemist mikroobidel saab kindlaks teha Schaeffer-Fultoni värvimismeetodi järgi:

1. Mikroobide suspensioonist valmistatud ägepreparaat fikseeritakse leegil.
 2. Preparaadile asetatakse 5%-line malahhiitroheline vesilahus ja soojendatakse kuni auru ilmumiseni 3-4 korda, värvitakse 1 minut.
 3. Loputatakse veega 30 sek.
 4. Valatakse preparaadile 0,5%-line safraniini vesilahus - 30 sek.
 5. Loputatakse veega.
 6. Lastakse preparaat kuivada, uuritakse.
- Eosed on rohelised ja bakterirakud punased.

K i h n u d e v ä r v i m i n e .

Kui bakteriraku seina väliselt ümbritsev limakiht on paksem ja ümbritseb piirdunult bakterirakku, siis nimetatakse seda kihnuks. Kihn produtseeritakse elava rakuseina poolt. Kihnud moodustuvad mikroobirakkudel enamasti elusas organismis. Ainult üksikutel mikroobidel esineb kihne ka kasvul kunstlikel söötmeil. Patogeensetel mikroobidel puudub kihn surnud organismis ja kunstlikel söötmeil. Kihn on neil üheks patogeensuse ja virulentsuse tunnuseks. Mikroobi kihn on üldiselt raskesti värvuv, teda saab nähtavaks teha eriliste värvimismeetodite abil.

Tusimeetod.

1. Esemeklaasi otsale asetatakse tilk tuksi lahjendatult dest. veega 1:2 - 1:5, sellesse tilgasse suspendeeritakse aasatäis mikroobikultuuri ja äige-preparaat valmistatakse nagu vere äige-preparaat.
2. Preparaat lastakse õhus kuivada, fikseeritakse küllastatud $HgCl_2$ lahusega - 1 minut.
3. Loputatakse veega.
4. Värvitakse 2%-lise gentsiaanavioleti vesilahusega kergelt soojendades - 2 minutit.
5. Loputatakse veega.
6. Lastakse kuivada, uuritakse.

Mikroobid värvuvad violetselt, kihnud jäävad värvuseta ning on tumedal taustal hästi nähtavad.

V i b u r i t e v ä r v i m i n e.

Mikroobide liikumine toimub peamiselt viburite abil, ainult osa võib liikuda rütmiliselt kontraktsioonide abil. Esmaordselt täheldas mikroobide vibureid Ehrenberg 1863.a. Viburid on õrnad niidikujulised moodustised, läbimõõdus 0,02-0,05 μ . Nad on rakukehast kergesti eralduvad, näit. mehhaaniliste menetluste puhul, nagu preparaadi valmistamisel. Viburid on asetatud enamasti mikroobiraku keha külge 45° nurga all ja suunatud vastupidiselt liikumissuunale. Mikroobide liikumise kiirus on 10-40 μ sekundis, see on suhteliselt kiire liikumine. Ebasobivates tingimustes kaotavad mikroobid viburid kas ajutiselt või jäädavalt.

Viburite hulk ja asetus on erinevatel mikroobiliikidel erinevad. Liikuvaid baktereid liigitatakse viburite arvu ja asetuse järgi järgmiselt:

- 1) monotricha - üks vibur ühes raku otsas,
- 2) amphitricha - üks vibur kummaski raku otsas,
- 3) lophotricha - viburikimp ühes või mõlemas raku otsas,
- 4) peritricha - hulk vibureid ümbritseb ühtlaselt mikroobiraku kogu pinda.

Eriti ettevaatlikult valmistatud preparaadis on võimalik

vibureid nähtavaks teha intensiivsete värvimismeetodite abil.

Preparaadid viburite uurimiseks valmistatakse noorest 18 tunni vanusest lüngagari kultuurist eriti puhastele esemeklaasidele. Selleks võetakse ettevaatlikult külviasaga tahke söötme pinnalt kondensvee lähedusest mikroobikultuuri, asetatakse katsutis olevasse 1-2 ml steriilsesse kaevuvette. Siis lastakse katsutit seista 30-60 minutit toatemperatuuris, võetakse külviasaga või Pasteuri pipetiga ettevaatlikult vedeliku pindmisest osast mikroobide suspensiooni ja asetatakse puhtale esemeklaasile 3-5 tilka eraldi ilma laiali hõõrumata. Materjal esemeklaasil lastakse õhus kuivada. Siis võib värvida kas hõbetamismeetodiga või Löffleri meetodi järgi.

Löffleri meetod.

1. Preparaadile asetatakse peits - 6 minutit.

(Peits: 1 ml alusl. fuksiini küllastatud alkoholset lahust,
10 ml 25%-list tanniini vesilahust,
5 ml FeSO_4 küllastatud vesilahust).

2. Loputatakse veega.

3. Lastakse õhus kuivada.

4. Preparaadile asetatud filterpaberile valatakse Ziehli karboolfuksiini, soojendatakse kuni auru ilmumiseni ja lastakse toimida 4 minutit.

5. Loputatakse veega.

6. Kuivatatakse kergelt leegi kohal soojendades.

Mikroobid on värvunud intensiivselt punaseks ja viburid on roosad kuni punased.

B a k t e r i t e i n k l u s i o o n k e h a d e v ä r v i m i n e .

Bakterite rakuplasmas on mitmesugused teralised moodustised erinevate funktsioonidega. Mõnedes mikroobides, nagu difteeriategitajais esinevad volutiin- ehk metakromaatilised terad ehk Babes-Ernsti kehakesed. Need volutiinterad on ener-

giat kasutavais raku ensümaatilistes protsessides koondunud metafosfaadid. Peale selle võivad olla bakterirakkudes veel toitainete varud ladestunud teradena, nagu tärkli-, glüko-geeni-, lipiidide, ribonukleinhappeterad. Neid mitmesuguseid inklusioone saab nähtavaks teha erinevate värvimismeetodite abil. Volutiinterade nähtavaks tegemiseks kasutatakse kõige sagedamini Neisser-Ginsi meetodit.

Neisser-Ginsi meetod.

1. Preparaat fikseeritakse leegil.
2. Preparaadile valatakse värvilahuste segu:

2 osa	{	1 g metüleensinist,
		20 ml alkoholi 96 ^o ,
		50 ml ac.acetic.glaciale,
		950 ml aq.dest.
1 osa	{	1 g kristallvioletti,
		10 ml alkoholi 96 ^o ,
		300 ml aq.dest.

Selle seguga lastakse toimida 20-60 sek.

3. Loputatakse destilleeritud veega.
4. Lugoli lahuse + 1% ac.lactic. 10-30 sek.
5. Loputatakse destilleeritud veega.
6. Valatakse preparaadile vesuviini 30-80 sek.
(2 g vesuviini,
300 ml dest.vett).
7. Loputatakse destilleeritud veega.
8. Kuivatatakse, uuritakse.

Neisser-Ginsi värvimismeetodi kasutamisel on oluline silmas pidada värvide ja peitsi kasutamisel, et järjekorras kasutatud lahuste toimeaegade suhe oleks 2:1:3.

Volutiinterad värvuvad mustjasvioletseks ja rakukehad helepruuniks.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Valmistada preparaat *Bacillus mesentericus*'e kultuurist

- längagarilt, värvida Schaeffer-Fultoni järgi ja uurida.
2. Valmistada preparaat tuusi meetodi järgi Klebsiella pneumoniae' agarkultuurist ja uurida.
 3. Proteus vulgaris'e kultuurist valmispreparaat värvida Löffleri meetodi järgi ja uurida.
 4. Corynebacterium diphteriae' kultuurist valmispreparaat värvida Neisser-Ginsi meetodi järgi ja uurida.

IV p r a k t i k u m .

T e e m a: MIKROORGANISMIDE MORFOLOOGIA.

Mikroskoobiliste meetoditega, kasutades nii liht- kui ka liitvärvimise meetodikat, võib määrata peale bakterite kindlaks ka seente, spiroheetide ja algloomade kuju, asetust ja osalt ehitust.

S e e n e d .

Seened - Fungi kuuluvad mikroorganismide hulka. Need võivad olla kas ühe- või paljuraksed mikroskoopilised moodustised. Neid rühmitatakse kuju järgi: pärmseened, kiirikseened ja niitjad seened.

Pärmseened - Saccharomyces.

Pärmseened kuuluvad Ascomycetes'e klassi. Pärmseened erinevad kõigepealt teistest seentest selle poolest, et nad ei moodusta seenniidistikku e. mütseeli. Pärmseened on sõõrjad või ellipsoidsed ainuraksed liikumatud mikroorganismid. Pärmirakk on läbimõõduga 8-10 μ . Ta koosneb kestast ja rakuplastast. Rakuplastas on tuum ja esineb rohkesti inklusiõone - volutiinterakesi. Pärmseened paljunevad suguta teel - pungumise ja pooldumise abil ja sugulisel teel - askosporidega.

Pärmseente kuju, asetust ja ehitust võib määrata mikroskoobis, uurides eluskultuuri eseme- ja katteklaasi vahel või rippuvtilgameetodi järgi. Samuti võib pärmseeni uurida liht-

värvimismeetodiga, värvides neid näit. metüleensinise lahusega. Sel juhul on hästi nähtavad metakromaatiliselt - tume-roosakalt või tumevioletselt värvuvad volutiinterad, helesiniselt värvuv rakuplasma. Samuti võib rakkudel näha mitmesuguses suuruses väljasopistisi - pungi, mis näitab rakkude paljunemist.

Pärmisarnaste seente hulka kuulub ainurakne ($2,5 \times 4 \times 6 \mu$) rakkude pikenemisega ebaniidistikku moodustav *Candida albicans*. See on väike ovaalne punguv seen, millel esinevad niitjad moodustised, ovaalsed punguvad rakud.

Kiirikseened - Actinomycetes.

Kiirikseente nimetus tuleneb nende poolt aktinomükoosihaige kudedes moodustuvaist kiirjaist drusidest. Kiirikseened on oma ehituselt bakterite ja seente vahepealsed mikroorganismid. Sarnasus bakteritega avaldub nende morfoloogilises ehituses: puhaskultuuris on ühtlase niitja struktuuriga, kuid sageli niidid on lõigustunud, nii et neid kuju järgi on raske eristada baktereid. Tuumaine on neil sarnaselt bakteritele jaotunud rakus ebaühtlaselt. Erinevalt baktereid paljunevad nad eostega, niidi otsast eralduvate õhuooididega, mõned liigid paljunevad niitide fragmenteerumise teel. Kiirikseened on ainuraksed niitjad moodustised, kusjuures niidid hargnevad 90° nurga all dihhotoomiliselt, erinedes sellega niitjatest seentest, millel hargnemine toimub 45° nurga all. Patogeenne kiirikseen moodustab organismis 0,5-1 mm läbimõõdu terakesi - druuse, mis koosnevad keskosas seenniitide põimistikust, mida perifeerselt ümbritsevad radiaarselt asetatud kiirjad kolvitaolised moodustised. Kiirikseene niidid värvuvad gram-positiivselt ja kolvitaolised moodustised gram-negatiivselt.

Niitjad seened.

Taolised on ainu- kui ka paljuraksed, mitmesugused peamiselt hallitusseente hulka kuuluvad liigid. Seenniidid on kaetud suhteliselt tiheda tugevasti valguskiiri murdva raku-

kestaga. Seenniidid võivad olla eraldatud vaheseintega üksiku-
teks rakkudeks. Rakuplasmas esineb rohkesti rakumahla sisal-
davaid vakuole ja mitmesuguseid inklusioone. Seenerakul võib
olla kas üks või mitu tuuma. Seenniididel on omadus moodus-
tada niidistikku ehk mütseeli, mis vastavalt liigile võib olla
kas ainurakne või paljurakne. Sigimine võib olla suguta ja
suguline, kusjuures need generatsioonid vahelduvad. Suguta
sigimine erinevatel seeneliikidel võib olla väga mitmesugune.
Kõige lihtsam vorm on, kus seentel tekivad seenniidid eosed -
endosporiidid. Kõrgemalt diferentseerunud seentel tekivad ja val-
mivad eosed erilistes sõõrjates eospesades - sporangiumides
või seenniidil eriliste osade - koniidide kandja otsas ja
liituvad sellest ära; neid nim. lülieosteks - koniidideks.
Seente morfoloogia tundmaõppimiseks kasutatakse mikroskoobi-
list meetodit, uurides seenniidistikust valmistatud preparaate
nii natiiivsel kujul kui ka värvitult. Peale tavalise mik-
roskoobi võib kasutada uurimiseks faaskontrastmikroskoopi.

Seenniidistikust preparaat valmistatakse ettevaatlikult
võimalikult ilma seenniite mehhaaniliselt purustamata, sest
ainult nii valmistatud preparaadis võib täheldada ehituslikke
ja liigile iseloomulikke iseärasusi. Seente morfoloogia tund-
maõppimiseks võib näitena võtta kõige sagedamini looduses esi-
nevat hallitusseeni *G.Mucor*'i ja *G.Penicillium*'i liike.

G.Mucor'i seenniidistik moodustub ühestainsast rakust.
Mütseeli peal esinevad eospesade kandjad, mille otsas on üma-
rad sporangiumid, milles tekivad ja valmivad eosed.

G.Penicillium'i seenniidistik on paljurakne ja sellel
esinevad iseloomulikud eostoad (koniidide kandjad), mis on
pikitsitaoliselt haralised moodustised; iga haru otsas on rida
ümaraid kuulitaolisi eoseid.

S p i r o h e e d i d .

Spiroheedid erinevad oma kujult bakteritest ja selle tõttu
tuleb tundma õppida ka nende kui erilise rühma morfoloogilisi
omadusi eraldi.

Spiroheetide all käsitletakse kruvisarnaselt pikitelje

ümber keerdunud või lainetaoliste loogetega niidi- või lindisarnaseid ainurakseid mikroorganisme. Mikroskoobilisel uurimisel oleneb spiroheetide kuju sellest, kas neid uurida värvitult või natiivses preparaadis. Spiroheetide mõõdud on keskmiselt $0,3-0,8 \times 10-15\mu$. Üksikuid spiroheediliike iseloomustavad nende keha looked ja keerud ja vastavalt sellele klassifitseeritakse nad järgmiselt:

1. G. Spirochaeta - mikroobirakk on elastse keskteljega, mille ümber spiraalse trepiastmestikuna keerleb rakukeha.
2. G. Cristispira - spiraalne rakukeha on rakuplasma vahe-seintega jagatud kambrikesteks, piki rakukeha kulgeb spiraalse lindina eriline membraan - crista.
3. G. Saprospira on peaaegu eelmisega sarnase ehitusega, cristat asendab seljakuna paksenenud periplast.
4. G. Treponema on kitsaste sügavate ühtlaste ja korrapärase loogetega spiroheet sirgete niidikestena väljaveninud ots-tega. Lüseerub 10%-lises saponiinilahuses.
5. G. Leptospira on korrapärase väga tihedate spiraalidega, kusjuures niidikujulised otsad on konksutaoliselt kõverdunud. Spiroheet moodustab liikumisel sekundaarseid lookeid ja on resistentne 10%-lise saponiinilahuse suhtes.
6. G. Borrelia on ebaühtlaste spiraalidega mikroorganism, mille raku otstes on niidikesed.

Spiroheedid on aktiivselt liikuvad mikroorganismid, kusjuures neil võib täheldada paindumist, edasi-tagasi liikumist ja rotatsiooni ehk keerlemist ümber kesktelje.

Spiroheetide morfoloogia määramiseks kasutatakse nende uurimist värvitud preparaadis kas Romanovski-Giemsma meetodi, Fontana-Tribondeau' hõbetamismetodi või Grami meetodi järgi (gram-negatiivsed). Eriti oluline nende täpsema kuju määramiseks on uurimine natiivsel kujul. Selleks uuritakse neid ka pimeväljameetodi järgi.

Giemsaa-Romanovski meetod.

1. Äigepreparaat lastakse õhus kuivada.
2. Fikseeritakse metüülalkoholiga 3 min.
3. Romanovski-Giemsaa värvilahus asetatakse lahjenduses 1:15 30 min - 12 t.
4. Loputatakse hästi destilleeritud veega.
5. Lastakse kuivada, uuritakse.
Spiroheedid värvuvad roosakas-punaselt.

Fontana-Tribondeau' meetod.

1. Valmistatakse õhukene äigepreparaat.
 2. Õhus kuivanud preparaat fikseeritakse 96^o-se alkoholiga 3-5 min.
 3. 3-4 korda valatakse peale Ruge' lahust.
(1 ml ac. acetic.glac.,
2 ml formaliini,
100 ml dest. vett).
(See on punaliblede lõhustamiseks).
 4. Loputatakse 96^o-se alkoholiga. Alkoholi jääk preparaadil süüdatakse põlema ja kustutatakse kohe.
 5. Valatakse preparaadile peits, soojendatakse leegil auru ilmumiseni - lastakse toimida 30 sek.
(1 g tanniini,
20 ml dest. vett).
 6. Loputatakse preparaati kraaniveega 30 sek. ja siis destilleeritud veega.
 7. Valatakse preparaadile Fontana lahus - 60 sek.
(Fontana lahus: 5 g AgNO₃ + 100 ml dest.
vett + mõni tilk NH₄OH kuni opalestsentsi ilmumiseni)
- Sisä valatakse see ära ja asendatakse uue lahusega, soojendatakse kergelt leegil (kuni preparaat omandab metalse läikega mustjaspruuni värvuse), lastakse toimida 3 min.
8. Loputatakse destilleeritud veega 15 sek.
 9. Lastakse kuivada, uuritakse.

Spiroheedid on pruunid või mustad.

Pimeväljameetod.

Pimeväljameetodit rakendatakse mikrobioloogias sageli väikeste mikroorganismide uurimiseks kui ka üldse elusmikroobide kaju määramiseks. Siin asendatakse Abbé valgusaparaat eriliste pimeväljakondensoriga. Sellistest kondensorigest ei läbi objektiivide tsentraalsed valguskiired, sest neid takistab kondensori alumisele pinnale asetatud must ketas või kondensori sees olev kumerpeegel. Kondensori ava peab olema suurem kui objektiivide ava. Kondensorige pinnale pääsenud kiired peegelduvad seal vastavalt kondensori ehitusele, tungivad sellest läbi, läbivad esemelauale asetatud esemeklaasi ja katteklaasi vahel oleva uuritava materjali. Kui kiired ei puutu kokku uuritavas materjalis olevate mikroobidega või aineosakestega, põrkavad nad vastu katteklaasi ülemist seesmist pinda, peegelduvad ja väljuvad kondensorigest vastaspoolelt. Sel juhul on taust must - tume. Kiired, mis põrkavad vastu aineosakesi, murduvad, tungivad läbi objektiivide edasi vaatleja silma. Refraktsiooni tõttu saavad pimedal taustal vedelikus olevad mikroobid ja muud aineosakesed helendavatena nähtavaks.

Preparaat valmistatakse uuritavast materjalist õhukese kihina eseme- ja katteklaasi vahel. Uurimisel asetatakse kondensori ülemisele osale esemeklaasi alla seedriõli või glütseriin, mille valgusmurdukoeffitsient on praktiliselt võrdne klaasi omale, ja sellega suureneb mikroskoobi töövõime, kuna on välditud valguskiirte hajumine. Uurimisel mikroskoobis kasutatakse tasapeeglit ja täiesti avatud diafragmat.

A l g l o o m a d - P r o t o z o a .

Algloomad on ainuraksed mikroorganismid, kuid sealjuures võrreldes bakteritega tunduvalt keerulisema ehitusega. Rakule vajalikeks talitlusiks on rakuplasma eristunud organellideks. Algloomal võib rakuplasmas täheldada seemist vedelamat osa -

kärjetaolise ehitusega entoplasmat, milles asub tuum, kontraktiilsed vakuoolid raku ekskreetidega ja toitainete varud inkluioonidena. Väline osa on homogeenne tihedama ehitusega - ektoplasma, mis pinnal tiheneb pelliculáks. Algloomad paljunevad suguta - pooldumisel, pungumisel, mõningad osadeks jagunemisel ja suguliselt kopulatsiooni ja konjugatsiooni teel. Algloomad on liikuvad kas kulendite, viburite või ripsmete abil. Liigi säilitamiseks ebasobivates elutingimustes moodustuvad tsüstid.

Algloomad kuuluvad peamiselt 4 alljärgnevasse klassi:

1. Rhizopoda - juurjalgsed,
2. Flagellata - viburlased,
3. Ciliata - ripsloomad,
4. Sporozoa - eosloomad.

Erinevatesse klassidesse kuuluvate algloomade morfoloogiat võib mikroskoobilisel uurimisel kindlaks määrata natiivsetes preparaates eseme- ja katteklaasi vahel, rippuvtilgameetodi, pimeväljameetodi ja faaskontrastmikroskoobi abil; kuid algloomi võib uurida ka värvitud preparaates mitmesuguste meetodite järgi.

Mikrobioloogias on olulise tähtsusega rida patogeenseid algloomi. Neist Rhizopoda klassist kõigepealt Entamoeba histolytica, mille morfoloogiat võib uurida nii natiivses preparaadis kui ka värvitult raudhematoksüliiniga. Entamoeba histolytica on 30-40 μ läbimõõdus ainurakne mikroorganism, mille kuju liikumisel tekkivate kulendite tõttu muutub. Rakuplasmas on tuum, milles asub karüosoom. Oluliseks tunnuseks mittepatoogeenseist amööbidest eristamiseks on neil rakuplasmas fagotsüteeritud punalibled. Püsivormid - tsüstid ei sisalda punalibliesid, neis esineb tavaliselt 4 tuuma.

Flagellata klassist on tähtsad G. Trypanosoma ja G. Leishmania. G. Trypanosoma'esse kuuluvad mikroorganismid on umbes 12-15 μ suurused piklikud moodustised, millel laineliselt piki rakukõbra kulgev unduloeriv membraan lõpeb vaba viburina. Romanovski-Giemsa järgi värvitud preparaadis on rakuplasma värvunud heleainiselt, tuum ja membraan ühes viburiga punaselt.

G. Leishmania'esse kuuluvad algloomad on patoloogilises

materjalis väiksed ovaalsed 2-3 μ läbimõõduga viburiteta moodustised, mis värvuvad Romanovski-Giemsä järgi helesiniselt. Kultuurist valmistatud preparaadis on need algloomad piklikuma kujuga ja viburiga. Kultuuris on neile iseloomulik rosetikujuline asetus, kusjuures viburid on suunatud roseti keskele.

Sporozoa klassi *G. Plasmodium*'isse kuuluvad malaariatekitajad algloomad. Plasmooidid on punaliblesisesed parasiidid, neid võib uurida haige verest tehtud äigepreparaatides Romanovski-Giemsä järgi värvitult. Inimese punalibleses toimub plasmoodi suguta sigimise faas. Näitena vaatleksime kõige sagedamini esineva *Plasmodium vivax*'i arengut punalibles. Suguta sigimise faasi algul on see plasmood väike ovoidne kehake, mille läbimõõt on 1/5 punalible läbimõõdust. Ta tungib punaliblesse, areneb seal algsuurusest poole suuremaks rõngakeseks. Romanovski-Giemsä meetodi järgi on rõngake värvunud siniseks, üks osa rõngakesest on paksenenud ja moodustab sõlmekese, mis värvub punaseks. See vorm moodustab nagu pitsatsõrmuse. Siis hakkab rõngakujuline moodustis suurene- ma. Sel ajal tekib punalibles eriline pigmendi kogunemine Schüffneri tähnidena. Rõngad suurenevad, muutuvad ebakorrapärase kujuga amööbitaolisteks moodustisteks, mis on teraliselt pigmenteeritud. Siis omab plasmood ebakorrapärase ketta kuju, mis täidab kogu punalible. Punalible on ise suurenenud ja kahvatu värvusega. Pigment koguneb plasmoodi keskossa ratakodara taoliselt, perifeerselt tekivad plasmoodis sälgud, siis hiljem segmenteerub keskosa ja tekib tüüpiline morula- taoline moodustis. Siin on punalible tavaliselt 1,5 korda normaalsest suurem. Plasmood jaguneb 15-20 osaks - merotsoidideks, mis punalible lagunemisel pääsevad vereringesse ja on suutelised punaliblesse tungimisel uuesti algama arengut. Selline areng sel plasmoodi liigil kestab 48 tundi.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Valmistada kigepreparaat pärmseente suspensioonist, värvida Löffleri metüleensinisega 10 minutit ja uurida.
2. Candida albicans'i kultuurist valmispreparaat värvida Grami meetodi järgi ja uurida.
3. Kiirikseente kultuurist tehtud valmispreparaat värvida Grami meetodi järgi ja uurida.
4. G.Mucor'i liigi kultuurist valmispreparaat värvida Löffleri metüleensinisega 5 minutit ja uurida.
5. G.Penicillium'i kultuurist valmispreparaat värvida Löffleri metüleensinisega 5 minutit ja uurida.
6. Valmistada kigepreparaat ülemiste tagumiste molaaride hambakaeltel olevast hambakatust, värvida Giemsa-Romanovski meetodi järgi ja uurida.
7. Vaadata suuspiroheetide demonstratsioon pimeväljas.
8. Vaadata demonstratsiooniks väljapandud Leptospira, Treponema ja Borrelia preparaate.
9. Valmispreparaadis tundma õppida Plasmodium vivax'i morfoloogiat arengul punalibles.
10. Tundma õppida demonstratsiooniks väljapandud valmispreparaatides Leishmania, Trypanosoma ja Entamoeba morfoloogiat.

V p r a k t i k u m .

T e e m a: M I K R O O B I D E F Ü S I O O L O O G I A .

M i k r o o b i d e m o r f o l o o g i a
k o r d a m i n e .

M i k r o o b i d e f ü s i o o l o o g i a .

Mikroobide füsioloogia käsitleb nende peamisi elulisi funktsioone, nagu toitumist, liikumist, hingamist ja sigimist. Põhilise osa mikroobide uurimisel moodustab nende kasvatamine kunstlikel söötmeil, sest ainult kunstlikel söötmeil on võimalik igakülgsest uurida mikroobe.

Tähtsamaks välisteguriks mikroobidele on toit, mis on neil energiaallikaks ja sünteesi materjaliks. Mikroobiliigid on toitumise poolest väga erinevad, nii et iga mikroobiliigi toitumist võib nimetada omaette probleemiks. Osa mikroobe ammutab endale vajalikud toitained väga lihtsaist ühendeist, kuna osale on vajalikud keerulise struktuuriga orgaanilised ained. Mikroobid toituvad osmoosi teel, kusjuures rakukestal on selekteeriv võime, omadus valida sobivaimat toitu. Mikroobirakud ammutavad toitaineid ümbritsevast keskkonnast, mida nad kasutavad oma rakuplasma sünteesiks. See toimub terve hulga keemiliste protsesside näol.

Mikroobide kunstlikel söötmeil on tähtis koht mikrobioloogilistes uurimistes. Kunstlikkude söötmete rakendamine võimaldab isoleerida mikroobide puhaskultuuri, sest looduses esinevad peamiselt mitut liiki mikroobid koos. Kunstlikke söötmeid kasutatakse suure hulga mikroobide kasvatamiseks, nagu bakteriaalsete antigeenide ja vaktsiinide valmistami-

seks.

Mikroobid arenevad keskkonnas ainult vee juuresolekul, kuna nad kasutavad toitumiseks vees lahustunud toitaineid osmoosi teel. Neile on vajalikud kõigepealt toitumiseks 1) ained, mis osutuvad lämmastiku, süsiniku, hapniku ja vesiniku allikaiks, 2) mitmesugused anorgaanilised soolad, 3) vitamiinid või kasvu faktorid.

Olulisemaks on süsiniku ja lämmastiku allikad ja vastavalt sellele, milliseist ühendeist nad ammutavad need elemendid, liigitatakse mikroobe: 1) a u t o t r o o f s e d mikroobid, mis ei vaja toitumiseks orgaanilisi ühendeid. Siin on süsiniku allikaks enamasti õhu CO_2 , karbonaadid ja lämmastiku allikaiks ammoniaak ja ammooniumsoolad - mitmesugused lihtsad anorgaanilised ühendid, 2) h e t e r o t r o o f s e d mikroobid, mis vajaliku süsiniku saavad keerulise struktuuriga orgaanilistest ühenditest, kuna lämmastiku allikaks võivad olla mitmesugused ained, nagu a) mineraalühendid, b) amiinohapped, c) amiinohapped ja kasvu faktorid. Heterotroofseid mikroobe, kui nad kasutavad toitumiseks surnud orgaanilist ainet, nim. m e t a t r o o f s e t e k s, ja kui elus orgaanilist ainet - p a r a t r o o f s e t e k s.

Mikroobe saab liigitada trüptofaani vajaduse järgi: 1) osa mikroobe, mis ei kasva trüptofaani puudumisel, näit. Clostridium tetani, 2) mikroobid, mis ise lõhustavad valkudest vajaliku trüptofaani, näit. Escherichia coli, 3) mikroobid, mis algul kultuuris pole suutelised lõhustama, kuid hiljem lõhustavad endale kasvuks vajaliku trüptofaani.

Mikroobid vajavad söötmeil kasvuks kas või minimaalsetes hulkades mitmesuguseid anorgaanilisi ühendeid, nagu K_2HPO_4 , $MgSO_4$, NaCl, $FeSO_4$, $CaCl_2$ jne.; need soolad lahuseis ioniseerituna on katalüsaatoreiks rakus toimuvates keemilistes protsessides. Osa elemente võib esineda söötmeis küllaltki suures koguses, nagu Na, K, Ca, Mg jne. 0,1% kuni 0,8%. Teiste elementide, nagu Fe, Cr, Cu jne. juuresolek on vajalik ainult minimaalsetes hulkades, need mikroelemendid tavaliselt satuvad söötmeisse juba vajalikul hulgal koos teiste ühenditega või veega.

Sõõtmeis on mikroobidele kasvuks vajalikud veel erilised ained, kasvufaktorid. Kasvufaktoreiks nimetatakse selliseid aineid, mille minimaalsete hulkade juuresolek, ilma et mikroob neid sünteesiks, toimib keemiliste protsesside katalüsaatorina või aitab moodustada selliseid katalüsaatoreid. Sellisteks aineteks võivad olla rakuplasma sünteesiks mittevajalikud amiinohapped, mitmesugused puriin- ja püridiinderivaadid, eriti aga vitamiinid, nagu B-vit. kompleksi kuuluvad ained.

M i k r o o b i d e k u n s t l i k u d s õ õ t m e d.

Mikroobide kunstlikkude sõõtmete kohta kehtivad järgmised põhinõuded:

- 1) sõõde peab sisaldama kõiki vajalikke aineid mikroobi toitumiseks;
- 2) sõõde peab olema steriilne, sest muidu pole võimalik isoleerida puhaskultuuri;
- 3) sõõtmel peab olema optimaalne vesinikioonide kontsentratsioon;
- 4) sõõde peab olema võimaluse piires selge ja läbipaistev, et kergem oleks määrata mikroobide kasvu olemasolu.

Mikroobide sõõtmed ei pea mitte ainult sisaldama mikroobidele toitumiseks kõiki vajalikke elemente, vaid sõõtme füüsikalise-keemilised omadused peavad vastama mikroobide eksisteerimise optimaalsetele tingimustele. Sõõtmeal peab olema optimaalne pH, niiskus, osmootsed omadused, konsistents jne. Kui sõõde vastab kõigile neile nõudele, siis on ta mikroobidele kasvuks optimaalne.

Mikroobide sõõtmeid võib rühmitada järgmiselt:

- 1) liht- ehk põhisõõtmed,
- 2) valik- ja diferentsiaaldiagnostilised sõõtmed,
- 3) sünteetilised sõõtmed,
- 4) dehüdreeritud sõõtmed.

Peale selle jagunevad veel sõõtmed vedelateks ja tahketeks sõõtmeteks.

Lihavesi.

Enamiku sõõtmete aluseks on lihavesi, mille valmistamiseks võetakse 500 g rasvata, kõõlusteta ja kestadeta loomavõi hobuseliha, hakitakse peeneks ja asetatakse 1000 ml kaevuvette 12 tunniks matsereeruma, siis keedetakse 30 minutit 100°C juures, kurnatakse ja asetatakse kolbidesse või pudelitesse ja steriliseeritakse. Seda lihavett võib kasutada sõõtmete valmistamiseks.

Lihapeptonpuljong.

Lihaveele lisatakse 1 l kohta juurde 10 g peptooni, 5 g NaCl, keedetakse, reguleeritakse pH 7,6-8,2-le, filtritakse ja steriliseeritakse mitmesugustes nõudes vastavalt vajadusele kas katsutites või kolbides 20 minutit 115° C juures autoklaavis.

Martin'i peptonvesi.

See valmistatakse pestud ja peeneks hakitud seamagudest, võetakse 250 g seamagusid 1000 ml destilleeritud vee kohta ja 10 ml HCl (erik. 1,18). Siis hoitakse 24 tundi 50° C juures. Sel juhul lõhustab maolimanahas olev pepsiin valgud peptoniks. Võetakse vedelik, neutraliseeritakse ja steriliseeritakse 20 min. 115° C juures. Lihapeptonpuljongi valmistamiseks lisatakse Martin'i puljongit lihaveele võrdses koguses.

Hottingeri puljong.

Võetakse 500 g rasvata, kõõlusteta ja kestadeta lihatükke ja asetatakse 1 l keeva kaevuvette, keedetakse 15-20 min. 100° C juures. Siis hakitakse liha peeneks, reguleeritakse vedeliku pH 8,0 ja lastakse liha ja vee segu jahtuda 45-40°-ni, lisatakse juurde pankreatiini 0,5-1%. Aegajalt loksutatakse ja reguleeritakse pH 7,7-8,0. Antud segule lisatakse 2-3% kloroformi. Suletakse pudel õhukindlalt kummikorgiga. Pudelis ei tohi segu olla üle 2/3 kogu pudeli mahust. Nüüd asetatakse pudel termostaati 7-14 päevaks. Vahepeal aegajalt loksutatakse ja iga loksutamise järel avatakse kork kloroformi aurude eemaldamiseks. Lõpuks filtritakse. Hottingeri puljongit võib kasutada lihapeptonpuljongi kui ka teiste

söötmete valmistamiseks, lahjendades seda veega 1:5 või 1:10 vastavalt vajadusele.

Taoliste põhisöötmetena võib kasutada taimseid autolüsaate, nagu pärmseente autolüsaati, linnasevett jne. mitmesuguste söötmete alustena.

Lihtsöötmeina on veel kasutusel vedelad loomsed produktid, nagu piim, sapp jne.

Tahked söötmed võivad olla kõigepealt mitmesugused taimsed produktid, nagu kartul, porgand, puuviljad jne., siis leib jt.

Enamikul juhtudel saadakse aga tahkeid söötmeid mõningate indiferentsete tahkestuvate ainete lisandamisega või kasutatakse tahke söötmena koaguleeritud valke, nagu vereseerumit jne.

Mikrobioloogia ajaloos kasutati esmase tahke söötme alusena želatiini, mis valmistatakse vasika kontidest, peadest, jalgadest jne. Želatiin on keerulise struktuuriga valguline ühend, põhiline tarduv aine on kollageen. Želatiini sulamistemperatuur on 32-34° C. Tahke söötme saamiseks lisatakse lihapeptonpuljongile 10-15% želatiini. Kuid sellisel tahkel söötmel võib mikroobe kasvatada ainult 20-30° C juures, mitte aga patogeensetele mikroobidele vajaliku 37° C juures. Selles temperatuuris on želatiinsööde vedel ja pealegi veeldavad želatiini ka mikroobid oma proteolüütilise fermentiga.

Parimaks, võiks öelda ideaalseks tahke söötme aluseks on agar-agar, mis saadakse Genus Florideae'sse kuuluvaist merivetikaist kuivatamisel. Agar-agar sisaldab vähe lämmastikühendeid, peamine koostisosa on pektiinitaoline gelloos polüsahhariidi päritoluga, mis pundub vees, lahustub keemisel 92-95° C juures ja jahtudes tardub 40-50° C juures. Agar-agar lahustub keemisel, tekib liimjas lahus, mis jahtumisel tardub. Söötme tahkestamiseks lisatakse 1,5-2% agar-agarit lihapeptonpuljongile, et saada lihapeptonagarit. Sellist söödet ei veelda mikroobid oma fermentidega ja see püsib tahkena igasuguse vajaliku kasvutemperatuuri juures.

Need on tähtsamad liht- ehk põhisöötmed, mida kasutatakse paljude mikroobide kasvatamiseks ja mis võivad olla

aluseks valiksõõtmete ja diferentsiaaldiagnostiliste sõõtmete valmistamisel.

Elektiivsed ehk valik- ja diferentsiaal- diagnostilised sõõtmed.

Valiksõõtmed saadakse, kui mikroobide kasvu soodustamiseks on vajalik teatud ainete lisandamine, näit. glükoosi lisatakse 1-2% lihapeptonpuljongile või -agarile.

Osale mikroobidest osutub vajalikuks 5-10% defibrineeritud vere, vereplasma või -seerumi lisandamine lihtsõõtmeile. Mõningail juhtudel on sõõtmes vajalik kanamunakollane jne. Elektiivsed sõõtmed võivad olla äärmiselt keerulise koostisega, sisaldada loomse päritoluga valke, amiinohappeid, mitmesuguseid anorgaanilisi ühendeid ja kasvufaktoreid.

Elektiivsed sõõtmed võivad olla koostatud selliselt, et ainult teatud soovitud mikroobiliik kasvab hästi vastaval sõõtmel; teiste mikroobide kasvu pidurdamiseks lisatakse sõõtmeile kas mõningaid värvaineid, kemikaale, sappi jne. või kohandatakse sõõtme reaktsioon sobivaks ainult ühele liigile.

Tähtsaks valiksõõtmeks on näit. L ö f f l e r i s õ õ d e, mis valmistatakse kolmest osast vasika või lamba vere-seerumist ja ühest osast 1%-lisest glükoos-lihapeptonpuljongist. Seda segu koaguleeritakse vastavas koagulaatoris I päeval - 80° C juures 2 tundi, II päeval - 80-85° juures 1 tund ja 90-95° juures 1 tund.

Sellist koaguleeritud tahket vereseerumsõõdet kasutatakse patogeensete mikroobide, näit. difteeriatekitajate kasvatamiseks.

D i f e r e n t s i a a l d i a g n o s t i l i s i sõõtmeid kasutatakse mikroobide biokeemilise aktiivsuse määramiseks. Mikroobidel esinevate fermentatiivsete omaduste määramiseks kasutatakse süsivesikuid, alkohole ja glükosiide sisaldavaid sõõtmeid, millele on juurde lisatud indikaator happelise reaktsiooni kindlakstegemiseks ja käärimistoruke vabaneva gaasi demonstreerimiseks.

Kõigi eespool toodud sõõtmete kvalitatiivne ja kvanti-

tatiivne keemiline koostis pole täpselt teada, kuna enamikul juhtudel kasutatakse loomse või taimse päritoluga söötme koostisosi.

Sünteesilised söötmed.

Sünteesilised söötmed on sellised, mille valmistamiseks kasutatakse keemilisi ühendeid ja vett täpsetes hulkades või kindlas vahekorras. Kasutades selliseid söötmeid, võib uurida bakteri ainevahetusprotsessi ja määrata üldse bakterite eluliste funktsioonide mehhanisme. Lülitades siin söötimest välja mõne aine või muutes tema kontsentratsiooni, võib mikroobirakus tekkinud muutuste järgi otsustada vastava aine vajalikkust mikroobile. Sünteesiliste söötmete valmistamiseks kasutatakse keemiliselt puhtaid aineid ja lahustatakse need bi-distilleeritud vees.

Dehüdreeritud söötmed.

Sageli on väiksemates laboratooriumides raskusi söötmete valmistamisega. Selleks valmistatakse tööstuslikult igapäevases töös kõige sagedamini kasutusel olevaid söötmeid kuivisöötmetena pulbri kujul. Neid saab kasutada, kui pulbrit lahustada vees 1,5-6% kontsentratsioonis ja segu keeta eeskirjade kohaselt, mis on kaasas vastavail söötmeil.

Söötmete pH määramine.

Patogeensed mikroobid nõuavad oma kasvu optimumiks teatavat kindlat vesinikioonide kontsentratsiooni söötmeis. Enamik mikroobe kasvab neutraalses või nõrgalt leeliseses keskkonnas. Söötmete valmistamisel määratakse söötmes pH ja et see tunduvalt ei muutuks steriliseerimisel või mikroobide kasvu kestel, selleks lisatakse söötmeile regulaatoreid e. puhvreid. Need on ained, mis omavad afiinsust hapetele ja leelistele, sellega neutraliseerivad söötmele lisanduva happe kui ka leelise, hoides alal söötme esialgse vesinikioonide kontsentratsiooni. Söötmeile lisatakse regulaatoreina tavaliselt

fosforhappe Na- ja K- primaarseid ja sekundaarseid sooli, kusjuures pepton ja lihaveesi ise on ka juba puhvriteks.

Mikroobide söötme reaktsiooni sobivus sõltub vesinikioonide kontsentratsioonist - tõelisest happesusest. Seda märgime pH-ga. Tõeline happesus sõltub aga söötmes olevate hapete ja leeliste elektrolüütilisest dissotsiatsioonist teatud olukorras. Dissotsiatsiooni ulatus lahuses aga oleneb happe või leelise lahjendusest, temperatuurist, regulaatoreist jne.

Tõelist ehk aktuaalset happesust - vabade H-ioonide kontsentratsiooni lahuses määratakse 1) elektromeetriliselt ja 2) kolorimeetriliselt.

Elektromeetriliselt määratakse tuntud ja tundmata lahuste potentsiaalide vahet. Kolorimeetriliselt meetodil peab söötmele lisatud indikaator muutma oma värvust, nii et värvivarjundid varieeruksid koos söötme vesinikioonide kontsentratsiooni muutustega.

Tavaliselt kasutatakse kolorimeetristest meetoditest Michaelise meetodit. Sel puhul võetakse terve rida indikaatoreid, mille värvivarjundid sõltuvad pH-muutustest lahuses. Valmistatakse erinevate vesinikioonide kontsentratsiooniga standard-indikaatorlahused, mis värvuselt erinevad, ja nendega võrreldakse uuritava söötme värvust vastava indikaatori lisandusega.

Standard-indikaatorlahuste valmistamiseks kasutatakse nitrofenooli destilleeritud vees järgmiselt:

0,3%	meta-nitrofenool	erineva värvusega	pH 6,8-8,4	piires,
0,1%	para-nitrofenool	"	"	pH 5,4-7,0 "
0,25%	γ -dinitrofenool	"	"	pH 4,0-5,6 "
0,05%	α -dinitrofenool	"	"	pH 2,8-4,4 "

pH määramiseks Michaelise meetodi järgi võetakse puust plokkstatiiv 4-le katsutile. Kõigepealt valmistatakse uuritava vedelsöötme lahendus destilleeritud veega 1:3. Söötmed on tegelikult puhverlahused, mida võib destilleeritud veega lahjendada, ilma et nende pH muutuks. Söötme lahjenduseks võetakse kolbi 10 ml destilleeritud vett ja 5 ml söödet. Edasi asetatakse järgnevalt katsutitesse, näit.: katsutisse nr.1 6 ml söötme lahendust + 1 ml meta-nitrofenooli, kat-

sutisse nr.2 6 ml söötme lahjendust + 1 ml dest. vett, katsutisse nr.3 6 ml destilleeritud vett.

Katsutid asetatakse statiivi ja neljandale kohale standard-indikaator metanitrofenooliga. Siis võrreldakse läbivalgustusel standard-indikaatori värvust vastavalt söödet ja metanitrofenooli sisaldava katsutiga ja hinnatakse ühesuguse värvuse esinemisel pH.

Kartulsöötme valmistamine.

Puhtaks pestud kartulid kooritakse hõbenoaga ja lõigatakse kuupjateks kogu suuruses. Kuupjad tükid asetatakse nõusse destilleeritud vette. Siis lõigatakse puuriga 4-5 cm kõrgused silindrikujulised tükid läbimõõdus 1-1,5 cm ja poolitatakse pikuti diagonaalselt. Tükid kuivatatakse filterpaberiga ja asetatakse Roux' kartulsöötme katsutitesse. Katsuti põhja asetatakse mõni ml vett või 5%-list glütseriinipuljongit kuni kartuli alumise osani. Kartulsöötmed steriliseeritakse autoklaavis 120° C juures 20 minutit. Peale steriliseerimist asetatakse söötmed lügasendisse jahtuma.

K ü l v i t e h n i k a.

Mikrobioloogilistes uurimistes on tähtsaim koht külvide teostamisel ja kultuuridest preparaadi valmistamisel. See tegevus peab toimuma teatud kindlate väljakujunenud ratsionaalsete võtetega, mis tagavad töö edukuse ja ühtlasi ka ohutuse. Sealjuures tuleb veel erilist tähelepanu osutada sellele, et kogu töö kestel meid ümbritsevast keskkonnast, õhust, ei satuks juhuslikud mikroobid katsuteisse ega reostaks kultuure. Sellise reostuse vältimiseks hoitakse avatud klaasnõud käes lügasendis ja nende suudmed kuumutatakse leegil pärast avamist ja enne vattkorgiga sulgemist, et katsuti või kolvi avale juhuslikult langenud mikroobid häviksid.

Bakterioloogilised külvid uuritavast materjalist kunstlikkudele söötmetele katsuteis ja kolbides tehakse väiksemate materjalihulkade puhul külvinõela või -aasa abil ja suuremate

hulkade puhul Pasteuri pipetiga või gradueeritud pipetiga. Külvid söötmeplaatidele tehakse külvinõela ja Drigalski kepikese abil.

Katsutitesse võib teha külve kahel viisil, nii et korraga on käes ainult üks katsuti või mõlemad katsutid.

Esimesel juhul tehakse külvi järgmiselt: lüngasendis katsuti külvatava materjaliga võetakse vasakusse kätte esimene kolme sõrme vahele, nii et katsuti toetub põidla ja esimese sõrme vahele põhjaga käe dorsaalsele pinnale. Sel juhul on ka katsuti sisu kogu ulatuses hästi nähtav. Paremasse kätte võetakse esimese kolme sõrme vahele pliiatsi asendis külviaas (või -nõel), nii et külviaasa ja klaaskepikese osa 20 cm ulatuses oleks vaba. Külviaas steriliseeritakse leegis kuumutamiseks kuni hõõgumiseni, siis lastakse kergelt leegist läbi ka traadi jooteosa klaaskepikese küljes. Selle järel lastakse külviaas jahtuda. Siis võetakse katsutilt puuvillkork kerge kruviva liigutusega parema käe peopesa ja viienda sõrme või dorsaalselt neljanda ja viienda sõrme vahele, kuhu see kork jääb kogu külviprotsessi ajaks. Siis kuumutatakse leegil katsuti suudmeosa. Nüüd võetakse külviaasaga katsutist materjal ettevaatlikult ilma katsuti seinu ja suudmeosa puutumata. Selle järel kuumutatakse leegil katsuti suudmeosa, katsuti suletakse puuvillkorgiga endise kruviva liigutusega ja asetatakse statiivile. Nüüd võetakse vasaku käega katsuti, näit. lüngagarsöötme eespool kirjeldatud asendis, nii et söötme pind ülespoole jääb. Jällegi avatakse katsuti parema käega nagu eelmisel korral, kuumutatakse suudmeava, viiakse külvatav materjal külviaasaga katsutisse söötmele. Külvi teostamist lihtlüngagarile alustatakse katsuti põhjast, libistades aasa söötme pinnal tihedate siksakjoontega kogu ulatuses. Siis kuumutatakse leegil katsuti suudmeosa, suletakse vattkorgiga ja asetatakse statiivile. Selle järel steriliseeritakse külviaasa leegil kuni hõõgumiseni, lastakse leegist läbi ka jootekoht ja a l l e s s i i s a s e t a t a k s e k ü l v i a a s s e l l e k s ettenähtud statiivile.

Teisel juhul on erinevus ainult selles, et võetakse eespool kirjeldatud asendis vasakusse kätte 2 katsutit, s.o.

külvatava materjali kui ka söötme katsutid, nii et endale on lähemal külvatava materjali katsuti. Katsutitelt eemaldatakse vattkorgid samuti parema käega, kusjuures korgid jäävad peopesa ja viienda sõrme ning neljanda ja viienda sõrme vahele. Külviaas on samuti paremas käes ja külv tehakse nagu eelmisel juhul, siis kuumutatakse enne ja pärast külvi mõlemad katsuti suudmeavad korraga ja suletakse katsutid. Muu osa külviprotsessist on eespool kirjeldatud.

Vedelsöötmesse tehakse külvid samal viisil. Üldse eespool kirjeldatud katsutite avamine ja sulgemine toimub alati steriilsetes tingimustes bakterioloogiliste menetluste läbiviimisel.

Pistekülv katsutis püstasendis tahkesse söötmesse tehakse nii, et külvatav materjal viiakse külvinõelaga söötmesamba keskosas katsuti põhjani. Pistekülvi võib ka teostada nii, et vasakus olev söötmega katsuti asetatakse avaga alla ja paremas käes püstasendis olevale külvinõelale lastakse vabalt langeda söötmega katsuti, nii õelda vajuda katsuti raskusega.

Külve söötmeplaatidele Petri tassides võib teha sektoerisse külviaasaga või -nõelaga. Vasakusse kätte võetakse söötmeplaat (kaas jääb avatult lauale), seda hoitakse vertikaalasendis, nii et Petri tassi küljeosa takistab õhust mikroobide langust söötmele ja siis paremas käes oleva külviaasaga tehakse külv siksakjoonena söötmele.

Külvi tahkesse agarsöötmesse tehakse järgmiselt: kõigepealt sulatatakse püstagarsööde katsutis vesivannis keemistemperatuuri juures ja jahutatakse vesi vesivannis 45-48^oC, s.o. temperatuurini, kus agar on veel vedel ja mikroobid ei hävi. Nüüd külvatakse vastav materjal agarisse kas pipetiga või külviaasaga jne. Korgiga kaetud katsuti võetakse peaaegu horisontaalasendis peopesade vahele. Edasi-tagasi roteerides seguneb materjal ühtlaselt söötmega. Selle järel eemaldatakse katsutilt kork, kuumutatakse suudmeosa leegil ja valatakse sisu Petri tassile, hoides kaant avatud söötme pinna kohal. Siis suletakse Petri tass ja lastakse tahkuda horisontaalsel pinnal.

Rippuvtilgameetod.

Rippuvtilgameetodit kasutatakse elusmikroobide uurimiseks, peamiselt nende kuju ja liikuvuse määramiseks. Selleks kasutatakse Kochi kambrikesega esemeklaase ja katteklaasi. Võetakse väike mustaks värvitud puust plokk, asetatakse sellele katteklaas. Katteklaasi keskosale pannakse külviaasaga uuritava mikroobide suspensiooni või vedelkultuuri tilk. Esemeklaasil olev ümar õõnsus e. Kochi kambrike piiratakse vaseliinribaga ja nüüd asetatakse esemeklaas õõnsusega allapoole tilgakohta, nii et katteklaas kleepub vaseliiniga esemeklaasi külge ja tilk jääb õõnsuse keskosas. Siis pööratakse kiire sujuva liigutusega esemeklaas normaalasendisse, nii et ta õõnsuse kohale jääb katteklaasi küljes rippuv tilk. Selliselt valmistatud preparaat asetatakse mikroskoobi alla ja uuritakse kuivsusüsteemi objektiividega. Kõigepealt otsitakse nõrga suurendusega üles tilga ääris. Samal ajal vähendatakse mikroskoobi valgustustugevust diafragma osalise sulgemisega ja kondensori langetamisega, nii et paremini oleks nähtav värvusetu tilk. Siis vahetatakse tugev suurenduse objektiiv, ja makromeeterkruvi abil silma kontrolli all langetatakse objektiiv kuni katteklaasini. Sellejärel juba tõstetakse mikromeeterkruvi abil tuubust ja fookustatakse preparaat, nii et heledad mikroobid on hästi nähtavad tumedamal taustal.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Morfoloogia kordamiseks värvida valmispreparaat Grami meetodi järgi ja määrata kuju, asetuse, värvumuse ja ehituse järgi, millise mikroobiliigi või liikidega on tegemist preparaadis.
2. Jälgida demonstratsiooniks väljapandud mikroobide söötmeid.
3. Määrata lihapeptonpuljongis pH kolorimeetriliselt Michaelise meetodi järgi.
4. Valmistada kartulsööde.
5. Tutvuda termostaadi ja koagulaatoriga.

6. *Escherichia coli* suspensioonist teha külv lihapeptonpulgongisse külviasaga.
7. Stafülokokkide suspensioonist teha külv külvinõelaga püst-agarsöötmesse.
8. Rippuvtilgameetodiga uurida *Proteus vulgaris*'e liikuvust.

VI p r a k t i k u m .

T e e m a: PUHASKULTUURI ISOLEERIMINE. ÕHU JA VEE MIKROBIO-
LOOGILINE UURIMINE.

T e o s t a t u d k ü l v i d e u u r i m i n e .

Eelmisel korral teostatud külvide kontrollimisel tuleb vaadelda, kas kultuurides esineb ainult külvatud mikroobiliik või on leida seal juhuslikult sattunud muid mikroobe.

Escherichia coli annab puljongis kasvades ühtlase häguse ja väikese sademe katsuti põhjas. Preparaadi valmistamiseks tuleb võtta materjali aasaga katsuti põhjas olevast sademest, selleks eelnevalt vältides vedeliku loksutamist katsutis. Värvides preparaati 1:10 lahjendatud Ziehl'i karboolfuksiiniga 5 minuti kestel, on selles mikroskoobilisel uurimisel näha ebakorrapärase asetusega lühikesi ümarate otstega pulgakesi, kolibaktereid.

Püstagarisse tehtud pistekülvis tuleb võtta preparaadi valmistamiseks materjali ettevaatlikult söötme pinnalt piste kohalt ja see ühtlaselt laiaili hõõruda väikeses veetilgas esemeklaasil. Õhus kuivanud ja leegis fikseeritud preparaadi värvimisel Grami järgi on näha preparaadi uurimisel gram-positiivseid kobarja asetusega kerajaid baktereid, stafülokokke.

Puhaskultuuride isoleerimine.

Loomulikes tingimuses, s.t. kõikjal looduses leidub mitmesuguseid mikroobe enamasti üheaegselt koos paljude liikidega. Seepärast tuleb arvestada, et uuritavas materjalis võib samaaegselt leiduda mitmesuguseid erinevaid mikroobiliike. Mikroobide samastamiseks ehk identifitseerimiseks ühe või teise liigina on laboratoorses praktikas tingimata vajalik eraldada söötmeil üksikuid liike, s.t. isoleerida mikroobi puhaskultuur.

Kõiki mikroobide puhaskultuuride isoleerimise meetodeid võib eraldada kahte rühma:

- 1) meetodid, mis põhinevad mikroobide mehhaanilisele eraldamisele;
- 2) bioloogilised meetodid, mis võimaldavad uuritavat mikroobi eraldada oma erinevate omaduste poolest teistest temaga koos esinevatest liikidest.

Esimesse rühma kuuluvad järgmised meetodid:

1. Külv Drigalski kepikese abil söötmeplaadile.

Võetakse steriilsed Petri tassid ja valatakse tassi põhja vesivannis keetmisel sulatatud lihapeptoonagarsööde. Peale söötme täielikku tardumist kuivatatakse tassid 20-30 minuti kestel termostaadis 37° C juures.

Steriilse jahtunud külvinõela või aasaga võetakse uuritavat ainet, asetatakse tassi põhjas asuvale söötme pinnale, tõstes vasaku käega ühest küljest Petri tassi kaant vaid niipalju, et külvinõel pilust sisse mahub. Siis võetakse leegis steriliseeritud ja täielikult jahtunud Drigalski kepike (viimane kujutab roobitaolist kõveraks painutatud klaaspulgakest) ja hõõrutakse sellega külvimaterjal tahke söötme pinnal laiali. Seejuures hoitakse vasaku käe pöidla ja nimetissõrmega tassi kaant ühest küljest vähe kõrgemal tassi põhja kohal nii, et Drigalski kepike sisse mahuks. Sama käe kolmanda ja neljanda sõrme abil keeratakse tassipõhja laual ringi, kuna parema käega liigutatakse Drigalski kepikest ühes suunas edasi-tagasi.

Ettevaatlikult liikudes Drigalski kepikese painutatud küljega mööda söötme pinda 15-20 sekundi jooksul, hõõrutakse külvimaterjal hajali üle kogu söötme. Seejuures ei tohi kepikest hoides sellele vajutada, kuna vastasel korral võib agarsöödet lõhkuda. Siis võetakse kepikese painutatud külj tassist ja lastakse selle kaas langeda alusele. Osa külvimaterjalist ühes mikroobidega jääb painutatud küljele. Sama pulgakese, mida hoiti õhus, nii et see kuhugi vastu ei puutuks, hõõrutakse vajaduse korral veel teise ja kolmanda Petri tassi söötme pinda. Mitme tassi kasutamine üheks külviks on oluline siis, kui külvimaterjal sisaldab väga suurel hulgal mikroobe. Siis steriliseeritakse Drigalski kepike leegis. Külviga Petri tassid asetatakse põhjaga ülespoole ja tehakse märkmed külvi kohta tassi põhjale. Siis asetatakse külvid termostaati 37° C juurde 24 tunniks. Igast eluvõimelisest mikroobist areneb paljunemisel palja silmaga nähtav pesa, mida võib tavaliselt näha juba järgmisel päeval.

Järgmisel päeval vaadeldakse külvi tulemusi, hoides Petri tassi vertikaalselt vastu valget, põhjaga enda poole. Juhul, kui külvimaterjal sai hästi laiali hõõrutud, on näha söötme pinnal erineva kuju, värvuse ja suurusega mikroobipesi, mis asuvad ühtlaselt hajali üle kogu pinna. Kui aga materjal puudulikult laiali hõõrutiti, võib näha tassi keskosas erinevaid pesi tihedalt koos ühtlase limase katuna, kuna tassi perifeerias on sööde laias ulatuses puhas, ilma ühegi pesata.

Juhul kui üks ja sama materjal külvati eespool kirjeldatud viisil järgemööda kolmele Petri tassile, on esimesel tassil näha pesi kõige rohkem ja kõige tihedamalt, teisel tassil hõredamalt, kuna kolmandal on kõige vähem pesi, mis paiknevad hästi isoleeritult üle kogu söötme pinna. Nüüd uuritakse algul mikroskoobiliselt, siis palja silmaga või luubiga nende suurust, kuju, värvust, pinda. Kui näiteks võeti külviks materjal, mis sisaldas *Escherichia coli*'t ja *Staphylococcus aureus*'t, siis on näha söötmel kahesugused pesad: suuremad enam läbipaistvad sinakashallid kolibakterite pesad ja vähemad kumera pinnaga kuld kollast värvust stafülokokkide pesad.

Eraldi seisvad erinevad pesad märgitakse ära klaasipliit-

signa, võetakse neist nõelaga vähe materjali, tehakse äige-preparaadid esemeklaasil väikeses veetilgas ja värvitakse Grami meetodil. Nimetatud preparaatide põhjal veendutakse, et suuremad lamedamad sinakashallid pesad sisaldavad ainult gram-negatiivseid pulgakesi, kolibaktereid, kollast värvi vähemad pesad aga gram-positiivseid kobarjaid stafülokokke. Sel teel kontrollitud pesadest võetakse steriilse külvinõelaga materjali ja külvatakse eraldi söötmeile - Escherichia coli pesast lihapeptonpuljongi, Staphylococcus aureus'e pesast lüagagarile või veriagarplaadile. Külvid asetatakse jälle termostaati 37° C juures 24 tunniks.

Kolmandal päeval kontrollitakse külve Grami järgi värvitud preparaatides ja uuritakse puhaskultuurina isoleeritud mikroobide morfoloogilisi, kultuurilisi jt. omadusi.

2. Joonkülv söötmeplaadile.

Puhaskultuuri isoleerimine võib toimuda Petri tassi valatud lihapeptonagaril ka järgmisel meetodil: uuritavat külvimaterjali võetakse aasaga või nõelaga. Vasaku käega võetakse Petri tassi põhi lihapeptonagariga, ja hoides seda silmade kõrgusel peaaegu vertikaalselt, tõmmatakse ettevaatlikult paremas käes hästi lapiti hoitud külviaasaga söötme pinnale paralleelsed jooned, mis asetsevad üksteisest vähemalt poole sentimeetri kaugusel. Igale joonele jätab külviaas kordkorralt vähem mikroobe. Isoleeritud pesi leidub peamiselt viimastes joontes. Neid kontrollitakse ja külvatakse eraldi söötmeile nii, nagu eespool kirjeldatud.

3. Lahjendusmeetod.

Võetakse rida (5 ja enam) katseklaase, milles igaüks on 9 ml lihapeptonagarsöödet, ja sulatatakse sööde vesivannis keetmisel. Siis lastakse vesi jahtuda vesivannis kuni 45° C ja asutakse külvi teostamisele. Võetakse külvimaterjali graueeritud pipetiga 1 ml või külviaasaga üks aasatäis ja külvatakse see ühte katsutisse 9 ml söötmega. Siis segatakse külvitud materjal söötmega hästi segi, veeretades katsutit

kiirelt peopesade vahel (seejuures vältides agarsõotme tardumist). Seejärel võetakse samast katsutist uue steriilse pipetiga 1 ml või üks aasatäis ja külvatakse edasi järgmisesse katsutisse 9 ml sõotmega, mida taas läbi segatakse. Nii tehakse ühest katsutist teise tõusvad lahjendused kuni viimase katsutini ja asetatakse need jälle vesivanni 45° C juurde. Siis võetakse nii palju steriilseid Petri tasse, kui oli katsuteid, ja valatakse iga tassi põhja ühe katsuti sisu ning lastakse tarduda. Seejärel asetatakse külvid termostaati 37° C juurde. Hästi isoleeritavaid üksikult asetsevaid pesi võib täheldada tassides kõrgemate materjali lahjendustega.

Sellist lahjendust võib läbi viia ka vedelsõotmeis, milleks kasutatakse suuremal arvul sõotmega katsuteid. Viimastes lahjendustes võib sel teel leiduda vaid üks mikroobirakk, mis paljunedes annab soovitud puhaskultuuri. Nimetatud menetlus on aga tülikas ja leiab praegusel ajal harva rakendamist.

4. Üherakukultuuri saamine.

Elmiste meetodite abil saadud puhaskultuuride kohta ei saa alati väita, et need oleksid arenenud ainult ühest mikroobirakust. Lahjendatud suspensioonist on võimalik mikroskoobi all vastava kapillaarpipeti abil kinni püüda ühtainust mikroobirakku. Selleks on ehitatud mitmesuguseid mikromanipulaatoreid kapillaarpipeti hoidmiseks ja sellega üksikraku püüdmiseks. Väga peene otsaga kapillaarpipett suunatakse mikroskoobi kontrolli all erilises kambrikeses rippuvtilgana asuvasse mikroobide suspensiooni. Mikroskoobil kasutatakse seejuures kas pimevälja või helevälja kondensorit. Töö mikromanipulaatoriga nõuab suurt vilumust ning eeldab põhjalikumat ettevalmistust nimetatud teel üherakukultuuri saamiseks.

Bioloogilised meetodid puhaskultuuri saamiseks on järgmised:

1. Aine kuumutamine.

Eostega mikroobe on võimalik eraldada eosteta mikroobi-

dest, arvestades fakti, et eosed taluvad kuumutamist 80-100°C pikema aja jooksul, kuna vegetatiivsed vormid surevad lühema või pikema aja jooksul juba 60°C juures. Kuumutades uuritavat materjali vesivannis 15-20 minutit 80°C või 2-3 minutit 100°C juures ja külvates seejärel söötmeile, on võimalik saada ainult eostega mikroobide kasvu.

2. Isoleerimine selektiivse söötme abil.

Puhaskultuuri saamiseks kasutatakse sageli söötmeid, mis oma koostise tõttu soodustavad teatud mikroobiliigi kasvu, piirduvad tugevalt teiste liikide arenemist. Nimetatud söötmeid kasutatakse tavaliselt eelkultuuridena, kust omakorda tehakse ümberkülve mitmesugustele söötmetele.

3. Inokuleerimine katseloomadele.

Mõnede patogeensete mikroobiliikide puhaskultuuride saamiseks süstitakse vastavat uuritavat materjali vastuvõtlikkudele katseloomadele. Nakatatud organismis paljuneb vastav patogeenne mikroob kõige kiiremini ja sageli peaaegu puhaskultuurina. Näiteks süstitakse *Diplococcus pneumoniae* või *Bacillus anthracis*'e isoleerimiseks. - uuritavat materjali valgetele hiirtele kõhuõõnde või naha alla. Loom sureb infektsiooni tagajärjel ja tema verest tehtud külvidest võib isoleerida patogeenne mikroob puhaskultuurina.

Õhus leiduvate mikroobide uurimine.

Õhus leidub loomulikes tingimustes alati suuremal või vähemal hulgal mitmesuguseid mikroobe, nagu kokke, batsille, hallitusseente eoseid jt. Siseruumide õhus, eriti siis, kui ruume harva tuulutatakse ja halvasti koristatakse, võib peale selle leiduda inimese hingamisteedest pärinevaid (ka patogeenseid) mikroobe. Halvasti koristatud ruumides võib leida ühes kuupmeetris õhus väga palju mikroobe, seejuures eri-

ti rohkesti talveperioodil.

Peale mikroobide üldarvu õhus arvestatakse veel õhu mikrofloora sanitaarse näitajana inimese suu ja nina limaskestadelt pärinevate streptokokkide arvu ühe kuupmeetri uuritava ruumi õhu kohta.

Sõltuvalt ruumide puhtusest ja aastaajast on siseruumide õhu mikrofloora arvuline koostis väga kõikuv, nagu ilmneb ka alljärgnevast tabelist.

Kriteerium eluruumide õhu sanitaarseks hinnanguks Tetsi järgi /mikroobide arv 1 m³-s õhus/

Õhu hinnang	s u v e l		t a l v e l	
	mikroobide üldarv	neist streptokokke	mikroobide üldarv	neist streptokokke
puhas	< 1500	< 16	< 4500	< 36
reostunud	> 2500	> 36	> 7000	> 124

Mikroobide arvu määratakse õhus mitmel meetodil:

1. Täpsemaid tulemusi saab elektrijõul töötavate seadeldistega (näiteks Krotovi aparaat), milles teatud kindel hulk õhku (keskmiselt 25-250 l) tugeva jõuga aspireeritakse aparaadis olevale söötmele, millele fikseeruvad õhus leiduvad mikroobid ja nende eosed.

2. Filtratsioonimeetodil imetakse teatud hulk õhku läbi reservuaari, milles adsorbeeriva pinnana on klaasipuru ühes steriilse veega või jälle erilised membraanfiltrid mikroobide fikseerimiseks. Membraanfilter või adsorbeeriva aine uhtevedelik külvatakse seejärel mitmesugustele söötmetele.

3. Lihtsaim, kuid vähem täpsem on juba Robert Kochi poolt rakendatud sadestusmeetod. Selleks hoitakse horisontaalselt asetatud Petri tassid steriilse söötmega lühemat või pikemat aega avatuna uuritavas õhus. Seejärel suletakse tassid kaanega ja asetatakse termostaati 37° C juurde ning 24 tunni järele loetakse söötmele kasvanud pesade arv.

V.L.Omeljanski arvestuse järgi sadeneb 100 cm² suurusele söötmele 5 minuti vältel ligikaudu samapalju mikroobe, kui neid on 10 liitris õhus. Nimetatud arvestuse põhjal saab

ligikaudselt määrata ka mikroobide arv ühe kuupmeetri õhu kohta.

Pesade arvu loendatakse Petri tassil palja silmaga või luubi abil. Juhul, kui pesi on tassil väga palju, kasutatakse nende loendamiseks Wolffhügeli ruudustikku ja arvestatakse keskmine pesade arv 1 cm^2 söötme pinna kohta (lähemalt vt. lk. 66).

Õhukülvi vaatlemisel torkab silma kasvanud mikroobipesade struktuuri suur mitmekesisus. Võib täheldada erinevusi pesade suurusel, kujul, konsistentsil, värvusel ja pinna iseloomul. Eriti hästi nähtavad on nimetatud struktuurilised iseärasused binokulaarse luubi või mikroskoobiga uurimisel. Mikroskoobiga MBC-2 on võimalik uurida pesa struktuuri suurenduses 35-119 korda nii pealt- kui ka läbivalgustuse juures. Sel teel on eriti hästi nähtavad pesa struktuuri kõik iseärasused. Väikeste pesade läbimõõt võib olla vähem kui 1 mm, keskmistel pesadel 1-4 mm, kuna suurtel võib see olla 5 mm ja enam. Osa pesi on värvusetud, teised aga värvilised, mis sõltub mikroobide produktseeritud pigmentidest - värvaineist. Võib leida valge, halli, kollase, oranži, pruuni, roosakaspunase ja teiste värvivarjunditega pesi. Kujult on pesad kas ümarad või ebakorrapärased. Pesade ääris võib olla ühtlaselt kaarjas või lainjas, sagarline, hambuline, narmaline, vahel nagu näritud servadega. Külgvaates võib pesa olla lame, ühtlaselt kumer, vahel sissetõmbega tsentris või vastupidi - nibutaolise tipuga keskel. Konsistentsilt on pesad pehmed, kõvad, limased või kuivad. Pesa struktuur võib olla homogeenne, peeneteraline, jämedateraline, kiudjas või lokitaoliselt lainjas.

Mikroobipesa kujud tahkel söötmel on igale liigile iseloomulik ning oluliseks tunnuseks nende identifitseerimisel.

M i k r o o b i d e a r v u m ä ä r a m i s e m e e t o d i d .

Mikrobioloogilistel töodel osutub sageli vajalikuks määrata mikroobide arv uuritavates vedelikkudes ja suspensioonides. Selleks kasutatakse mitmesuguseid uurimismeetodeid:

1. Mikroobirakkude loendamine.

Mikroobirakkude arvu määramiseks mingis suspensioonis kasutatakse kindla suurusega loenduskambreid. Neisse paigutatakse teatud kogus suspensiooni ja loendatakse siis mikroskoobi all mikroobirakkude arv vaateväljas näha oleva kambri ruudustikus valemi järgi: $N = \frac{1000 \cdot n}{a^2 \cdot T}$; kus a - kambri ruudu külje pikkus mm-tes, T - kambri sügavus ja n - mikroobirakkude keskmine arv ühes ruudus.

Wrighti järgi saab mikroobide arvu määrata värvitud ägepreparaatides, mille valmistamisel on segatud uuritavat suspensiooni ja inimese verd võrdses koguses. Kuna normaalse inimese vere punaliblede arv on suhteliselt konstantne (meestel 5 miljonit punaliblet ühes mm^3 -s,) siis loendatakse okulaarmikromeetri abil mitmes vaateväljas kokku kuni 500 punaliblet ja neile vastav arv mikroobe ja arvutatakse selle alusel mikroobide arv 1 ml-s suspensioonis.

2. Elusate mikroobide arvu määramine.

Selleks segatakse kindel kogus uuritavat vedelikku vesivannis sulatatud ja 45°C temperatuurini jahutatud agarsöötmega ning valatakse välja Petri tassi. Peale 48-tunnilist kasvu termostaadis 37°C juures (vajaduse korral toimub osa külvide kultiveerimine ka toatemperatuuri juures) loendatakse Petri tassil söötmel kasvanud mikroobipesade arv.

3. Mikroobide arvu määramine suspensiooni hädususe alusel.

Võrreldakse uuritavate mikroobide suspensiooni hädusust standardsuspensioonide hädususega, milles on mikroobide arv teada. Vajalikke standardsuspensioone toodetakse ja väljastatakse tsentraalsete mikrobioloogia instituutide poolt. Täpsemalt saab määrata mikroobide arvu selleks konstrueeritud nefelomeetrites vastava skaala abil kõrvalt valgustatud suspensiooni hädususe järgi.

4. Mikroobide kaalumine.

Kindla tihedusega mikroobide suspensiooni saamiseks kaalutakse analüütilistel kaaludel tahkel söötmel kasvavast puhas-kultuurist võetud mikroobe näiteks 1 mg ja suspendeeritakse siis kindlas hulgas vees.

Olgu tähendatud, et kõik ülalmainitud mikroobide arvu määramise meetodid nõuavad väga täpset tehnikat, kuid annavad seejuures ainult ligilähedasi tulemusi.

V e e m i k r o b i o l o o g i l i n e u u r i m i n e .

Ookeanid, mered, järved ja teised veekogud on paljudele mikroobiliikidele looduslikuks keskkonnaks - biosfääriks. Mikroobide arv antud veekogu vees on seda suurem, mida enam leidub selles orgaanilisi aineid. Seepärast on asustatud punktide naabruses asuvate veekogude vesi palju rikkalikuma mikroflooraga kui asustamata rajoonides. Eriti palju on leida mikroobe veekogude põhjamudas, kus on ligi 1000 miljonit mikroobi 1 g mudas.

Veekogud võivad reostuda ka patogeensete mikroobidega, näiteks inimeste ja loomade pesemisel, pesupesemisel, eriti aga reovete juhtimisel veekogudesse. Ajajooksul sadenevad need mikroobid veekogude põhja ja hukuvad, talumata konkurentsi vee loodusliku mikroflooraga. Kõige kauem püsib veekogudes eluvõimelisena eosteta bakteritest normaalse soolemikrofloora esindaja - *Escherichia coli* ehk *Bacterium coli*.

Joogiveeks kasutatav vesi peab olema eriti puhas ning selle kõlblikkuse hindamiseks on püstitatud vastavad normid. Puhas hea joogivesi ei tohi sisaldada mitte rohkem kui 100 mikroobi ühes milliliitris. Peab märkima, et praktiliselt on raske määrata uuritavas veeproovis eluvõimeliste mikroobide üldarvu. Seepärast piirduetakse ainult aeroobse, metatroofse ja mesofiilse mikrofloora määramisega, mis sanitaarselt on olulisema tähtsusega ja mida saab tavalistel söötmel kultiveerida.

Mikroobide üldarvu saab aga määrata sel teel, et teatud kogus uuritavat vett filtreeritakse läbi membraanfiltri, mille järel filtrile jäänud mikroobid värvitakse 1%-lise karbool-erütrosiiniga ning loendatakse mikroskoobis okulaarmikromeetri abil. Mikroobide arv 1 ml uuritavas vees (x) määratakse valemi järgi:

$$x = \frac{S \cdot N}{s \cdot v},$$

kus S - filtri pindala ruutmikronites,

s - okulaarmikromeetri välja pindala ruutmikronites,

N - mikroobide arv, mis leitud vaadeldud preparaadis okulaarmikromeetri väljal,

V - filtreeritud vee kogus milliliitrites.

Juhul, kui tahetakse määrata eluvõimeliste aeroobsete mesofiilsete mikroobide arvu 1 ml-s uuritavas vees, toimitakse järgmiselt:

Uuritav vesi lahjendatakse steriilse kraaniveega 1:10, 1:50, 1:100 jne. Osa vett külvatakse aga lahjendamata kujul. Vesivannis 100° C juures sulatatud lihapeptonagarsööde jahutatakse katseklaasides kuni 45° C. Võetakse steriilsed Petri tassid ja asetatakse lauale kaanega ülespoole. Uuritavat vett võetakse steriilse graduateeritud pipetiga 1 ml ja viiakse see kiirelt Petri tassi põhjale, tõstes ühest küljest tassi kaant vaid niipalju, et pipetiots sinna sisse mahub. Siis võetakse vesivannist 45° C temperatuurini jahutatud agarsööde, mida on katsutis 10-12 ml, ja tõstes jälle tassi kaant ühest küljest, valatakse sööde Petri tassi põhjale. Selleks, et sööde ühtlaselt valguks kogu tassi põhjale ja seguneks veega, tuleb tassi ettevaatlikult kõigutada ringikujuliselt liigutades. Siis jäetakse tass lauale kuni agari täieliku tardumiseni. Analoogiliselt toimitakse kõigi vee lahjendustega. Kõigile külvidele märgitakse tassi põhjale lahjendused ja asetatakse siis termos- taati 24 tunniks 37°C juurde.

Järgmisel päeval loendatakse luubi abil Petri tassides kasvanud pesad. Juhul, kui söötmeplaadil on kasvanud enam kui 300 pesa, tuleb loendamisel abiks võtta Wolffhügeli ruudustik. Viimane kujutab endast mustale alusele paigutatud klaasplaati.

Aluse ja klaasplaadi vahele paigutatakse Petri tass põhjaga ülespoole. Klaasplaadil asub 1 cm^2 suurusega ruutudesse jaotatud ruudustik. Eriti tiheda külvi korral on lugemise hõlbusdamiseks osa ruutsentimeetrilise pinnaga ruute (ruudustiku tsentris ja diagonaalselt) jaotatud veel üheksaks väikeseks ruuduks. Ruudustiku alla asetatud Petri tassil loetakse pesade arv vähemalt kümnes eraldi asetatud ruudus. Saadud andmeist arvutatakse keskmine pesade arv 1 cm^2 kohta (n). Viimane võimaldab omakorda arvutada kogu pesade arvu tassis oleval söötme-pinnal. Selleks arvutatakse valemit: $x = \pi r^2 \cdot n$, kus x - pesade üldarv tassis, r - tassi raadius (seda on ruudustiku all lihtne määrata) ja π - konstant 3,14. Kui näiteks pesade keskmine arv ühes ruudus (n) oli 10, siis 5 cm raadiuse korral oleks pesi tassis

$$x = 10 \cdot 3,14 \cdot 25 = 785.$$

Saadud pesade arv korrutatakse veel veelahjendusega ja saadakse eluvõimeliste mikroobide arv 1 ml vees. Erinevate lahjenduste külvi tulemused 1 ml vee kohta liidetakse ja jagatakse kasutatud tasside arvuga, saadakse seega keskmine aritmeetiline suurus. Viimane ümardatakse kümne ulatuses kolmekohalise arvu puhul ja saja ulatuses nelja- kuni viiekohalise arvu puhul.

Aluseks võib võtta vee puhtuse hindamisel alljärgnev tabel:

Vee mikrobioloogiline hinnang Miquel'i järgi.			
0 - 10	mikroobi 1 ml-s vees	-	-
10 - 100	"	"	- väga puhas,
100 - 1000	"	"	- puhas,
1000 - 10000	"	"	- keskmine,
10000 - 100000	"	"	- kõlbmatu,
100000 - ja rohkem	"	"	- täiesti kõlbmatu.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Valmistada preparaat Escherichia coli puljongkultuurist, värvida 1:10 lahj. Ziehl'i karboolfuksiiniga 5 min.
2. Valmistada preparaat Staphylococcus aureus'e kultuurist püstagaris, värvida Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.

3. Valmistada mikroobide suspensioonist preparaati, värvida see Grami järgi ja uurida mikroskoobis.
4. Teha külv mikroobide suspensioonist lihapeptonagarile Petri tassis Drigalski kepikese abil suspensioonis asuvate bakterite puhaskultuuride iseoleerimiseks.
5. Lugeda Petri tassides lihapeptonagaril, mis hoiti avatult õhu käes 5 minuti jooksul, kasvanud mikroobipesi ja arvutada Omeljanski meetodi järgi mikroobide arv 1 m^3 õhus.
6. Uurida pesastruktuuri õhukülvides binokulaar-mikroskoobiga.
7. Teha vee külv eluvõimeliste mikroobide arvu määramiseks uuritavas vees.

VII p r a k t i k u m.

T e e m a: VEE MIKROBIOLOOGILINE UURIMINE. MIKROOBIDE
KEEMILINE AKTIIVSUS.

P u h a s k u l t u u r i i s o l e e r i -
m i n e (järg).

Eelmisel korral mikroobide suspensioonist tehtud külvis lihapeptonagaril Petri tassis otsitakse erineva struktuuri- ja eraldi seisvaid pesi. Söötmele tuleb leida väikesi ümarraid kuld kollase värvusega ja suuremaid lamedamaid sinakas-halle pesi. Uurimiseks võib võtta ainult neid pesi, mis asuvad üksikult ega puutu servaga kokku mõne teise pesaga. Kuld-kollast värvust pesast tehtud preparaadis (Grami järgi värvitud) peavad leiduma ainult kobarja asetusega stafülokokid, kuna sinaka värvusega pesast tehtud preparaat (1:10 lahj. Ziehl- karboolfuksiiniga 5 min.) näitab ainult bakterite olemasolu. Stafülokokkide pesast, mis on kontrollitud puhtuse suhtes, tehakse ümberkülv steriilise nõelaga veriagarplaadi ühele sektorile. Külvi tehakse joonkülvina, nagu eelmises praktikumis kirjeldatud. Peale selle tehakse samast pesast siksakkülv lüagagarile, mille meetodit on kirjeldatud V praktikumis.

Suuremast, värvuseta pesast, mis kontrollpreparaadis näitab kolibaktereile tüüpilisi morfoloogilisi omadusi, tehakse ümberkülv lihapeptonpulgongisse ja väiksesse kirjusse ritta.

Juhul, kui eelmises praktikumis tehti külv ebasteriilselt, võib tassil leida peale ülalnimetatud pesade veel helekollaseid, valgeid ja muu värvusega pesi, mis kuuluvad õhust reostusena sissesattunud erinevatele mikroobiliikidele.

V e e k ü l v i t u l e m u s t e l u g e m i n e (j ä r g).

Eelmisel korral tehtud veekülvides kasvanud pesi loendatakse Wolffhügeli ruudustiku abil. Viimase abil määratakse ka Petri tassi raadius, mis on oluline pesade üldarvu kindlaks-tegemiseks. Juhul, kui kasv on söötmel väga tihe, tuleb lugeda pesi väikeste ruutude abil, mis jagavad iga 1 cm^2 suuruse ruudu üheksaks osaks. Arvutamine toimub nii, nagu kirjeldatud eelmises praktikumis.

S ü s i v e s i k u t e f e r m e n t a t - s i o o n.

Mikroobi identifitseerimiseks ei piisa üksi morfoloogiliste omaduste tundmaõppimisest. Erinevad mikroobiliigid võivad morfoloogiliselt olla täiesti sarnased, kuid erineda rea teiste, näiteks biokeemiliste omaduste poolest. Mikroobide keemiline aktiivsus võib olla väga erinev, sõltudes vastava liigi spetsiifiliste fermentatsioonide mitmekesisusest ja väliskeskkonna tingimustest.

Üht või teist substantsi lõhustavat fermenti mikroobirakus võib kindlaks teha sel teel, et kultiveeritakse mikroobi vastavat substantsi sisaldavas söötmes. Kui mikroob kasvab söötmes, muutes viimase koostist, kusjuures on leida lisatud substantsi lammutusprodukti, siis vihjab see mikroobi vastavat substantsi lammutava fermenti olemasolule. Seda põhimõtet rakendatakse praktiliselt fermentatiivsete omaduste poolest erinevate mikroobiliikide diferentseerimisel. Mikroobide biokeemiliste omaduste määramisel kasutatakse peamiselt nende järgmisi omadusi:

- 1) võimet käärimise teel lõhustada mitmesuguseid süsivesikuid, alkohole ja glükosiide happe või happe ja gaasi tekitamisega, mis näitab mikroobi sahharolüütilist toimet;
- 2) võimet lammutada valkaineid või nende laguprodukte, mis tõendab mikroobi proteolüütilise toime olemasolu.

Mikroobide sahharolüütiliste omaduste uurimiseks kasuta-

takse mitmesuguseid vedelaid ja tahkeid diferentsiaal-diagnostilisi söötmeid. Need koosnevad kolmest komponendist:

- 1) söötme põhialainest ehk substraadist, milleks on tavaliselt peptoon, vesi või lihapeptoonagar;
- 2) uuritavast süsivesikust, alkoholist või glükosiidist;
- 3) keemilises aines, indikaatorist, mis muudab värvust süsivesiku fermenteerimisel tekkinud hapete toimel.

Substraat ise ei tohi sisaldada mingisuguseid teisi süsivesikuid, kuna vastasel korral võib saada ebaõigeid tulemusi.

Uuritav süsivesik, alkohol või glükosiid, mida tavaliselt lisandatakse söötmele kontsentratsioonis 1 - 2%, peab olema keemiliselt puhas.

Mikrobioloogilistel töodel kasutatakse suhkrutest pentoose (nagu arabiin, ksüloos, ramnoos), heksoose (glükoos, levuloos, mannoos, galaktoos), disahhariide (maltoos, laktoos, sahharoos), trisahhariide (rafinoos), polüsahhariide (inuliin, dekstriin, glükogeen, tärklis), peale selle alkohole (glütseriin, manniit, dultsiit, sorbiit, adoniit, inosiit) ja glükosiide (salitsiin, amügdaliin).

Indikaatorina kasutatakse mikrobioloogias kõige sagedamini järgmisi:

Andrade indikaator.

Lisandatakse 100 ml 0,5%-lisele hapufuksiini vesilahusele 16 ml normaalset NaOH lahust. Saadud indikaatorlahust lisandatakse 100 ml söötme kohta 1 ml. Happelises keskkonnas omandab vastav sööde punase värvuse.

Broomtümoolsinine.

Valmistatakse 0,04%-lise vesilahusena, mida lisatakse söötmele vahekorras 1:10, või 1,5%-lise alkoholilahusena, mida lisandatakse 10 ml ühe liitri söötmele. Happelises keskkonnas on indikaator kollast, leelises sinist ja neutraalses keskkonnas rohelist värvust.

Fenoolpunane.

Lisatakse 1%-list fenoolpunase vesilahust 1 liitrile söötmele 2 ml. Happelises keskkonnas on kollane, leelises punakasvioletne.

Puhaskultuurina isoleeritud mikroobide sahharolüütilise

toime uurimiseks kasutatakse mitmesuguseid ülalkirjeldatud süsivesikuid, alkohole ja glükosiide sisaldavaid vedelaid diferentsiaal-diagnostilisi söötmeid. Need sisaldavad tavaliselt 10 g peptooni ja 5 g keedusoola 1 liitri destilleeritud vee kohta, millele siis lisandatakse 1-2% süsivesikut ja indikaatorilahust ettenähtud koguses. Katseklaasi valatud söötmele lisatakse juurde ühest otsast kinnijoodetud väike klaastoruke süsivesiku lõhustumisel tekkinud gaasiliste produktide sedastamiseks. Viimased kogunevad torukese kinnijoodetud ülemisse otsa ja suruvad selles asuva vedeliku nivoo allapoole.

Tavaliselt steriliseeritakse nimetatud söötmed voolava auru sterilisaatoris (Kochi aparaadis) 100° C juures 3 päeva jooksul, iga päev 30 min. Kuna aga mõned süsivesikud võivad ka selle temperatuuri juures lagunduda (ksüloos, arabinoos jt.) steriliseeritakse vastavad lahused filtreerimisel läbi bakterite filtrite.

Mikroobide biokeemiliste omaduste uurimiseks kasutatakse laboratoorses praktikas kõige sagedamini neljast suhkrust ja ühest alkoholist (glükoos, maltoos, manniit, laktoos ja saharoos) koosnevat katsutite komplekti, mida nimetatakse "väikeseks kirjuks reaks". Sageli on aga vaja kasutada täpsemaks uurimiseks suuremat kirju rea komplekti ksüloosi, sorbiidi, dultsiidi ja teiste süsivesikute, alkoholide, glükosiidide lisandusega.

Tahkeid diferentsiaal-diagnostilisi söötmeid kasutatakse peamiselt Salmonella ja Shigella perekonda kuuluvate mikroobiliikide isoleerimiseks uuritavast külvimaterjalist - roojast, uriinist jne. Pääaegu kõik vastavad mikroobid, erinevalt jämesooles esinevast Escherichia coli'st, ei fermenteerid laktoosi. Seepärast lisandatakse laktoosi tahketesse diferentsiaal-diagnostilistesse söötmetesse.

Tahketest diferentsiaal-diagnostilistest söötmetest on kõige tuntumad Endo, Drigalski, Levine', Smirnovi sööde ja broomtümool-laktoosagar.

Endo sööde.

Lisandatakse 100 ml lihapeptonagarile 1 g laktoosi ja indikaatorina baasilise fuksiini ning naatriumsulfiiti (Na_2SO_3)

segu, mis on valmistatud järgmiselt: katseklaasi võetakse 1 ml baasilise fuksiini küllastatud alkoholilahust, millele lisandatakse vähehaaval 10%-list Na_2SO_3 vesilahust kuni fuksiini värvitustumiseni, s.o. kuni kahvatu-roosa värvuseni. Saadud kahvatu-roosat värvust lahustatakse sulatatud laktoos-agarisse ja segatakse hoolikalt. Endo söödet valmistatakse võimalikult enne tarvitamist ning hoitakse kaitstult valguse eest. Escherichia coli pesad on Endo söötmel punased pronksi-taolise läikega, kuna laktoosi mittefermenteerivad bakterid kasvavad söötmevärvi oranž-roosade pesadena.

Drigalski sööde.

Võetakse 1000 ml lihapeptonagarit, millele lisandatakse 15 g laktoosi, 150 ml lakmustinktuuri ja 10 ml 0,1%-list kristallvioleti vesilahust. Sööde on sinakasvioletne ning laktoosnegatiivsed bakterid kasvavad sellel sama värvi pesadena. Escherichia coli pesad on söötmel punased.

Levine'sööde.

Söötmesse on 100 ml lihapeptonagari peale lisatud 2 g laktoosi, 2 ml 0,5%-list metüleensinise- ja 1,5 ml 2%-list eosiini vesilahust. Sööde on violetset värvust, sama värvust on ka laktoosnegatiivsete bakterite pesad. Escherichia coli pesad on sinakasmusta värvust.

Smirnovi sööde.

Sisaldab 1000 lihapeptonagari kohta 10 g laktoosi, 7,5 ml 1,2%-list broomkresoolpurpuri alkoholilahust ja 2,5 ml 0,6%-list metüleensinise vesilahust. Sööde on sinakasvioletne. Escherichia coli pesad on söötmel kollakasrohelist värvust, laktoosnegatiivsete bakterite pesad sinakasvioletsed.

Broomtümool-laktoosagar.

900 ml lihapeptonagarile lisatakse 10 g laktoosi. Peale söötme steriliseerimist lisatakse steriilselt 100 ml 0,04%-list broomtümool-sinise vesilahust. Escherichia coli pesad on söötmel kollased, laktoosnegatiivsete bakterite pesad sinist värvust.

Tselluloosi fermentatsioon.

Tselluloosi fermentatsioon toimub looduses pidevalt vee-

kogude põhjamudas, maapinnas, sõnnikus, loomade sooltes. Nime-
tatud protsess, mida põhjustab ferment tsellulaas, võib toi-
muda väga mitmesuguste, vastavat fermenti produtseerivate mik-
roobide elutegevuse tolmel nii aeroobselt kui ka anaeroobselt.

Aeroobse käärimise demonstreerimiseks võetakse kolbi 1 cm
kõrgune kiht kraanivett, millele on lisandatud 0,1% ammoonium-
kloriidi, 0,5% K_2HPO_4 ja kriiti. Kolbi riputatakse filterpa-
beri ribad ja vedelikule lisandatakse tselluloosi fermentee-
rivaad mikroobe sisaldavat mulda või jõemuda. Aja jooksul,
keskmiselt 3-4 nädala vältel, laguneb paber 28-35° C juures
vedelikku ulatuvas osas.

Tselluloosi fermentatsiooni tulemusena tekivad väga mitme-
sugused produktid, nagu õli- ja hädikhape, etüülalkohol, süsi-
nikdioksüüd, vesinik, metaan. Tselluloosi fermenteerivatest
mikroobidest on tuntud *Bac. cellulosaе hydrogenicus*, *Bac. cel-
lulosaе dissolvens*, *Clostridium thermocellum*, *Proteus nadsoni*,
mitmesugused seened, kiirikseened jt.

M i k r o o b i d e p i g m e n d i d .

Paljudele mikroobidele on iseloomulikuks omaduseks värv-
ainete - pigmentide moodustamine. Vastavalt sellele on mik-
roobi pesad tahkel söötmel värvilised. Kui on tegemist vees
lahustuva pigmendiga, siis värvub vastavalt ka sööde, milles
kasvab kultuur.

Pigmenti tekkimiseks on vajalik hapniku juurdepääs mik-
roobidele ja ainult üksikud liigid valmistavad pigmenti an-
aeroobseis tingimuses. Samuti on pigменти tekkimiseks vajalik
optimaalne keskkonna temperatuur, kuna sellest kõrgemas tempe-
ratuuris kaotavad paljud mikroobid pigmenti produtseerimise
võime.

Pigmentide keemilise koostise kohta on senini vähe teada.
Nende rühmitamisel võetakse aluseks nende lahustuvus. Erista-
takse:

- 1) vees lahustuvad pigmendid, näiteks *Pseudomonas aeruginosa*
sinist värvust pigment, püotsüanin;
- 2) vees mittelahustuvad, kuid alkoholis ja teistes orgaanilis-

tes lahustes lahustuvad pigmendid. Siia kuulub näiteks *Sarcina lutea* kollane pigment, *Serratia marcescens*'i punane pigment;

- 3) vees, alkoholis ja teistes orgaanilistes lahustajates mittelahustuvad pigmendid, näitena võib esitada *Azotobacter chroococcum*'i pruunikasmusta pigmenti.

Mitmesuguste mikroobide pigmentidest on eriti näitlikud järgmiste liikide omad:

Serratia marcescens - punane pigment,
Pseudomonas aeruginosa - rohekassinine pigment,
Sarcina lutea, *Staphylococcus citreus* - sidrunkollane pigment,
Staphylococcus aureus - kuldkollane pigment,
Staphylococcus albus - valge pigment,
Aspergillus niger - must pigment,
Azotobacter chroococcum - pruunikasmust pigment.

Koli-indeksi ja koli-tiitri määramine.

Inimeste ja loomade väljaheidetega satub väliskeskkonda suurel hulgal jämesooles esinevaid mikroobe, kusjuures nende seas võib olla ka patogeenseid liike. Reoveega veevärgi-, jõe- või kaevuvette sattunud patogeensed mikroobid võivad seal püsida eluvõimelistena mitme nädala jooksul sõltuvalt ühe või teise liigi resistentsusest. Nakatatud vee joomine keetmata kujul võib olla laialdaste taudide põhjuseks elanikkonnas. Patogeensete mikroobide uurimine vees on aga seotud raskustega ning sageli ei anna positiivseid tulemusi. Väliskeskkonna reostumise indikaatorina ehk näitajana kasutatakse seepärast normaalse soole mikrofloora esindajate mikroobide uurimist, mis on tehniliselt palju lihtsam menetlus kui patogeensete mikroobide avastamine. Juhtum, kui uuritavas vedelikus leitakse suurel hulgal kolibakterit (*Escherichia coli*'t), vihjab vedeliku äsja asetleidnud fekaalsele reostumisele, seega aga ka patogeensete soolebakterite esinemise võimalusele. On teada, et väliskeskkond ei ole kolibakteri loomulikuks biosfääriks. Peab aga arvestama seda asjaolu, et kolibakterit leidub mitte

üks inimese jämesooles, vaid ka loomade, lindude, roomajate, kalade ja putukate soolestikus. Siiski on võimalik eraldada inimese ja soojavereliste loomade jämesoolest pärinevat kolibakterit, mis teiste *Escherichia coli* variantide hulgas üks on sanitaarse tähtsusega. Nimelt fermenteerib esimene süsivesikuid ja produtseerib indooli 43^o C juures, milleks pole võimalised külmavereliste loomade ja insektide kolibakterid.

Sanitaar-hügieeniliselt on oluline mitte üks kindlaks teha *Escherichia coli* olemasolu fakt ühes või teises objektis, vaid määrata seda ka kvantitatiivselt. Selleks rakendatakse kahte näitajat: 1) koli-tiitrit ja 2) koli-indeksit.

Koli-tiiter on vähim uuritava aine hulk milliliitrites või grammides, milles leidub veel eluvõimeline kolibakter.

Koli-indeksiks nimetatakse *Escherichia coli* arvu ühes liitris uuritavas vedelikus.

Veevärgivee uurimisel piirduakse sageli koli-indeksi määramisega, kasutades selleks membraanfiltreid. Membraanfiltrid kujutavad endast nitrotselluloosist kettaid erinevate pooride läbimõõduga.

Mida väiksem on pooride läbimõõt, seda aeglasemalt filtreerub uuritav vesi läbi filtri ja vastavalt sellele on väiksem ka filtri number. Sanitaar-bakterioloogiliseks uurimiseks kasutatakse meil filtreid nr.2,3 ja 4, kuna nr.5 on selleks juba liiga suurte pooridega.

Enne kasutamist steriliseeritakse vastavad membraanfiltrid keetmisel destilleeritud vees 10-15 min.jooksul. Samuti keetmisel, põletamisel leegis või autoklaavis steriliseeritakse membraanfiltri hoidmiseks vajalik Seitzi filtri statiiv. Peale seda, kui Seitzi filtri statiiv ühes seesoleva membraanfiltriga on asetatud imikolville ja ühendatud vaakuum- või vesijoapumbaga, filtritakse uuritav vesi kindlas koguses läbi seadeldise. Filterketas võetakse steriilsete pintsettidega statiivist ja asetatakse Endo (või mõne teise tahke diferentsiaal-diagnostilise söötme) pinnale Petri tassis. Ketas tuleb asetada vastu söödet nii, et vahele ei jääks õhumulle. Tassid asetatakse termostaati 37^o C juurde 24 tunniks. Ühte Petri tassi mahub 3-4 membraanfiltrit. Söötme lahustunud osade difusiooni

tõttu läbi filtri pooride areneb filtri pinnale jäänud kolibakterite kasv Endo söötmel läikivate punaste pesadena. Kolibakterite pesad loendatakse ja kontrollitakse suvaliselt, mõned neist mikroskoobi all Grami järgi värvitud preparaadis ning külvi teel Bulif'i söötmele. Filtreeritud vee hulga ja membraanfiltril kasvanud kolibakterite pesade arvu alusel arvestatakse koli-indeks.

Membraanfiltrite abil võib määrata ka koli-tiiter. Selleks filtritakse läbi mitme filtri erinevad hulgad uuritavat vett. Diferentsiaal-diagnostilise söötme pinnale kasvama asetatud ketastel tehakse kindlaks *Escherichia coli* olemasolu ühes või teises vee hulgas (pesi ei loendata). Koli-tiiter ja samuti koli-indeks määratakse vastavate tabelite abil, millest tähtsam on Petrovitsi koostatud.

Koli-indeksi ja koli-tiitri arvestus
 membraanfiltrite abil

(Petrovitsi järgi).

Kulvatud vee hulk ml-tes				Koli- indeks	Koli- tiiter
300	30	3	0,3		
-	-	-	-	<3	>333
-	-	-	+	3	333
-	-	+	-	3	333
-	+	-	-	3	315
-	-	+	+	6	168
-	+	-	+	6,5	159
-	+	+	-	7	138
+	-	-	-	8	129
-	+	+	+	9	108
+	-	-	+	30	33
+	-	+	-	31	30
+	-	+	+	60	18
+	+	-	-	77	12
+	+	-	+	320	3
+	+	+	-	793	1,2
+	+	+	+	>793	<1,2

Koli-tiitri ja koli-indeksi määramiseks kasutatakse külvimeetodit Buli'i või Eijkmanni söötmeile. Määramine toimub mitmes etapis. Algul külvatakse uuritav vesi vedelsöötmesse katsutite's ja kolbides ning kultiveeritakse 43° C juures 24 tunni jooksul. Selles temperatuuris fermenteerub ühes gaasi-produktsiooniga söötmes asuv glükoos või manniit ainult nende kolibakterite toimel, mis on sanitaarse tähtsusega. Siis tehakse Escherichia coli fermentatsiooni näitavast kolvist ja katsutist ümberkülv tahketele diferentsiaal-diagnostillistele (tavaliselt Endo) söötmetele selleks, et kontrollida, kas on tegemist kolibakteritega.

Iga veeproovi uurimiseks võetakse tavaliselt 2 kolbi ja 10 suurt katsutit söötmetega ühes käärimistorukesega. Igasse kolbi külvatakse 100 ml ja katseklaasidesse 10 ml uuritavat vett.

Veevärgivee uurimisel võetakse vett steriilsesse nõusse peale kraani kuumutamist leegiga ja pärast vee voolamist avatud kraanist vähemalt 10 min. jooksul.

Kaevudest võetakse vett batomeetriga, s.o. seadeldisega, milles asuvat steriilset pudelit saab vee võtmiseks soovitud sügavuses avada ja sulgeda. Lahtiste kaevude ja veekogude vee uurimisel kasutatakse aga külvatavaid vee hulki - 100 ml, 10 ml, 1 ml ja 0,1 ml.

Peale külvide hoidmist 43° C juures 24 tunni jooksul valitakse need kolvid ja katseklaasid külvidega, kus on näha kasvu ja gaasiproduktsiooni käärimistorukestes.

Veevärgi- ja kaevude vee uurimisel nimetatud meetodil kasutatakse tulemuste määramiseks alljärgnevat tabelit:

Koli-indeksi ja koli-tiitri
arvestustabel (külvatud vee hulk 300 ml).

Positiiv- sete katse- klaaside arv	Positiivsete kolbide arv					
	0		1		2	
	koli- indeks	koli- tiiter	koli- indeks	koli- tiiter	koli- indeks	koli- tiiter
0	3	>333	4	250	11	91
1	3	333	8	125	18	56
2	7	143	13	77	27	37
3	11	91	18	56	38	26
4	14	71	24	42	52	19
5	18	56	30	33	70	14
6	22	45	36	28	92	11
7	27	37	43	23	120	8
8	31	32	51	20	161	6
9	36	28	60	17	230	4
10	40	25	69	14	>230	<4

Näiteks: olgu *Escherichia coli* kasvu suhtes positiivseid katseklaase 2, kolbe aga mitte ühtegi positiivset. Horisontaalse ja vertikaalse rea lõikumisel saame kätte vastava kolindeksi 7 ja koli-tiitri 143.

Kontrolliks tehakse paarist katseklaasist ja kolvist, kus *Escherichia coli* kasv oli positiivne, steriilse külviaasaga ümberkõlv tahkele söötmele (Endo, Levine' või muu diferentsiaal-diagnostiline sööde). Pärast 24-tunnist kasvamist 37° C juures kontrollitakse pesi Grami järgi värvitud preparaadis. Kasvanud kolibakterite pesadest tehakse eeskirja järgi veel teistkordne ümberkõlv ja käärimisproov Bulif'i või Eijkmanni söötmes 43° C juures 24 tunni jooksul. Juhul, kui on määratud ainult koli-tiiter, siis on võimalik seda ümber arvutada koli-indeksiks ja vastupidi.

Koli-indeksi saamiseks jagatakse arv 1000 koli-tiitri arvule ja omakorda: koli-tiitri saamiseks jagatakse arv 1000 koli-indeksi arvule.

Nimetatud joogivee kvaliteedi näitajad on normeeritud Riikliku Üleliidulise Standardiga (ГОСТ-2874-54).

Koli-indeks ei tohi olla veevärgi- ja üldkasutatavate kaevude vetes suurem kui 3 ja koli-tiiter mitte vähem kui 300. Lahtised veekogud loetakse soodsateks, kui koli-tiiter on neis vähemalt 111.

Moskva veevärgi vee koli-tiiter ei tohi olla koguni alla 500, koli-indeks aga mitte üle 2.

S ö ö t m e d k o l i - t i i t r i m ä ä r a m i - s e k s .

Bulif'i sööde sisaldab 1 l lihapeptonpuljongi kohta 12,5 g manniiti ning indikaatorina 6 ml 1%-list neutraalpuna-se vesilahust. Sööde valatakse 250 ml mahuga kolbidesse a 50 ml ja suure mahuga katsutitesse a 5 ml.

Eijkmanni sööde sisaldab 1 l destilleeritud vee kohta 100 g peptooni, 50 g keedusoola ja 100 g glükoosi. Sööde valatakse kolbidesse a 10 ml ja katsutitesse a 1 ml.

Mõlemad söötmed steriliseeritakse voolava auruga 3 päeva jooksul a 30 minutit.

1. Jätkata puhaskultuuride isoleerimist:

Valmistada preparaadid erinevatest pesadest võetud materjalist mikroskoobiliseks uurimiseks. Stafülokokkide preparaat värvida Grami järgi, kolibakterite oma - 1:10 lahj. Ziehl'i karboolfuksiiniga 5 min.

Kontrollitud kolibakterite pesast teha ümberkült liha-peptoonpuljongisse ja väikesesse kirjusse ritta, stafülokokkide pesast joonkült veriagarile ja lüangagarile.

2. Lageda Wolffhügeli ruudustiku abil pesade arv veekülvis ja määrata mikroobide arv uuritud vees.
3. Määrata koli-tiiter Buliif'i järgi ja tutvuda membraanfiltrite kasutamisega.
4. Õppida tundma mikroobide saharolüütilist toimet ja mitmesuguseid diferentsiaal-diagnostilisi söötmeid.
5. Tutvuda mitmesuguste pigmentidega mikroobide puhaskultuurides.
6. Teha *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*'e ja *Staphylococcus aureus*'e külv piimaagarile peptonisatsiooni uurimiseks järgmisel praktikumil.

VIII p r a k t i k u m .

T e e m a : **MIKROOBIDE KEENILINE AKTIIVSUS.**

K o l i - t i i t r i h i n d a m i n e .

Vee külve Buli^r'i söötmesse uuritakse peale 24-tunnulist kasvu termostaadis 43^o C juures. Neis katsutites või kolbides, kus esines inimestelt või soojaverelistelt loomadelt pärinev *Escherichia coli*, on toimunud manniidi fermenteerimise tulemusena gaasi kogumine käärimistorukesse. Osa positiivseid kolbe või katsuteid võivad näidata neutraalpunase reduktsioonist tingitud indikaatori värvuse muutust.

Vastavates katsutites on Buli^r'i söötme punane värvus muutunud kergelt fluorestseeriva värvinguga kollaseks.

Värvaine reduktsiooni puhul kaotab värvaine oma tavalise värvingu, muutudes kahvatuks leukoühendiks. Hapniku rikkaliku juurdepääsu puhul taastub esialgu värv. Redutseerivate värvadena on tuntumad metüleensinine, neutraalpunane, tioniin, lakmus jt. Redutseeriv toime on tugevalt välja kujunenud *Escherichia coli*'l, *Salmonella paratyphi*'l ja veel mõnel teisel mikroobil.

Koli-tiitri ja koli-indeksi määramiseks eraldatakse positiivsed kolvid ja katsutid (kus on näha gaasimulle käärimistorus ja söötme värvuse muutust) negatiivsetest. Tulemusi loetakse vastavast tabelist eelmises praktikumis kirjeldatud viisil.

Kontrolliks tehakse paarist katsutist, kus *Escherichia coli* kasv oli positiivne, steriilse külviaasaga ümberkülv tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele Petri tassis, nagu

samuti eespool märgitud.

E s c h e r i c h i a c o l i ja A e r o b a c t e r
a e r o g e n e s ' e d i f e r e n t s e e r i m i n e.

Paljud erinevad mikroobiliigid võivad rea omaduste poolest olla sarnased. Antud asjaolu võib põhjustada raskusi nende samastamisel. Escherichia coli, inimeste ja loomade soolekanalis esinev saprofüüt, on oma morfoloogiliste ja teatud biokeemiliste omaduste poolest sarnane Aerobacter aerogenes'ele mis esineb tunduvalt harvemini inimeste ja soojavereliste loomade roojas kui Escherichia coli. Ligikaudu pooled Escherichia coli tüved fermenteerivad sahharoosi, seega kõiki väikese kirju rea süsivesikuid, hapet ja gaasi produktsiooniga, nagu ilmneb juuresolevast tabelist.

Escherichia coli ja Aerobacter aerogenes'e
omadused väikeses kirjus reas.

Tabel.

	glükoos	maltoos	manniit	laktoos	sahharoos
Escherichia coli	hg	hg	hg	hg	hg ⁺
Aerobacter aerogenes	hg	hg	hg	hg	hg

Seletus: hg - fermentatsioon happe ja gaasi produktsiooniga,

hg⁺ - positiivne või puuduv fermentatsioon.

Nimetatud asjaolu tõttu ei ole võimalik fermentatsiooni alusel väikeses kirjus reas eristada Escherichia coli't Aerobacter aerogenes'est.

Escherichia coli leid koli-tiitri määramisel uuritavas vees vihjab teatavasti antud vee värsketele fekaalsele reostumisele. Aerobacter aerogenes'e leid üksi, ilma tüüpilise Escherichia coli leitud, näitab aga mitte värsket, vaid mõnda aega tagasi toimunud fekaalsele reostumisele. Nimetatud põhjusel on vastavate bakteriliikide eristamine praktilise tähtsusega.

susega.

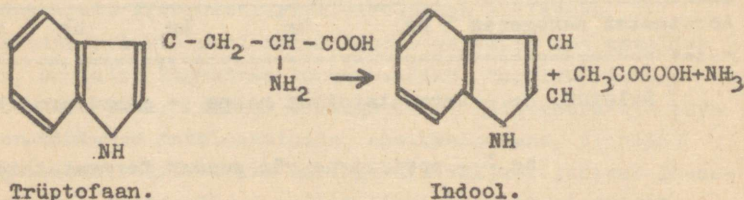
Olles fermentatsioonil poolest sarnased väikeses kirjuses, erinevad *Escherichia coli* ja *Aerobacter aerogenes* teineteisest mitmesuguste teiste omaduste poolest, millest olulisemad leiavad kasutamist nelja alljärgneva reaktsiooni ehk testina:

- 1) indoolitest,
- 2) metüülpunase test,
- 3) Voges-Proskaueri test,
- 4) tsitraattest.

Indoolitest.

Valkude bakteriaalsel roiskumisel soolekanalis tekib amiinohappest - trüptofaanist indool. Viimane tekib ka *Escherichia coli* ja mõnede teiste bakterite kultiveerimisel liha-peptoonpuljongis või peptoonvees. Suhkru, näiteks glükoosi juuresolek söötmes pidurdab aga reaktsiooni teket.

Trüptofaani molekuli külghela eraldamisel tekkinud indooli võib kindlaks teha mitmesuguste värvusreaktsioonidega. Tuntuim on indooli sedastamine para-dimetüülamiido-bensaldehüüdiga Ehrlich-Pringsheimi või Ehrlich-Böhme reaktiivides.



Lisandatakse 2-3 päeva vanusele uuritava mikroobi puljongkultuurile mõned tilgad Ehrlich-Pringsheimi reaktsiivi ja loksutatakse ettevaatlikult katsuti sisu. Siis lisatakse mõned tilgad tugevalt lahjendatud NaNO_2 lahust (1:10.000), mis tugevdab reaktsiooni. Katsuti loksutamisel värvub nüüd vedelik kiirelt roosakaspunaseks.

Amüülalkohol või eeter ekstraheerivad tekkinud värvaine.

Escherichia coli annab positiivse, *Aerobacter aerogenes* aga negatiivse indoolireaktsiooni.

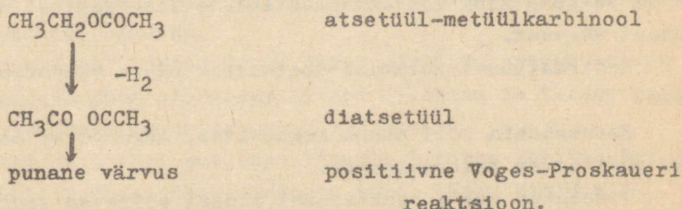
Metüülpunase test.

Escherichia coli produtseerib glükoosi fermenteerimisel tunduvalt enam happelisi produkte kui *Aerobacter aerogenes*. Kui lisandada 3-4 päeva vanusele mikroobi glükoos-puljongkultuurile 5-6 tilka 0,02%-list metüülpunase alkoholilahust, siis värvub intensiivse happeproduktiooni puhul (kultuuri pH on vähem kui 5) vedelik punaseks. Reaktsioon loetakse positiivseks. Vähese happeproduktiooni puhul (pH on suurem kui 5) värvub aga vedelik kollaseks ja seda loetakse negatiivseks reaktsiooniks.

Escherichia coli annab positiivse, *Aerobacter aerogenes* aga negatiivse metüülpunase testi.

Voges-Proskaueri test.

Mõned mikroobid, nagu *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus mesentericus* ja rida teisi annavad glükoosi fermentatsiooni vaheproduktina atsetüül-metüülkarbinooli. Viimane oksüdeerub õhu käes ja leeliste juuresolekul diatsetüüliks, mis, ühinedes peptonis leiduva guanidiiniga, tekitab punase värvuse söötmes.



Voges-Proskaueri reaktsiooni võib teostada kahel viisil:

1. Selleks ettenähtud portselanaluse süvendites segatakse võrdses koguses (4-5 tilka kumbagi) kultuurivedeliku 30%-lise NaOH lahusega. Materjali võtmiseks kasutatakse tavaliselt Pasteuri pipette. Segu jäetakse 30 minutiks seisma. Positiivse reaktsiooni puhul värvub see aeglaselt punaseks.

2. Lisatakse uuritava mikroobi glükoospuljongkultuurile 2-3 ml 10%-list NaOH lahust, asetatakse katsuti termostaati

37° C juurde ja loetakse tulemused (positiivsel juhul punane värvus) 24 tunni möödumisel.

Viimane meetod on enam aeganõudev ja seega vähem praktiline.

Escherichia coli annab negatiivse, Aerobacter aerogenes aga positiivse Voges-Proskaueri reaktsiooni.

Tsitraattest.

Aerobacter aerogenes kasvab sünteetilisest Koseri söötmes, milles ainsaks süsiniku allikaks on sidrunhappu naatrium.

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g,	
$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}$	2 g,	Koseri söötme
NaCl	5 g,	koostis.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g,	
K_2HPO_4	1 g,	
H_2O	1000 ml.	

Kasvu esinemisel muutub muidu vesiselge sööde kergelt häguseks. Ühtlasi näitab kasvu olemasolu mõne tilga tugevalt lahjendatud (1:250 000) fenoolpunase vesilahuse lisandamine, millest vedelik värvub õrnpunaseks. Kasvu puudumisel jääb sööde selgeks ning fenoolpunase lahuse lisandamisel ei teki punast värvust.

Tsitraattesti tulemusi loetakse 4 päeva vanustes külvi-des.

Escherichia coli annab negatiivse, Aerobacter aerogenes aga positiivse tsitraattesti.

Nimetatud nelja reaktsiooni alusel erinevad Escherichia coli ja Aerobacter aerogenes järgnevalt.

Escherichia coli ja Aerobacter aerogenes'i erinevad omadused.

	Indool	Metüül- punane	Voges- Proskauer	Tsitraat- test
Escherichia coli	+	+	-	-
Aerobacter aerogenes	-	-	+	+

Ehrlich-Pringsheimi reaktiiv indooli sedastamiseks.

p - dimetüülamiidobensaldehüüdi 5 g,
metüülalkoholi (96%) 50 ml,
soolhapet (erikaaluga 1,19) 50 ml.

Indikaatorlahus metüülpunase testiks.

Lahustatakse 0,01 g metüülpunast 30 ml-s etüülalkoholis, täiendatakse siis destilleeritud veega kuni 50 ml-ni.

P u h a s k u l t u u r i i s o l e e r i -
m i n e (järg).

Eelmises praktikumis puhaskultuuri saamiseks tehtud Escherichia coli ja Staphylococcus aureus'e külvides kontrollitakse nimetatud mikroobide morfoloogilisi, kultuurilisi ja biokeemilisi omadusi.

Kultuuridest tehtud Grami järgi värvitud preparaatides peavad leiduma ühes gram-negatiivsed bakterid ja teises gram-positiivsed kobarja asetusega stafülokokid.

Escherichia coli puljongkultuuris tehakse Ehrlich-Pringsheimi reaktiiviga kindlaks indooli teke. Väike kirju rida näitab Escherichia coli'le tüüpilist süsivesikute fermentatsiooni happe ja gaasi produktsiooniga.

Veriagaril on näha kuldkollase pigmendiga ümmarguste pesade ümber hemolüütilist vööndit - Staphylococcus aureus'e iseloomulikku omadust.

Juhul, kui Escherichia coli või Staphylococcus aureus'e kultuurides on mikroskoobilisel uurimisel leida kõrvalfloorat (näiteks Escherichia coli preparaadis stafülokokke või koguni

sartsine) ja mittetüüpilisi kultuurilisi või biokeemilisi omadusi, siis on tegemist mitte puhaskultuuriga. Viimase saamiseks tuleb korrata eelmistes praktikumides kirjeldatud puhaskultuuri saamise menetlust.

M i k r o o b i d e k a s v u u u r i - m i n e v e d e l s ö ö t m e s .

Eelmistes praktikumides käsitleti mikroobide iseloomuliku kasvu tahkel söötmel erinevat laadi pesadena. Mikroobide uurimisel ja nende samastamisel on oluline pöörata tähelepanu ka nende kasvu iseloomule vedelsöötmes. *Escherichia coli* puljongkultuuris on näha vedeliku ühtlast hägusust, kusjuures põhjas esineb väiksem sade. Seevastu streptokokid kasvavad puljongsöötmes teralise sademena katsuti põhjas, kuna pealmine vedelik jääb täiesti selgeks. *Bacillus mesentericus* annab vedelsöötme pinnal naastulise kelme, kusjuures ka vedelik on hägunenud. *Bacillus anthracis*'e puljongkultuuri põhjas võib näha vatitaolist pehmet sadet.

Nimetatud omadustele tuleb kultuuride uurimisel alati tähelepanu pöörata, eriti siis, kui on tegemist veel samastamata kultuuriga.

V a l k u d e l a m m u t a m i n e m i k r o o b i d e p o o l t .

Väliskeskkonnas esinevad valgumolekulid ei pääse muutamatul kujul mikroobirakku. Assimilatsiooniks on kõlvulised natiivsete valkude molekulidest palju vähemad molekulid, mis tekivad mikroobide ekstratsellulaarsete valke lõhustavate ehk proteolüütiliste fermentide toimel.

Valkainete lammutamine toimub nii maapinnas, vees, põhjamudas, soolekanalis kui ka surnud organismides. See areneb aeroobsete ja anaeroobsete roiskumist põhjustavate mikroobide elutegevuse toimel. Mikroobide väga mitmesuguste proteolüütiliste fermentide, proteinaaside, peptidaaside, desaminaaside, dekarboksülaaside jt. poolt lammutatakse valkained järkjär-

gult lihtsamateks ühenditeks, kus vaheproduktidena tekivad mitmesugused halva lõhnaga ühendid, alifaatsed happed, roiskumisalkaloidid, aromaatsed ühendid jne. Lõppproduktidena tekivad NH_3 , CO_2 , H_2O , H_2S , N_2 , H_2 , CH_4 jt. Valgu lammutamisel tekkinud ammoniaak ja ammooniumsoolad omakorda hapendatakse maapinnas leiduvate nitrifitseerijate bakterite poolt salpeetris- ja salpeeterhappeks ja nende sooladeks. Viimaseid kasutavad taimed oma valgühendite sünteesiks.

Kui uurida mikroskoobiliselt preparaati, mis tehtud roiskuvast lihast võetud materjalist, võib leida selles erineva kuju ja asetusega mikroobe: gram-positiivseid kobarja asetusega stafülokokke, lühikesi gram-negatiivseid pulgakesi (*Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* jt.), jämedamaid gram-positiivseid pulgakesi (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes*) ja teisi roiskumist põhjustavaid mikroobe.

Laboratoorses praktikas kasutatakse mikroobide uurimisel nende mitmesuguste proteolüütiliste fermentide määramist:

1. Hemolüütilise toime uurimine.

Hemolüütilise toime sedastamisel on kõige näitlikumaks meetodiks uuritavate mikroobide külv veriagarplaadile Petri tassis. Veriagaris on võetud 5% värsket inimese, oina, küüliku või hobuse verd 95% sulatatud ja 45–48° C-ni jahutatud lihapeptonagari peale. Mikroobid külvatakse laiali hõõrumise teel Drigalski kepikesega või joonkülvina Petri tassile. Hemolüüsi produktseerivate mikroobipesade ümber tekib punaliblede lahustumisest läbipaistev vöönd, näiteks *Staphylococcus aureus*'e kultuuris veriagaril. Taolist hemolüütilist toimet nimetatakse β -hemolüüsiks, millest eristatakse veel α -hemolüüsi. Viimane esineb näiteks *Streptococcus viridans*'i kultuuris veriagaril. Sel puhul on pesade ümber roheline värvusega mitte täiesti läbipaistev vöönd.

2. Želatiini veeldamine.

Paljudel mikroobidel avaldub proteolüütiline toime želatiinsöötme veeldamises. Selleks tehakse uuritavast mik-

roobist nõelaga pistekülvi želatiinsöötmesse katsutis ja kasvatatakse külvi 22° C juures, kuna 37° C juures želatiinsööde sulab. Sööde hakkab ferment želatinaasi toimel pinnalt veelduma, kusjuures sõltuvalt mikroobiliigist võib see protsess areneda väga erinevalt: naelakujuliselt (*Vibrio comma*), sukakujuliselt (*Staphylococcus aureus*), kihiliselt (*Pseudomonas aeruginosa*), letrikujuliselt hargnevate väätidena (*Bacillus anthracis*) jne. Tavalises želatiinsöötmes areneb želatiini veeldamine kaunis aeglaselt 3-7 päeva jooksul ja veelgi kauemini.

3. Peptonisatsioon.

Piimaagarile külvatud *Bacillus subtilis*'e, *Staphylococcus aureus*'e või mõnede teiste mikroobiliikide kultuurides võib täheldada kaseolini peptonisatsiooni ferment kaseinaasi toimel. Viimane väljendub läbipaistva vööndi esinemises pesade ümber.

4. Ammoniaagi määramine.

Ammoniaagi tekke sedastamiseks mikroobide desaminaaside või ureaasi toimel kasutatakse Nessleri reaktiivis immutatud filterpabeririba. Viimane riputatakse vattkorgi vahelt katsuti sisemusse nii, et see söötmega kokku ei puutuks. Vattkork surutakse sügavamale katsutisse, kaetakse pealt plastooliga ja hoitakse 24-48 tundi 37° C juures.

Muutub paber kollaseks või pruuniks, siis eraldub kultuurist NH₃.

5. Väävelvesiniku määramine.

Väävlit sisaldavate amiinohapete, nagu tsüstiin, metioniin jt. fermentatiivsel lõhustamisel tekib väävelvesinik. Viimane võib tekkida samuti väävlit sisaldavate anorgaaniliste ühendite (sulfaatide, sulfitite, tiosulfaatide) redutseerimisel desulfuratsiooniprotsessis mõningate maapinnas ja mere mudas asuvate mikroobide elutegevuse toimel.

Väävelvesiniku määramiseks riputatakse kontsentreeritud *Plumbum aceticum*'i lahuses märjaks tehtud filterpaberi riba korgi vahelt uuritava mikroobi puljongkultuuriga katsutisse, nii et riba söötmega kokku ei puutuks. Kultuuri hoitakse 37° C juures 2-4 päeva jooksul. Kui tekib kultuuris H₂S, siis

muutub paberi alumine ots tumehalliks või mustaks.

6. Indooli tekkimine.

Indool tekib mikroobi puljongkultuuris heterotsükliilise amiinohappe - trüptofaani lõhustumisest ferment trüptefanaasi toimel. Selle määramine on kirjeldatud juba eespool.

N i t r a a t i d e t a a n d a m i n e .

Looduses toimuva lämmastiku ringkäigu üheks lüliks on lämmastikhappesoolade taandamine lämmastikuhappesooladeks, ammoniaagiks ja vabaks lämmastikuks. Seesugust mikroobide tegevust nimetatakse denitrifikatsiooniks.

Paljud mikroobid, nagu *Escherichia coli*, *Vibrio comma*, *Proteus vulgaris* jt. taandavad nitraate nitriitideks, millega nende tegevus lõpeb. Denitrifitseeriva toime uurimist kasutatakse laboratooriumis isoleeritud kultuuride samastamiseks. Selleks lisatakse harilikule lihapeptonpuljongile 0,25% keemiliselt puhast naatriumnitraati (NaNO_3), külvatakse uuritavad mikroobid sisse ja kasvatatakse külve termostaadis 37°C juures. Nitriitide olemasolu kultuuris tehakse kindlaks Griessi reaktiiviga, mida lisatakse mõned tilgad kultuurile. Roosakaspunase värvuse tekkimine on positiivse reaktsiooni tunnuseks.

Griessi reaktiiv koosneb kahest lahusest, mis valatakse kokku ja säilitatakse klaaskorgiga pudelis.

- | | |
|----------------------------------|---------|
| 1. \mathcal{L} -naftüülamiin | 0,2, |
| Aqua destillata | 20 ml, |
| Acidum aceticum'i 12%-line lahus | 150 ml. |
| 2. Acidum sulfanilicum | 0,5, |
| Acidum aceticum'i 12%-line lahus | 150 ml. |

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Hinnata külvitulemused *Buliri* söötmes, teha kontrollkülvivid Endo söötmele ja määrata koli-tiiter vastava tabeli põhjal.
2. Tutvuda *Escherichia coli* ning *Aerobacter aerogenes*'e biokeemiliste omadustega ja nende mikroobide diferentseerimise

meetoditega.

3. Teostada indooli määramine, metüülpunase ja tsitraatetest ning Voges-Proskaueri reaktsioon uurimiseks antud kultuuridega.
4. Lõpetada puhaskultuuri isoleerimine.
Teha Grami järgi värvitud kontrollpreparaadid isoleeritud kultuuridest ja kontrollida viimaste kultuurilisi ning biokeemilisi omadusi.
5. Tutvuda erinevate mikroobiliikide kasvu iseloomuga liha-peptonpulgongis.
6. Tutvuda mikroobide proteolüütiliste omaduste määramise meetoditega.
7. Määrata nitriitide olemasolu uuritavates kultuurides Griessi reaktiiviga.

IX p r a k t i k u m.

T e e m a: INIMISE KEHA JA MAAPINNA MIKROFLOORA UURIMINE.
MIKROOBIDE HINGAMINE. HAPPEKÄÄRIMISED.

I n i m e s e k e h a m i k r o f l o o r a.

Inimest ümbritsevas väliskeskkonnas on massiliselt mitmesuguseid mikroorganisme, mis satuvad kontakti inimese nahapinna ja limaskestadega. Teatud mikroorganismid on fülogeneetilise arengu vältel kohandunud inimese kui peremeesorganismiga, elutsedes püsivalt inimese välisnahal, limaskestadel, soolekanalis ja avaldades antagonistlikku toimet juhuslikult vastavasse keskkonda sattunud mikroobiliikidele.

Inimese nahapinnalt võib leida stafülokokke, sartsine, happekindlaid baktereid, difteroide. Püsivalt esineb siin

valget pigmenti produtseeriv *Staphylococcus epidermidis*.

Inimese suuõõne limaskestal leidub mikrokokke, batsille ja laktobatsillide perekonda kuuluvaid mikroobe.

Igemevoltides ja hambakatus on mikrokokke, streptokokke, vibrioone, spirille, mitmesuguseid spiroheete, pärmisarnaseid organisme, vahel ka algloomi.

Soole mikrofloora uurimine.

Kui maolimaskestal ja kaksteistsõrmiksooles on mikroobe väga vähe, siis juba peensoole alumises lõigus, eriti aga jämesooles, võib leida massiliselt mitmesuguseid mikroorganismide. Ligikaudu üks kolmandik rooja kuivainest koosneb mikroobidest. Rooja külvides lihtagarsõtmeal; mis kultiveeritud tavalistes, aeroobsetes tingimustes, domineerib gram-negatiivne mikrofloora täiskasvanul. Peale *Escherichia coli* võib roojas leida *Alcaligenes faecalis*'t, *Aerobacter aerogenes*'t, *Proteus vulgaris*'t, *Pseudomonas aeruginosa*'t jt. gram-negatiivseid baktereid. Kasvatades roojakülve erisõõtmetel anaeroobseis tingimuses, võib leida suurel arvul *Clostridium*'i perekonda kuuluvaid gram-positiivseid batsille, laktobatsille, mikrokokke ja bakteroide. Rooja uurimisel pimeväljajameetodil võib leida selles vibrioone, spirille ja spiroheete koos teiste mikroobidega. Seentest võib leida roojas *Candida*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Penicillium* liike, algloomadest *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* jt.

Vastsündinud lapsel on esimestel tundidel peale sündimist mekoonium ehk esiroe enamasti steriilne. Kuid 4-24 tunni möödumisel kujuneb välja iseloomulik soole mikrofloora. Normaalsel emapiimaga toidetud imikul on roe kollakaspruun, pehme ja hapu lõhnaga. Domineerib *Lactobacillus bifidus*, selle kõrval *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecalis*, vähe-mal määral esineb kolibaktereid ja stafülokokke. Kunstlikult toidetud imikul aga on roojas, mis ise on tumepruuni värvuse ja roiskuva lõhnaga, kolibaktereid, enterokokke, mõningaid *Clostridium*'i perekonda kuuluvaid liike ja vähesel määral *Lactobacillus acidophilus*'t.

Kui teha preparaadid täiskasvanu ja emapiimaga toidetud

terve imiku roojast, värvida need Grami järgi ja uurida mikroskoobis, siis võib täheldada juba esimesel pilgul erinevusi nende mikrofloora koostises. Täiskasvanu roojast tehtud preparaadis torkab silma mikrofloora suur mitmekesisus, kusjuures kõige enam on leida gram-negatiivseid baktereid, vähemal määral jämedaid gram-positiivseid pulgakesi üksikult või lühikeste ahelatena, streptokokke, stafülokokke, pärmseeni jt. Imiku rooja preparaadis on seevastu ühtlane mikrofloora, mis koosneb peaaegu ainult gram-positiivsetest sirgetest või vähe kõverdunud pulgakestest. (*Lactobacillus bifidus*). Ainult vähe on leida gram-positiivseid kokke ja peaaegu üldse mitte gram-negatiivseid baktereid.

Nahapinna mikrofloora uurimine.

Nahapinna mikrofloorat on kõige lihtsam uurida järgmisel meetodil: Petri tassile valatakse välja vesivannis sulatatud lihapeptonagarsööde, lastakse hanguda ja jagatakse seejärel tassi põhi klaasipliatsiga sektoriteks. Igale sektorile tehakse sõrmekülv. Selleks tõstetakse hetkeks tassi põhi söötmelega tassi kaanest välja peaaegu vertikaalsesse asendisse ja puudutatakse momendiks söötme pinda sektori keskosas sõrmeotstega. Seejuures ei tohi söödet katki vajutada. Tassi põhi asetatakse jälle kaane sisse ja Petri tass termostaati 37° C juurde 24-ks tunniks. Iga nahapinnal leidunud eluvõimeline mikroob annab söötmel paljunedes pesa.

Suuõõne limaskestast mikrofloora uurimine.

Inimese suuõõne limaskestal, eriti kurgumandlitel, võib leida peale mitmesuguste mittepatogeensete mikroobide ka patogeenseid liike, näiteks hemolüütilisi streptokokke. Kurgumandlitelt võetakse materjali steriilse vatitampooniga. Isik, kellelt võetakse materjali, peab asuma nädoga vastu valgusallikat või akent, et oleks ülevaade kurgukaartest. Vasaku käega surub külvimaterjali võtja steriilse spaatli abil hästi avatud suus keele alla ja tõmbab paremas käes hoitud tampooni otsaga korraks üle kummagi kurgumandli. Sama tampooniga tehakse ka külv veriagarile Petri tassis. Tassi põhi, mis klaasipliatsiga jaotatud sektoriteks, hoitakse vasaku käe-

ga vertikaalselt näo kõrgusel. Paremas käes hoitud tamponi-
otsaga tehakse paralleelsete tõmmetega joonkülv või siksak-
külv ühest sektori piirist teiseni. Külve jälgitakse pärast
24-48 tunnilist hoidmist 37° C juures. Söötmel võib leida mit-
mesuguseid pesi. Sagedamini võib näha kollase või valge pig-
mendiga stafülokokkide ja ilma pigmendita väga väikesi strep-
tokokkide pesi, millest viimased võivad anda α - või β -hemo-
lüüsi.

M a a p i n n a m i k r o f l o o r a j a m i k r o o b i d e h i n g a m i n e.

Maapind on loomulikult keskkonnaks paljudele mikroobide-
le ja üldse nende suurimaks reservuaariks looduses. Pinnases
võib leida mitmesuguseid baktereid, seeni, spiroheete, alg-
loomi, filtreeruvaid viirusi ja bakteriofaage, mis asuvad
ühksteise suhtes mitmesuguses sümbioosi, sünergismi-või anta-
gonismivahekorras. Maapinnas võib leida ka patogeenseid
mikroobe, millest eriti kaua võivad püsida eluvõimelistena
mitmesuguste batsillide eosed.

Mikroorganismide arv 1 g pinnases võib kõikuda väga suu-
res ulatuses, sõltudes paljudest asjaoludest, eriti aga orgaa-
nilise aine hulgast maapinnas. Peale selle sõltub pinnase
iseloomust ka mikrofloora koostis. Liivane pinnas, mis on õhu-
rikkam, sisaldab suuremal arvul aeroobseid mikroorganisme,
kuna veerikas soine või savine pinnas on rikkam anaeroobse-
test mikroobidest.

Mikroobide elutegevuseks vajaliku energia vabanemine toi-
mub erinevat laadi hingamisprotsessina.

Aeroobse hingamistüübiga mikroobid vajavad vaba hapnik-
ku keskkonnas.

Fakultatiivsed ehk volilised anaeroobid võivad areneda
vaba hapniku esinemisel keskkonnas, aga ka selle puudumisel,
kohandudes keskkonna tingimustele.

Obligaatseid anaeroobe kahjustatakse nende elutegevuses
ning nad hävinevad juhul, kui ümbritseva keskkonna vaba hap-
niku sisaldus ületab teatud minimaalse partsiaalrõhu väärtu-

se (10-40 mm Hg sama rõhust). Oma elutegevuseks vajalikku energiat ammutavad obligaatset anaeroobid suhkrute, alkoholide ja orgaaniliste hapete astmelisest lammutamisest mitmesugustes käärimisprotsessides.

Anaeroobsete mikroobide kultiveerimine.

Obligaatsete anaeroobide kultiveerimisel kõrvaldatakse vaba hapnik söötimest ja hoitakse kultuurid hapniku eest kaitsult kogu kultiveerimise perioodil. Selleks kasutatakse mitmesuguseid meetodeid:

1. Anaeroobe kultiveeritakse söötmes, millele on lisandatud hapnikku absorbeerivaid aineid, nagu värskeid koetükikesi, toore või steriliseeritud kartuli tükikesi, glükoosi jne. Enne materjali külvamist söötmele keedetakse viimast 10-30 min. vesivannis 100° C juures, mille tagajärjel eraldub söötimest õhk ühes hapnikuga.

Kaitseks hapniku sissepääsemise eest kaetakse vedelsöötmed 2-3 cm kõrguse steriilse vaseliinõlikihiga.

2. Anaeroobide külvid asetatakse paksude seintega nõusse - anaerostaati, millest õhk vaakumpumba abil eemaldatakse. Hapniku täielikuks kõrvaldamiseks võib seda meetodit kombineerida hapniku absorbeerimismeetodiga. Selleks asetatakse anaerostaati lahtise tassi põhja ühes külvatud söötmetega mõni gramm acidum pyrogallicum'i ja selle kõrvale lahtisesse kõrgemasse nõusse 10-15 ml 10%-list KOH lahust. Peale õhu eemaldamist anaerostaadist vaakumpumba abil lastakse järsu liigutusega leelist sisaldav nõu ümber kukkuda pürogallushapet sisaldavasse nõusse. Tekkiv segu, ülalnimetatud vahekorras võib absorbeerida hapnikku 100 ml mahuga õhuruumist.

3. Hapnikku võib asendada inertse gaasiga. Selleks lastakse vastavate torude kaudu vedelsöötimest läbi vesinikku või lämmastikku, kuni kogu õhk eemaldub. Seejärel suletakse klaastorude otsad ja kultiveeritakse külve termostaadis.

4. Ühel ja samal söötmel võib kultiveerida ühes anaeroobidega mingeid obligaatset aeroobseid mikroobe. Kasutades vaba õhu hapnikku, loovad need anaeroobidele soodsad tingimused. Selleks lõigatakse steriilse noaga Petri tassi vala-

tud söötmekihist välja keskmine kitsas riba ja külvatakse ühele küljele uuritavad anaeroobid, teisele aga aeroobide, näiteks *Serratia marcescens*'i kultuur. Tassi kaas ja põhi peavad hästi tihedalt kokku käima ja see vahe suletakse veelgi parafiiniga, mille järel asetatakse tass termostaati.

Mulla külv aeroobsete ja anaeroobsete mikroobide uurimiseks.

Nii aeroobse kui ka anaeroobse hingamistüübiga mikroobide esinemist mullas võib demonstreerida järgmiselt:

Võetakse pinnasest steriilse kühvlikesega mulda 3-4 cm sügavusest kihist, milles leidub tavaliselt kõige suuremal arvul mikroobe. Mulda hõõrutakse steriilses uhmris vähese hulga steriilse veega ja saadud segu asetatakse steriilsesse kolbi, lisatakse veel vett ja loksutatakse kolbi 10-15 min. jooksul selleks, et dispergeerida mulla tahketele osistele adsorbeerunud mikroobid. Pärast mõneminutilist kolvi seismist võetakse pealmist vedelikku, mida kasutatakse külviks.

Aasatäis mullasuspensiooni külvatakse Kitt-Tarozzi söötmesse. Seejärel kuumutatakse katsutit söötmeaga vesivannis 80° C juures 15-20 min. jooksul vegetatiivse mikrofloora hävitamiseks. Eluvõimelistena säilivad aga mitmesuguste mikroobide, sealhulgas ka anaeroobide eosed.

Üks aasatäis mullasuspensiooni külvatakse tahke sünteetilise Simmons'i söötme pinnale.

Külvid asetatakse termostaati 37° C juurde 24-48 tunniks.

Kitt-Tarozzi sööde.

Sööde sisaldab lihapeptonpuljongis merisea, küüliku või vasika värske maksa tükikesi, mida lisatakse katsutisse 8-10 ml puljongi kohta 5-6 tükikest. Sööde, kaetud steriilse vase-liinõlikihiga, steriliseeritakse autoklaavis 30 min. 1 Atm juures.

Simmons'i sööde.

Sööde on sama koostisega kui Keseri sööde (vt. VIII praktikum), millele on aga lisandatud 2% agar-agarit. Söötmele kasvavad aeroobse hingamistüübiga mikroobid, mis on võimelised ühtlasi kasutama ammoniumfosfaati ainsa lämmastiku- ja sid-

runhappe-naatriumi ainsa süsinikuallikana.

H a p p e k ä ä r i m i s e d.

Happekäärimised on säärased süsivesikute, alkoholide, glükosiidide fermentatsioonid, milles mikroobide fermentide poolt põhjustatud käärimisel tekivad peamiste produktidena orgaanilised happed.

Äädikhape tekib peamiselt etüülalkoholi hapendumise tagajärjel äädikhappebakterite fermentide toimetel. Käärimine toimub 4-16%-lises alkoholilahuses ja jääb seisma, kui kääriavas segus tekib 10-13% äädikhapet. Äädikhappe bakterid on mitte-liikuvad lühikesed pulgakesed. Neist tuntumad on *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter rancens* jt.

Piimhappe käärimist demonstreerib meile igapäevases elus harilik piima hapendumine, kus piimasuhkur mikroobide fermentide toimetel lõhustub piimhappeks ja seejuures piimast sadestub kaseiin.

Tuntumad piimhappebakterid on gram-positiivsed *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* jt.

Õlihappefermentatsiooni all mõistetakse niisugust süsivesikute, alkoholide, piimhappe ja selle soolade lõhustumist, mille puhul tekivad õlihappe, süsihappegaas, vesinik, butüülalkohol ja rida teisi orgaanilisi happeid. Seda käärimist põhjustavad mikroobid on obligaatset anaeroobid ja neid leidub laialdaselt maapinnas, sõnnikus, inimeste ja loomade sooltes, juustus ja mujal. Tuntumateks õlihappekäärijateks on *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium lentoputrescens* jt.

Äädikhappekäärijate mikroobide uurimine.

Lahjendatud õlle või veini seisemisel tekib mõne päeva jooksul õrn sile kelme, mis hiljem muutub tihedamaks. Ühtlasi on tunda nõrka äädika lõhna. Vedeliku pinnal on arenenud äädikhappebakterid.

Äädikhappebakterite uurimiseks tehakse preparaate eseme-

klaasil õhu käes seisnud veinist ja värvitakse metüleensinise-
ga 5 minutit. Preparaadis on näha lühikesi väikesi pulga-
kesi, mis asuvad üksikult, kahekaupa või pikemate ahelatena.
Mõnes preparaadis võib leida pikki niitjaid ja käävjalts pais-
sunud involutsioonivorme. Peale äädikhappebakterite võib lei-
da preparaadis suuri ovaalse kujuga pärmseeni.

Õlihappekäärijate mikroobide uurimine.

Vastavate mikroobide sedastamiseks asetatakse kolvis
olevasse glükoosilahusesse tükk vana juustu ja külvatakse
sisse väike tükk sõnnikut. Mikroobid arenevad 30-37° C juures
kolvi põhjas, kus on anaeroobsed tingimused. Kolvist eritub
räästunud või lõhna.

Preparaadi tegemiseks võetakse uurimismaterjali kolvi
põhjast aasaga. Preparaat värvitakse Grami järgi. Mikros-
koobilisel uurimisel võib täheldada jämedaid pikki pulgake-
si, osalt üksikult või jälle lühikeste ahelatena. Kohati on
pulgad käävjalts paisunud ja raku sees on näha subterminaalse
või terminaalse asetusega eost, mis Grami meetodil ilmneb
värvumata ümmarguse täpina. Õlihappebakterid on gram-positiiv-
sed.

Piimhappekäärijate mikroobide uurimine.

Preparaat valmistatakse esemeklaasil aasatäiest keefiri-
massist ja hõõrutakse laiali hästi õhukeseks kihiks. Metüleens-
sinisega 5 min. kestel värvitud preparaadis on näha kaseiini-
massis siin ja seal kahekaupa või lühikeste ahelatena paikne-
vaid ja ahela pikitelje suunas vähe väljavenitatud kokke.
(Streptococcus lactis).

Peale piimhappebakterite võib leida preparaadis üksikuid
pärmseente rakke ja pikemaid Oidium albicans'i niite.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Värvida Grami järgi ja uurida preparaati imiku roojast.
2. Värvida Grami järgi ja uurida preparaati täiskasvanud
inimese roojast.
3. Teostada sõrme nahalt külv agarplaadi sektorile.

4. Võtta steriilse vatitamponiga naabri kurgumandlitelt külvimaterjali ja külvata joonkülvina veriagarplaadi sektorile.
5. Teostada mulla külv Kitt-Tarozzi söötmesse ning kuumutada seejärel katseklaasi vesivannis 80° C juures 20 min. jooksul.
6. Teostada mulla külv Simmonsi söötme pinnale.
7. Valmistada ja uurida riknenud veinist preparaas, mis värvitud metüleensinisega 5 min.
8. Valmistada ja uurida preparaas Grami järgi õlihappekäärijatest mikroobidest.
9. Valmistada ja uurida keefirist preparaas, mis värvitud metüleensinisega 5 min.

X p r a k t i k u m.

T e e m a: INIMESE KEHA JA MAAPINNA MIKROFLOORA UURIMINE.
MIKROOBIDE FÜSIOLOOGIA-ALASTE KÜSIMUSTE KORDAMINE. INIMESE KEHA MIKROFLOORA (järg).

Belmisel korral tehtud sõrmenaha puutekülvis on näha mitmesuguse kuju ja värvusega pesi. Sagedamini on leida valge pigmendiga stafülokokkide pesi.

Veriagarile tehtud kurgulima külvis võib leida suuremaid ja vähemaid, α - ja β -hemolüüsi andnud pesi.

MAAPINNA MIKROFLOORA (järg).

Kitt-Tarozzi söötmes võib näha katseklaasi põhjas hägusust, kuna söötme pealmine pind on selge. Aasaga võetakse materjali koetükikeste vahelt, tehakse preparaas esemeklaasil, millelt enne leegis fikseerimist kõrvaldatakse filterpaberi ribaga vaseliinõli. Grami järgi värvitud preparaadis võib näha gram-positiivseid pulgakesi.

Simmons'i söötmelt võetud mikroobide uurimisel 1:10 lahj. karboolfuksiiniga värvitud preparaadis on näha mitmesuguse kuju ja asetusega pulgakesi ja kiirikseente niite.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Valmistada sõrmenaha puutekülvi erinevatest pesadest Grami järgi värvitud preparaat.
2. Teha sama kurgulima külvist.
3. Teha Kitt-Tarozzi söötme põhjas olevast sademest Grami järgi värvitud preparaat.
4. Valmistada Simmons'i söötmel kasvanud erinevatest pesadest preparaat ja värvida erütrosiiniga 5 min.
5. Korrata mikroobide füsioloogiat ja valmistada praktilisteks harjutusteks külvitehnika alal.

XI p r a k t i k u m.

T e e m a: VÄLISKESKKONNA TEGURITE TOIME MIKROOBIDELE.

Mikroobide elutegevus on pidevalt seotud väliskeskkonnaga. Mitmesugused väliskeskkonna füüsikalised, keemilised ja bioloogilised tegurid mõjuvad sellele nii kahjustavalt kui ka soodustavalt. Arstiteaduses üldse, eriti aga mikrobioloogias, leiab väga laialdast rakendamist paljude väliskeskkonna tegurite toime mikroobidele. Nii näiteks kasutatakse füüsikalistest teguritest kõrgete temperatuuride mikroobe kahjustavat toimet sterilsatsioonis, madalaid temperatuure aga viiruste säilitamisel. Mõningate keemiliste ühendite toimel põhineb desinfektsioon, kemoteraapia. Bioloogilistest teguritest on antibiootikumid ja bakteriofaagid muutunud nakkushaiguste

üldtunnustatud profülaktika- ja ravivahendeiks. Füüsilised, keemilised ja bioloogilised väliskeskkonna tegurid tingivad ka mikroobide muutlikkuse.

Füüsiliste tegurite toime mikroobidele.

Valguse toime mikroobidele.

Valgus avaldab mikroobidele kahjustavat toimet. Enamik mikroobe kasvab ja paljuneb ainult pimeduses, mistõttu välditakse ka valguse juurdepääsu termostaati. Eriti ohtlikud on päikesekiired, mis surmavad mikroobe juba paari tunni vältel. Mikroobidele mõjuvad kahjustavalt esmajoonelise lühikese lainepikkusega kiired - valgusspektri ultravioletne, violetne ja sinine osa.

Päikesekiirte kahjustav toime mikroobidele avaldub eriti demonstratiivselt Buchneri katses, mis viiakse läbi järgmiselt. Uuritavast kultuurist tehakse tihe külv tahkele söötmele Petri tassis. Söötme pinnale asetatakse mustast paberist lõigatud steriilsed tähed, mis Buchneri klassilises katses moodustavad sõna "typhus". Avatud Petri tassile lastakse toimida päikesekiirte 1-1,5 tunni vältel, siis eemaldatakse paberist tähed, suletakse Petri tass ja paigutatakse see 24 tunniks termostaati 37° C juures. Kultuuri kasv ilmneb ainult sel söötme alal, mis oli kaetud mustast paberist tähtedega, "kirjutades" söötme pinnale vastava sõna. Söötme katmata pinnal aga hävisid mikroobid päikesekiirte toimel.

Temperatuuri toime mikroobidele.

Kõrged temperatuurid avaldavad mikroobidele kahjustavat toimet. Võrreldes eostega on seejuures eriti tundlikud mikroobide vegetatiivsed vormid. Nii hävivad viimased juba 60-70° C juures 10-20 minuti vältel, eosed aga kuumas auruses 120° C juures 15 minuti ja kuumas kuivas õhus alles 160° C juures 1-2 tunni vältel.

Madalad temperatuurid mikroobe ei hävita. Nii paljunevad mõned mikroobiliigid 0° ja veel - 30 kuni -40° C juures.

Oma eluvõime aga säilitavad mikroobid isegi vedelõhu, s.o. -
180° C juures.

Eoseid moodustavate mikroobide suuremat resistentsust kõrgete temperatuuride toimele, võrreldes eoseid mittemoodustavate mikroobidega, näitab järgmine katse: *Escherichia coli* (eoseid mittemoodustav mikroob) ja *Bacillus mesentericus*'e (eoseid moodustav mikroob) puljongkultuure keedetakse vesivannis 5 minuti vältel. Siis tehakse mõlemast katsutist külvi-aasaga kontrollkülvid lihapeptonpuljongisse ja paigutatakse need 48 tunniks termostaati temperatuuriga 37° C. *Escherichia coli* puljongkultuurist tehtud kontrollkülvis kasvu ei ilmne, küll aga ilmneb kasv *Bacillus mesentericus*'e puljongkultuurist tehtud kontrollkülvis.

K e e m i l i s t e t e g u r i t e t o i m e m i k r o o b i d e l e .

Rida keemilisi ühendeid avaldab mikroobidele kahjustavat toimet. Osa neist mõjub bakteriostaatilisel, s.t. kasvu pärssivalt, osa aga bakteritsiidisel, s.t. mikroobe surmavalt. Bakteriostaatilisel mõjub enamik kemoterapeutilisi preparaate. Bakteriostaatilise toime määramiseks lisatakse uuritavat ainet mitmesugustes kontsentratsioonides söötmetele, millel kasvatatakse vastavaid mikroobe. Bakteritsiidisel mõjuvad desinfektsiooniks kasutatavad keemilised ühendid. Bakteritsiidse toime määramisel toimitakse erinevate uuritava aine kontsentratsioonidega teatud ajavahemike vältel mikroobidele ja paigutatakse need siis normaalsesse kasvutingimustesse.

Mitmesuguste desinfektsiooniks kasutatavate ainete bakteritsiidse toime võrdlevaks hindamiseks määratakse nende fenoolikoefitsient.

Fenoolikoefitsiendi määramine.

Fenoolikoefitsiendi all mõistetakse aine bakteritsiidse toime aktiivsuse suhet fenooli bakteritsiidse toime aktiivsusesse, mille väärtus on tingimuslikult üks. Fenoolikoefitsient saadakse, jagades aine maksimaalse bakteritsiidset toimet avaldava lahjenduse fenooli maksimaalsele bakte-

ritsiidset toimet avaldavale lahjendusele. Eelduseks on, et vastavad väärtused määrati standardsetes tingimustes: võeti võrdsetes hulkades ühesuguse tihedusega sama kultuuri suspensioon, ühesugune toimeaeg ja temperatuur, sama keskkond jne. Kui näiteks fenool surmab *Escherichia coli* kultuuri 5 minuti vältel lahjenduses 1:100, uuritav aine aga sama kultuuri samuti 5 minuti vältel lahjenduses 1:1200, on uuritava aine fenoolikoefitsient $\frac{1200}{100} = 12$, s.t. uuritav aine on *Escherichia coli* suhtes 12 korda aktiivsem kui fenool.

Sama aine bakteritsiidse toime aktiivsus mitmesugustele mikroobiliikidele on erinev, mistõttu fenoolikoefitsiendi määramisel tuleb alati märkida kasutatud mikroobiliik. Kui selline mäрге puudub, on kasutatud *Salmonella typhi* kultuuri. Otstarbekohane on määrata fenoolikoefitsient *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*'e ja *Bacillus cereus*'e suhtes, sest *Escherichia coli* on resistentseim soole mikrofloorasse kuuluv mikroob, *Staphylococcus aureus* resistentseim eosteta mikroob, *Bacillus cereus* aga moodustab eoseid.

Fenoolikoefitsiendi määramise näitena määrame klooramiini fenoolikoefitsiendi *Staphylococcus aureus*'e kultuuri suhtes.

1. Võetakse kaks viiest katsutist koosnevat katsutite rida, millest esimesse valmistatakse destilleeritud veega fenooli lahjendused 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 ja 1:320 ning teise klooramiini lahjendused 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ja 1:3200. Vedeliku hulk ühes katsutis peab olema 8 ml.

Vastavate lahjenduste saamiseks valmistatakse eelnevalt 5%-lise fenooli ja 0,5%-lise klooramiini alglahused. Edasi pipeteeritakse alglahused ja destilleeritud vesi katsutitesse vastavalt järgnevale skeemile:

Katsuti- rite rida	Vedelik	Katsuti number				
		1	2	3	4	5
I	5%-lise fenooli alglahus ml-tes	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5
	destilleeritud vesi ml-tes	-	4,0	6,0	7,0	7,5
	saadud lahjendus	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
II	0,5%-lise kloor- amiini alglahus ml-tes	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5
	destilleeritud vesi ml-tes	-	4,0	6,0	7,0	7,5
	saadud lahjendus	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200

2. 24-tunniline Staphylococcus aureus'e puljongkultuur ja katsutid fenooli ning klooramiini lahjendustega asetatakse 10 minutiks vesivanni 20° C juures, et ühtlustada mõlema aine lahjenduste ja kultuuri temperatuuri.

3. Kõikidele fenooli ning klooramiini lahjendustele lisatakse 0,1 ml Staphylococcus aureus'e puljongkultuuri ja katsutid asetatakse tagasi vesivanni 20° C juures.

4. Kõikidest katsutitest tehakse külviaasaga kontrollkülvid lihapeptonpuljongisse 5, 10, 15, 20 ja 25 minuti järel. Kontrollkülvide katsutitele märgitakse nii fenooli või klooramiini lahjendus kui ka selle toimeaeg ja paigutatakse need siis 48 tunniks termostaati 37° C juures.

48 tunni möödumisel registreeritakse kontrollkülvide tulemused söötme hägunemise järel ja arvutatakse fenoolikoefitsient. On otstarbekohane koondada kontrollkülvide tulemused järgmisse tabelisse, märkides seejuures kasvu + -ga ja kasvu puudumist 0-ga:

Desinfitseeriv aine	Lahjendus	Toimeaeg minutites				
		5	10	15	20	25
Fenool	1:20					
	1:40					
	1:80					
	1:160					
	1:320					
Klooramiin	1:200					
	1:400					
	1:800					
	1:1600					
	1:3200					

B i o l o o g i l i s t e t e g u r i t e t o i m e m i k r o o b i d e l e .

Antibiootikumide bakteriostaatiline toime mikroobidele.

Antibiootikumideks nimetatakse bioloogilisi või nende eeskujul saadud sünteetilisi preparaate, mis kahjustavad patogeensete mikroobide ainevahetust haige organismis. Antibiootilisi aineid kui vahendeid võitluses olemasolu eest produtseerivad seened, kiirikseened, bakterid ja batsillid, mis kuuluvad põhiliselt maapinna mikrofloorasse. Antibiootilisi aineid produtseerivad ka kõrgemad taimed, samuti on tuntud loomse päritoluga antibiootikumid. Mõningaid antibiootikume (penitsilliin, streptomütsiin, levomütsetiin, biomütsiin, terramütsiin jt.) iseloomustab väga tugev toime mikroobidele vähese kahjustava toime juures inimorganismile, mistõttu nad leiavad laialdast kasutamist haigete ravis.

Põhiliselt avaldavad antibiootikumid mikroobidele bakteriostaatilist, s.t. kasvu pärssivat toimet, mõjutades mitmesuguseid mikroobirakule elulise tähtsusega fermentsüsteeme. Igale antibiootilisele preparaadile on omane kindel toime mehhanism, mille aluseks on mõju teatud kindlale mikroobiraku fermentsüsteemile. Üksikute mikroobiliikide fermentsüsteemide vahel esineb aga erinevusi. Sellest tingituna toimib iga antibiootiline preparaat ainult teatud kindlatele mikroobiliikidele, s.t. omab kindlat toimespektrit.

Erinev on ka sama mikroobiliigi üksiktüvede tundlikkus teatud antibiootikumi suhtes. See tundlikkus võib muutuda vastava ravi vältel, kusjuures võivad kujuneda isegi nn. resistentsed tüved, mis ei allu enam antud antibiootikumi toimele. Resistentsus antibiootilise preparaadi suhtes on spetsiifiline - see tähendab, et näiteks streptomütsiinravi vältel areneb haigusetekitajal ainult streptomütsiinresistentsus, kusjuures säilib tundlikkus teiste antibiootikumide suhtes.

Haigusetekitajate tundlikkuse määramine antibiootiliste preparaatide suhtes omab suurt tähtsust kliinikus, võimaldades rakendada ratsionaalset ravi. Selleks kasutatakse mitme-

suguseid meetodeid. Tavalistes diagnostilistes laboratooriumides on levinumaks meetodiks mikroobide penitsilliin-, streptomütsiin-, levomütsetiin- ja biomütsiintundlikkuse määramine vastavate antibiootikumidega immutatud diagnostiliste paberketastega. Taolisi kettaid toodab farmatseutiline tööstus. Nende kasutamise metoodika on järgmine:

1. Uuritavast mikroobitüvest (või vahetult haigelt võetud uurimismaterjalist) tehakse tihe külv lihapeptonagarplaadile. Petri tass jagatakse klaasipliatsiga 4 sektoriks. Iga sektori keskele söötme pinnale asetatakse pintsetiga üks diagnostiline ketas - ühele penitsilliiniga, teisele streptomütsiiniga, kolmandale levomütsetiiniga ja neljandale biomütsiiniga. Kui erinevate antibiootikumidega immutatud kettad on sama värvusega, tuleb sektorid märgistada. Külv paigutatakse 18 tunniks termostaati 37° C juures.

2. Kettaist difundeeruvad antibiootilised preparaadid söötmesse, pärssides neile tundlike mikroobide kasvu. Selle tulemusena jääb vastava ketta ümber kasvuvaba tsoon, mille läbimõõt võimaldab hinnata uuritava mikroobi tundlikkust antud antibiootikumi suhtes.

Kasvuvaba tsooni läbimõõt (koos ketta enda läbimõõduga) mõõdetakse joonlauaga. Sellest läbimõõdust olenevalt hinnatakse mikroobi tundlikkust järgmiselt:

kasvuvaba tsooni läbimõõt üle 25 mm - uuritav mikroob on antud antibiootikumi suhtes väga tundlik (+++);

kasvuvaba tsooni läbimõõt 15-25 mm - uuritav mikroob on antud antibiootikumi suhtes tundlik (++);

kasvuvaba tsooni läbimõõt kuni 15 mm - uuritav mikroob on antud antibiootikumi suhtes vähetundlik (+);

kasvuvaba tsoon puudub - uuritav mikroob pole antud antibiootikumi suhtes tundlik, s.t. on antud antibiootikumi suhtes resistentne.

Bakteriofaagi lüütiline toime mikroobidele.

Bakteriofaagid kujutavad endast viirusi, mis kutsuvad esile tundlike mikroobide lüüsi ehk lahustumise. Bakteriofaagid on spetsiifilised - igale mikroobiliigile või isegi

tüübile toimivad ainult neile omased bakteriofaagid. Võib esineda ka faagiresistentseid tüvesid, mis ei allu spetsiifiliste bakteriofaagide toimele. Bakteriofaagid tingivad ainult elusate aktiivselt paljunevate mikroobirakkude lüüsi.

Bakteriofaagide lüütiline toime mikroobidele avaldub nii vedelsöötmes kui ka tahkel söötmel. Bakteriofaagi aktiivsuse hindamiseks määratakse selle tiiter - suurim bakteriofaagi lahjendus, mis tingib veel vastava tundliku tüve lüüsi. Tiitri väärtusi väljendatakse tavaliselt bakteriofaagi lahjenduse 1:10 astmega - näiteks 10^{-5} . Praktiliselt kasutatakse bakteriofaage nakkushaiguste profülaktikas ja ravis, samuti nende mikrobioloogilisel diagnoosimisel. Diagnostilisel otstarbel kasutatakse bakteriofaage kolmel viisil:

1. Uuritavast materjalist bakteriofaagi isoleerimine ja samastamine. Bakteriofaagi spetsiifilisuse tõttu lubab selle sedastamine uuritavast materjalist oletada ka vastava haigusetekiitaja olemasolu.

2. Haigusetekiitaja sedastamine ja samastamine uuritavas materjalist spetsiifiliste bakteriofaagidega nn. bakteriofaagi tiitri tõusu reaktsiooni abil. Spetsiifilise bakteriofaagi tiiter tõuseb vastava mikroobiliigi leidumisel uuritavas materjalist faagiosakeste hulga suurenemise tõttu.

3. Uuritavast materjalist isoleeritud mikroobide puhas-kultuuride samastamine spetsiifiliste bakteriofaagidega.

Bakteriofaagi lüütiline toime vedelsöötmes.

Düsentēriatekitajate *Shigella flexneri* kultuuri külvatatakse külvinõelaga kahte lihapeptonpuljongisse. Külvid paigutatakse 3-4 tunniks termostaati 37° C juures. Selle aja möödudes võib täheldada söötme õrna hõngustumist kultuuri kasvu tõttu. Siis lisatakse ühte katsutisse asatäis *Shigella flexneri* bakteriofaagi ja paigutatakse mõlemad katsutid 18-20 tunniks tagasi termostaati. Katsutis, millesse lisati bakteriofaagi, muutub sööde mikroobide lüüsi tagajärjel täiesti läbipaistvaks. Teises katsutis aga on sööde hõngune mikroobide intensiivse paljunemise tulemusena.

Bakteriofaagi lüütiline toime tahkel
söötmel.

Düsenteeriatekitaja *Shigella flexneri* kultuuri külvatakse kahele lihapeptonagarplaadile. Ühele plaadile tilgutatakse paar tilka *Shigella flexneri* bakteriofaagi ja paigutatakse mõlemad külvid 18-20 tunniks termostaati 37° C juures. Kontrollkülvis toimub ühtlane kultuuri kasv kogu söötme pinnal. Teises külvis puudub kultuuri kasv kohtades, kuhu satustid bakteriofaagi tilgad.

Bakteriofaagi tiitrimine vedelsöötmes.

Pipeteeritakse steriilselt 10 katsutisse 4,5 ml lihapeptonpulgongit. Esimesse katsutisse lisatakse 0,5 ml uuritavat bakteriofaagi (näit. *Shigella flexneri* bakteriofaag). Edasi pipeteeritakse esimesest katsutist teise 0,5 ml vedelikku, teisest kolmandasse 0,5 ml vedelikku jne. kuni 9-nda katsutini, millest võetud 0,5 ml vedelikku ei kanta üle 10-ndasse katsutisse, vaid heidetakse kõrvale. Selliselt saadakse katsutite rida, milles iga järgnev katsuti sisaldab eelnevast 10 korda vähem bakteriofaagi (10^{-1} - 10^{-9}). Viimane katsuti ei sisalda üldse bakteriofaagi ja on kontrolliks.

Kõikidesse katsutitesse lisatakse üks tilk vastava mikroobi (*Shigella flexneri*) 24-tunnilist puljongkultuuri ja paigutatakse need 18-20 tunniks termostaati 37° C juures. Bakteriofaagi tiiter vastab bakteriofaagi lahjendusele viimases katsutis, milles sööde jäi täiesti läbipaistvaks, s.t. milles toimus veel täielik kultuuri lüüs.

MIKROOBIDE S- JA R- VORMID.

Mikroobide liigisisene muutlikkus võib avalduda disotsiatsioonis, mis põhiliselt ilmneb S- ja R- vormide esinemises. Nimetus S- vorm on tuletatud ingliskeelsest sõnast *s m o o t h* -sile, R- vorm aga ingliskeelsest sõnast *r o u g h* -kare. Vastavalt sellele nimetatakse S- vormi ka silevormiks ja R- vormi karevormiks.

Mikroobide S- ja R- vorme on võimalik eristada neid iseloomustavate tüüpiliste erinevuste põhjal:

1. S- vormid kasvavad tahketel söötmetel siledate niiskete läikivate korrapärase äärisega pesadena; R- vormide pesad on aga karedad, kuivad, tuhmid, korrapäratu äärisega.

2. Vedelsöötmeis tingivad S- vormid söötme ühtlase hägnemise, R- vormid aga kasvavad sademena.

3. Füsioloogilises keedusoolalahuses annavad S- vormid ühtlase püsiva, R- vormid aga teralise ebapüsiva suspensiooni.

4. S- vormid on R- vormidest biokeemiliselt aktiivsemad.

5. S- vormid on tavaliselt R- vormidest virulentsemad. Erandi selles suhtes moodustavad tuberkuloositekitajad (*Mycobacterium tuberculosis*), katkutekitajad (*Pasteurella pestis*), siberikatkutekitajad (*Bacillus anthracis*) ja mõningad streptokokid.

6. S- vorme fagotsüteeritakse halvemini kui R- vorme.

7. S- vormide tundlikkus bakteriofaagide suhtes ületab vastavate R- vormide tundlikkuse.

8. Mikroobide S- vorme isoleeritakse tavaliselt haiguse ägedas perioodis, R- vorme aga kroonilise haiguskuluga haigeilt.

9. S- vormide antigeenne struktuur on täiuslikum R- vormidega võrreldes.

M i k r o o b i d e H- ja O- v o r m i d .

Liigisisese muutlikkuse tulemusena võivad mikroobide liikuvad vormid kaotada oma viburid, s.t. liikuvuse. Mõnedel mikroobiliikidel on võimalik eristada liikuvaid vorme liikumatutest vormidest nende erineva kasvu tõttu tahkeil söötmeil. Need erinevused on eriti tüüpilised Genus *Proteus*'esse kuuluvatel mikroobidel: liikuvate vormide pesi ümbritseb õrn vine, mis võib vohada üle kogu söötme pinna; liikumatutel vormidel aga selline vine puudub. Liikuvaid vorme nimetatakse H- vormideks, liikumatuid O- vormideks. Need nimetused on tuletatud saksa-keelsetest sõnadest *H a u c h* (vine) H- vorm ja *o h n e* *H a u c h* (ilma vineta) O- vorm.

Mikroobide H- vorme on kõige parem eristada 0,8-1% agarit sisaldavall lihapeptonagarplaatidel, millel pesi ümbritsev vine vohab eriti intensiivselt.

MIKROOBIDE INVOLUTSIOONIVORMID.

Involutsioonivormide arenemine on samuti üheks mikroobi- de liigisisese muutlikkuse avalduseks. Mikroobide involutsioonivorme nimetatakse ka degeneratsioonivormideks. Nende arene- mine võib toimuda näiteks kultuuri vananedes söötmes kuhjuva- te toksiliste ainevahetusproduktide toimel. Selline involut- sioonivormide arenemine esineb sageli vibrioonidel, iseloomus- tudes mikroobirakkude suurenemise ja ümardumisega.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Demonstratsiooni korras tutvuda Buchneri katsega.
2. Sooritada *Escherichia coli* ja *Bacillus mesentericus*'e eri- nevat termoresistentsust näitav katse.
3. Määrata klooramiini fenoolikoefitsient *Staphylococcus au- reus*'e suhtes.
4. Määrata diagnostiliste ketastega *Staphylococcus aureus*'e, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*'e, *Sarcina lutea* ja *Pseudomonas aeruginosa* kultuuride penitsilliini-, strepto- mütsiini-, levomütsetiini- ja biomütsetiinitundlikkus.
5. Demonstratsiooni korras tutvuda bakteriofaagi lüütilise toimega vedelsöötmes.
6. Demonstratsiooni korras tutvuda bakteriofaagi lüütilise toimega tahkel söötmel.
7. Demonstratsiooni korras tutvuda *Salmonella typhi* (S- vorm) ja *Bacillus anthracis*'e (R- vorm) kasvuga lihapeptonaga- ril ja lihapeptonpulgongis.
8. Demonstratsiooni korras tutvuda *Proteus vulgaris*'e (H- vorm) kasvuga lihapeptonagaril.
9. Valmistada *Vibrio metschnikovi* noorest ja vanast kultuu- rist preparaadid, värvida need 1 min. 1:10 lahjendatud Ziehl'i karboolfuksiiniga ja uurida mikroskoobiliselt.

XII p r a k t i k u m.

T e e m a: I N F E K T S I O O N.

E e l m i s e p r a k t i k u m i t ö ö d e
l õ p e t a m i n e.

Temperatuuri toime mikroobidele.

Fenoolikoefitsiendi määramine.

Antibiootikumide bakteriostaatiline toime
mikroobidele.

Infektsiooni- ja immuunsusõpetus.

Infektsiooni ehk nakkuse all mõistetakse kõiki bioloogilisi protsesse tervikuna, mis kulgevad organismis patogeensete mikroobide organismi sattumisel ja seal paljunemisel. Nakkushaigus kujutab endast üht härmist infektsiooni arengust. Seega on nakkus tunduvalt laiem mõiste kui nakkushaigus. Haigusetekitajast sõltuvana iseloomustub nakkushaigus mitmesuguste kliiniliste sümptomidega, mis võivad olla erinevalt välja kujunenud ja esineda erinevates kombinatsioonides.

Immuunsuseks nimetatakse organismi vastuvõtmatust haigusetekitajale või mingisugusele organismile võõrale ainele. See vastuvõtmatumus on tagatud pärilikult saadud ja individuaalselt omandatud organismi enesekaitsemehhanismi kaudu, mis takistab mikroobide tungimist organismi ja nende paljunemist seal, samuti mikroobide poolt eritavate toksiliste ainete kahjustavat toimet.

Organismi enesekaitsemehhanismis on küllaltki suur osatähtsus antikehadel. Antikehade ühinemine antigeeniga kutsub

esile terve rea katsutis palja silmaga nähtavaid fenomeene - aglutinatsiooni, pretsipitatsiooni, lüüsi jne. Neid fenomeene nimetatakse immuunsusreaktsioonideks. Varem püüti mainitud reaktsioone seostada mitmesuguste erinevate antikehadega, mida vastavalt nimetati aglutiniinideks, pretsipitiinideks, lüsiinideks jne. Need terminid leiavad sageli tingimuslikku kasutamist ka tänapäeval, olgugi et praegu on tõestatud ühtse antikeha olemasolu. Antigeen kutsub esile organismis ühtse antikeha tekke. See antikeha võib põhjustada antigeeniga ühinedes mitmesuguseid reaktsioone vastavalt reaktsiooni tingimustele ja keskkonnale, milles toimub ühinemine.

Infektsiooni- ja immuunsusprotsesside laboratoorne uurimine hõlmab nii haigusetekitajate mõningate omaduste määramist kui ka organismi mitmesuguste reaktsioonide uurimist. Praktiliselt taotletakse sellega kõige sagedamini nelja eesmärki:

- 1) määrata uuritavast materjalist isoleeritud mikroobide patogeensed, virulentsed ja toksilised omadused,
- 2) seroloogiliselt diagnoosida nakkushaigusi,
- 3) hinnata organismi immuunsust,
- 4) leida võimalusi efektiivsete spetsiifiliste immuunseerumite ja vaktsiinide valmistamiseks nakkushaiguste profülaktika ja ravi otstarbel.

K a t s e l o o m a d j a n e n d e n a k a t a m i s v i i s i d .

Katseloomade nakatamist bioloogilise uurimismeetodina kasutatakse paljude infektsiooni- ja immuunsusalaste küsimuste lahendamisel. Pavalisteks katseloomadeks mikrobioloogia laboratooriumis on valged hiired, merisead ja küülikud, harvemini valged rotid, ahvid, kassid, koerad jt.

Katseloomi kasvatatakse ja hoitakse vivaariumis võrgustatud puu- või metallpuurides. Valgete hiirte tarvis võib kasutada ka klaasitatud puure või klaaspurke. Katseks on kõlblikud ainult täiesti terved hea toitumisega loomad. Selliste loomade olemasolu eeldab hästi valgustatud õhurikast

vivaariumi ühes seal valitseva korra ja puhtusega, samuti täisväärtuslikku ratsionaalset vitamiinirikast toitu.

Küllaldase järelkasvu kindlustamiseks paigutatakse valged hiired ja merisead puuridesse pesakonniiti. Valgete hiirte pesakond moodustatakse 10-12 emasloomast ja 1-2 isasloomast, merisigade oma aga 4-5 emasloomast ja ühest isasloomast. Küülikute paaritamiseks paigutatakse emasloom paariks päevaks isaslooma puuri.

Nakatamiseks valitud loomi jälgitakse ühe nädala vältel, kaalutakse neid ja mõõdetakse nende kehatemperatuuri. See võimaldab vältida haigete loomade sattumist katsesse. Katseloomade kehatemperatuuri mõõdetakse rektaalselt. Normaalne kehatemperatuur valgetel hiirtel on 37-39^o; merisigadel 37,8-39,5^o; küülikutel ja valgetel rottidel 38,5-39,5^o.

Vahetult enne nakatamist märgistatakse katseloomad. Selleks kasutatakse valgete hiirte ja rottide puhul Ziehli karboolfuksiini värvilahusega jäsemete värvimist (vasak eesmine, vasak tagumine jne.). Küülikuid ja merisigu on parem märgistada metallnumbritega, mis vajutatakse katseloomade kõrva.

Katseloomade nakatamist teostatakse põhiliselt süstalde ja nõeltega, mis eelnevalt steriliseeritakse keetmisel destilleeritud vees 20 minuti vältel. Katseloomade nakatamiseks mõeldud pooltahkest ja tahkest materjalist valmistatakse suspensioonid steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses. Suspensioone valmistatakse steriilsetes uhmrites, kusjuures uuritav materjal hõõrutakse algul ühtlaseks massiks ja siis lisatakse vähehaaval juurde füsioloogilist keedusoolalahust. Sitke materjali uhmerdamist kergendab steriilse kvartslüüva või klaasipuru lisamine. Ohumullide eemaldamisel süstlast asetatakse nõelale steriilne vatitups, et vältida mikroobe sisaldavate vedeliku pisipiiskade laialipritsumist.

Mikroobiliikide patogeensus on erinevate loomaliikide suhtes erinev. Suuresti sõltub eksperimentaalse nakatuse areng ja kulg nakatamisviisist, sageli ka katselooma soost ja vanusest. Need asjaolud sunnivad vastavalt uuritavale mikroobi liigile ja lahendatavale ülesandele valima katselooma, selle sugu, vanust, nakatamisviisi. Nii näiteks kasutatakse tati-

tõve (malleuse) tekitaja Actinobacillus mallei sedastamiseks uuritavas materjalis ainult isaste merisigade intraperitoneaalset nakatamisviisi. Tuberkuloosi bioloogilist diagnoosimist on aga võimalik teostada merisigadel, kasutades mõlemast soost loomade nakatamist mitmesuguste nakatamisviisidega.

Süstekoht tõeldakse eelnevalt etüülalkoholiga või joodiga.

Põhilisteks katseloomade nakatamisviisideks on perkutaanne, intrakutaanne, subkutaanne, intramuskulaarne, intraperitoneaalne, intravenoosne, intratserebraalne, peroraalne ja intranasaalne nakatamisviis.

Valgete hiirte nakatamist teostatakse tavaliselt ilma abiliseta, fikseerides katselooma vasemas käes. Selleks tõsetakse loom parema käega sabapidi puurist välja lauale, kus hiir ennast põgeneda püüdes pingule tõmbab. Nüüd haaratakse tal vasema käe põidla ja esimese sõrmega kõrvadest ja turjast, pööratakse seljaga vasema peopesa poole, tõmmatakse parema käega sabapidi jälle pingule ja fikseeritakse saba vasema käe 4., 5. sõrme ja peopesa vahele. Süstal võetakse vabasse paremasse kätte.

Merisigu ja küülikuid nakatatakse abilisega, kes fikseerib katselooma vajalikus asendis. Merisiga hoiab abiline parema käega esijäsemete kohalt, vasema käega aga tagajäsemeist. Küülikuid hoiab abiline käterätikusse mähituna süles või laual. Kasutatakse ka erilisi puukaste.

Nakatatud katseloomi hoitakse eraldi ruumides. Nendes ruumides valitsev režiim peab vältima haigusetkitajate leviku võimaluse loomalt loomale, samuti loomalt inimesele. Tarbekorral kaalutakse nakatatud katseloomi perioodiliselt ja mõõdetakse nende kehatemperatuuri.

Üksikute nakatamisviiside tehnika.

1. P e r k u t a a n n e n a k a t a m i n e. Perkutaansekä nakatamiseks epileeritakse (pärikarva) katselooma küljel umbes 2 x 2 cm alal karvad ja hõõrutakse uuritav materjal kas tervesse või skarifitseeritud nahasse. Materjali nahasse hõõrumiseks kasutatakse steriilset siledaotsalist

klaaspulka. Loom jääb fikseerituks materjali kuivamiseni nahal.

Perkutaanset nakatamisviisi kasutatakse praktiliselt näiteks katku diagnoosimisel, kui on tegemist materjaliga, mis peale arvatavate katkutekitajate (*Pasteurella pestis*) sisaldab suurel hulgal ka teisi mikroobe.

2. I n t r a k u t a a n n e n a k a t a m i n e. Intra-kutaanset nakatamist teostatakse samuti pärast karvade epi-leerimist. Nakatamiseks kasutatakse hästi peeni teravaid nõelu. Nõel viiakse nahasse peaaegu paralleelselt nahapinnale avausega ülespoole nii, et nõela lõikepind kumenduks läbi epidermise. Materjali intrakutaansel süstimisel tekib kubel. Süstitava materjali annus on 0,1-0,2 ml.

Intrakutaanset nakatamisviisi kasutatakse mikroobide toksiinide uurimisel, samuti mitmesuguste allergiliste naha-reaktsioonide teostamisel jne.

3. S u b k u t a a n n e n a k a t a m i n e. Subkutaanne nakatamine on üheks levinumaks katseloomade nakatamisviisiks, mida kasutatakse mitmesuguste nakkushaiguste (siberi katk, tulareemia, katk jne.) diagnoosimisel. Süstekeht võib olla erinev, kuid sobivamaks tuleb pidada kubemepiirkonda. Kui süstematerjal immitseb läbi süsteava tagasi, võib viimase sulgeda kollooidiumiga immutatud vatitupsuga. Selleks ots-tarbeks võib kasutada ka süsteava töötlemist leegil kuumuta-tud klaaspulgaga. Süstitava materjali annused: valgetel hiir-tel 0,2-0,5 ml, merisigadel 0,5-1 ml, küülikutel 1-2 ml.

4. I n t r a m u s k u l a a r n e n a k a t a m i n e. Intramuskulaarsel nakatamisel süstitakse materjal tavaliselt tagajäseme lihastesse. Süstitava materjali annused: valgetel hiirtel 0,25 ml, merisigadel 2 ml, küülikutel 5 ml.

Intramuskulaarset nakatamisviisi kasutatakse ainult eri-listel näidustustel, näiteks anaeroobsete mikroobide uurimi-sel.

5. I n t r a p e r i t o n e a a l n e n a k a t a m i n e. Intraperitoneaalsel nakatamisel tuleb hoiduda vi-gastamast katseloomade kõhuõõneelundeid. Selleks hoitakse loomi süstimisel vertikaalselt peaga allapoole, mille tule-musena kõhuõõneelundid vajuvad diafragmale. Nakatamist teos-

tatakse teravate, kuid lühikese lõikepinnaga nõeltega. Süstekohaks on keskjoonest veidi külgmises kõhu alumine osa. Nahk läbitakse teravnurga, lihased aga täisnurga all. Nõela kõhude nõeltega sattumisel on tunne, nagu oleks nõel vajunud tühjusse. Süstitava materjali annused: valgetel hiirtel kuni 1 ml, merisigadel kuni 5 ml, küülikutel kuni 10 ml.

Intraperitonaalset nakatamisviisi kasutatakse näiteks botulismi, malleuse, mitmesuguste rikketsiooside jt. nakkushaiguste diagnoosimisel.

6. I n t r a v e n o o s n e n a k a t a m i n e. Intravenoosselt nakatatakse valgeid hiiri ja küülikuid, merisigadel viiakse aga tarbekorral uuritav materjal vahetult südameõõnde. Hiirtel teostatakse veenisiseseid süsteid sabaveeni, küülikutel kõrva ääreveeni, mis asub kõrva pindmisel serval. Sabaveeni süstimisel paigutatakse hiir eelnevalt 5-10 minutiks termostaati 37° C juures, mis soodustab veenide täitumist. Edasi paigutatakse katseloom metallkarpi, mille põhjas või küljes on avaus. Selle avause kaudu võetakse hiire saba karbist välja ja surutakse sabajuure kohal pintsetiga kinni (pintseti harudele on tõmmatud kummivooliku tükid). Nüüd fikseerib süstija katselooma saba otsmise kolmandiku vasaku käe põidla ning esimese sõrme vahele, hõõrub seda ksülooliga immutatud vatitupsuga ja viib siis nõela veeni paralleelselt nahapinnale, abilise aga eemaldab pintseti sabajuurelt. Kui nõel on veenis, väljub vedelik süstlast juba kerge survega; kui nõel pole veenis, nõuab süstimine jõudu, kusjuures saba osa ülevalpool süstekohta tursub ja läheb valgeks. Hiirte intravenoosseks nakatamiseks sobivad peened teravad, kuid lühikese lõikepinnaga nõelad.

Küüliku intravenoossel nakatumisel surub abilise kõrva ääreveeni kõrvajuure kohal käega kinni. Venoosse paisu suurenendamiseks võib hõõruda kõrva kuuma veega immutatud vatitupsuga. Kui on tegemist väga halva veeniga, võib kõrvanahka hõõruda ka ksülooliga. Süstija võtab kõrva otsmise kolmandiku vasaku käe põidla ja esimese sõrme vahele ja viib nõela veeni paralleelselt nahapinnale, abilise aga laseb kõrvaveeni lahti.

Süstitava materjali annused: valgetel hiirtel kuni 1 ml, küülikutel kuni 5 ml.

Intravenoosset nakatamisviisi kasutatakse eksperimentaalse tuberkuloosi uurimisel, samuti botulismi toksini sedastamisel, küülikute immuniseerimisel jne.

Merisigade nakatamisel südamesse on katselooma mugavam fikseerida jäsemeist vastava laua külge seljaga allapoole, kuid teda võib ka käes hoida. Süstija leiab palpatoorselt südame tiputõuke koha, mis tavaliselt asub 1 cm mõõkjätkest ülalpool vasemas roidevahemikus. Nõel viiakse südamesse tiputõuke kohal. Kui nõel on sattunud südameõnde, tuleb süstlasse verd juba kergel aspiratsioonil. Materjali tuleb süstida südamesse aeglaselt. Süstitava materjali annus on kuni 2 ml. Täpselt sama meetodikat kasutatakse ka vere võtmiseks südamest.

7. I n t r a t s e r e b r a a l n e n a k a t a m i n e. Intratserebraalset nakatamisviisi kasutatakse kõige sagedamini mitmesuguste viiruste isoleerimiseks valgetel hiirtel. Nakatamiseks võetakse noored katseloomad kaaluga 10-12 g, kelle koljuluudevahelised sutuurid pole veel lõplikult lubjastunud. Vasaku käe pöidla ja esimese sõrmega haaratakse hiirel kõrvust ja turjast nii, et looma pea jääks lamama vasaku käe teisele sõrmele parema poolega ülespoole. Süstekohaks on silma tagumist nurka ja välist kuulmekäiku ühendava sirge keskpunkt. Koljuluu läbistamise järel on tunne, nagu vajuks nõel tühjusse.

Intratserebraalset nakatamist on kõige parem teostada nn. tuberkuliinsüstla ja terava, kuid lühikesel lõikepinnaga nõelaga. Süstitava materjali annus on kuni 0,05 ml.

8. P e r o r a a l n e n a k a t a m i n e. Peroraalsel nakatamisel võib materjali segada katseloomade toidu hulka. Kui on aga tarvis nakatada katseloomi teatud kindlate materjaliannustega, tuleb need viia vahetult seedetrakti. Valgetel hiirtel kasutatakse selleks tavaliselt L- tähe kujulisi klaaskanütle, mis ühendatakse süstlaga võimalikult lühikesel kummi-vooliku abil. Klaaskanüüli ots viiakse hiirele keelepärale, mis võimaldab viia uuritavat materjali doseeritult söögitorusse. Manustatava materjali annus valgetel hiirtel on 0,1-0,2 ml.

Nii valgetel hiirtel kui ka teistel katseloomadel võib kasutada peroraalseks nakatamiseks mitmesugusest materjalist valmistatud vastavaid sonde.

Peroraalset nakatamisviisi kasutatakse näiteks toidutoksikoinfektsioonide diagnoosimisel.

9. I n t r a n a s a a l n e n a k a t a m i n e. Intranasaalseks nakatamiseks kasutatakse eeternarkoosis olevaid katseloomi, tilgutades neile uuritavat materjali ninasõõrmeisse. Seejuures tuleb silmas pidada, et liiga sügava narkoosi puhul muutub katselooma hingamine pindmiseks, mis takistab uuritava materjali aspireerimist. Kui narkoos pole aga küllaldaselt sügav, turtsub katseloom uuritava materjali lihtsalt välja. Nakatamisel hoitakse katseloomi vertikaalasendis. Manustatava materjali annused: valgetel hiirtel 0,03-0,05 ml, merisigadel ja küülikutel kuni 2 ml.

Intranasaalset nakatamisviisi kasutatakse mitmesuguste viiruslike nakkushaiguste ja rikketsiooside diagnoosimisel.

U u r i t a v a m a t e r j a l i v ö t m i n e
j a u u r i m i s e k s s a a t m i n e .

Põhinõuded uuritava materjali võtmisel ja mikrobioloogia laboratooriumi saatmisel.

Uuritav materjal võetakse ja saadetakse mikrobioloogia laboratooriumi uurimiseks väga mitmesugustel eesmärkidel. Neist sagedasemad on:

1. Nakkushaiguste mikrobioloogiline diagnoosimine.
2. Mikroobide ravimresistentsuse määramine.
3. Bakterikandjate avastamine.
4. Sidematerjali ja ravimite steriilsuse kontroll.
5. Vee- ja toiduainete sanitaar-mikrobioloogiline kontroll.

Vaatomata uuritavale materjalile ja uurimise eesmärgile, on olemas terve rida põhinõudeid, mis tuleb täita materjali võtmisel ja mikrobioloogia laboratooriumi uurimiseks saatmisel. Nende põhinõuete kohaselt:

1. Materjal võetakse steriilsete vahenditega (süstlad ja nõelad, pintsetid, skalpellid, vatt-tampoonid, pipetid, lusikad jne.)

2. Materjal saadetakse laboratooriumi steriilsetes suletud katsutites, kolbides, pudelites, purkides jne., mille pakkimisviis peab vältima ka klaasesemete purunemisel mikroobide levikuvõimaluse.

3. Materjali võtmiseks ja saatmiseks vajalikke esemeid ei tohi töödelda desinfitseerivate vahenditega.

4. Uurimiseks saadetakse valikuliselt just see materjal, mis peab sisaldama kõige enam võimalikke eluvõimelisi haiguse-tekitaajaid. Näiteks tuleb võtta verd kõhutüüfuse tekitaja Salmonella typhi isoleerimiseks võimalikult esimestel haiguspäevadel, düsenteeriahaige roojast valida limatombukesi jne.

5. Uurimismaterjalis tuleb kindlustada haigusetekitajale optimaalsed säilimistingimused. Selleks saadetakse näiteks materjal laboratooriumi mitmesugustes konservantides, seljaajuvedelik soojalt pakituna jne.

6. Materjali saatmine uurimiseks peab toimuma vahetult pärast selle võtmist.

Mainitud põhinõuete eesmärgiks on vältida väliskeskkonnas esinevate mikroobide sattumist uuritavasse materjali, uuritavas materjalis leiduvate võimalike haigusetekitajate hävimist ja nende levikut väliskeskkonda.

S a a t e k i r j a k o o s t a m i n e .

Iga mikrobioloogia laboratooriumi uurimiseks saadetakse materjal tuleb varustada saatekirjaga. Kui materjal on võetud haigelt, siis märgitakse saatekirjas:

1. Haige perekonna-, ees- ja isanimi.
2. Haige vanus.
3. Uuritav materjal ja soovitud uurimise eesmärk.
4. Haige kliiniline diagnoos.
5. Haigestumise kuupäev.
6. Materjali võtmise kuupäev.
7. Raviasutus.

Epidemioloogiliselt seotud haigestumiste puhul tuleb saatekirjas märkida ka lühike epidemioloogiline anamnees.

Materjali saatmisel bakterikandjate avastamiseks märgitakse saatekirjas, kas uuritav on varem põdenud vastavat nakushaigust ja millises asutuses või ettevõttes ning kellena töötab.

Sidematerjali ja ravimite saatekirjas tuleb märkida materjali steriliseerimise kuupäev.

Vee saatmisel uurimiseks kirjeldatakse lühidalt veeallikat ja selle kasutamisetarvet. Toiduainete saatekiri peab sisaldama andmeid, mis seletaksid mikrobioloogilise uurimise vajadust, vastava toiduaine hulka, selle säilitamis- ja realiseerimisvõimalusi.

Kõikidel uuritava materjali saatekirjadel peab olema vastav kuupäev ja saatja arsti allkiri.

U u r i t a v a m a t e r j a l i v õ t m i n e
h a i g e l t j a s a a t m i n e m i k r o -
b i o l o o g i a l a b o r a t o o r i u m i .

Haigelt mikrobioloogiliseks uurimiseks võetavaks materjaliks võib olla veri, uriin, roe, kurgu- ja ninalima, seljaajuvedelik, nahaketud ja juuksekarvad, mäda jne. Peale vastavate üldiste põhinõuete tuleb sageli iga materjali võtmisel ja laboratooriumi uurimiseks saatmisel täita ka rida nõudeid, mis on iseloomulikud just antud materjalile ja selle uurimiseesmärgile.

V e r i. Verd võib võtta mikroskoobiliseks, bakterio-
loogiliseks, bioloogiliseks ja seroloogiliseks uurimiseks.

Mikroskoobiliseks uurimiseks võetakse verd sõrmest, lastel ka kannast või kõrvanibust, kasutades selleks Francki nõela. Sobivaim aeg on keha temperatuuri tõusuperiood, mil haigusetekitajaid leidub veres tavaliselt kõige enam. Haigevoodi juures valmistatakse ägepreparaadid, tarbekorral ka preparaadid paksutilgameetodil. Viimasel juhul lihtsalt puudutatakse esemeklaasiga paar korda veritsevat sõrme (kanda, kõrvanibu) ja lastakse veretilkaudel kuivada.

Kõige parem on saata laboratooriumi fikseerimata prepa-

raadid. Fikseeritud preparaate saamiseks tuleb saatekirjas märkida tarvitatud fikseerimismeetod.

Bakterioloogiliseks ja bioloogiliseks uurimiseks võetakse verd kubitaalveenist steriilse süstla ja nõelaga, püüdes seda samuti teha temperatuuri tõusuperioodil. Verékülve on kõige parem teostada vahetult haigevoodi juures. Kui vastavad võimalused aga puuduvad, saadetakse laboratooriumi defibrineeritud veri või tsitraatveri. Defibrineerimiseks võetakse veri steriilsesse klaashelmeid või klaasikilde sisaldavasse kolvi ja loksutatakse 8-10 minuti vältel. Tsitraatvere saamiseks võetakse veri katsutisse, mis sisaldab 1,2 ml steriilset 5%-list naatriumtsitraadilahust 10 ml vere kohta. Naatriumtsitraadilahus võib olla ka süstlas. Bakterioloogiliseks uurimiseks võetakse verd 10-20 ml, millest piisab ka bioloogiliseks uurimiseks.

Seroloogiliseks uurimiseks võetakse verd katsutisse samuti kubitaalveenist steriilse süstla ja nõelaga. Vere võtmine peab toimuma enne sööki. Peale sööki saadakse sageli piimjat seerumit, mis pärssib immuunsusreaktsioonide kulgu. Immuunsusreaktsioonidele pärssivalt mõjub ka hemolüütiline seerum. Hemolüüsi ärahoidmiseks tuleb verd võtta aeglaselt jahtunud kuiva süstlaga, vältides seejuures vahu teket. Ka süstlast katsutisse lastakse veri aeglaselt mööda katsuti seinu. Kui mikrobioloogia laboratoorium asub kaugel, võib verd seroloogiliseks uurimiseks saata postiga kuivanud tilkadena filter- või vahapaberil. Seroloogiliseks diagnoosimiseks tuleb verd saata korduvalt, et jälgida antikehade tiitri dünaamikat haiguse vältel. Seroloogiliseks uurimiseks võetakse tavaliselt 5-7 ml verd.

U r i i n. Uriini mikrobioloogiliseks uurimiseks võetakse hommikul. Meestel tohib kasutada urineerimisel saadud uriini, naistel aga tuleb võtta uriini steriilse kateetriga. Mitmesuguste neeruhaiguste diagnoosimisel (näiteks neerutuberkuloos) osutub tarvilikuks uurida eraldi mõlema neeru uriini. Selleks võetakse uriini ureetritest nende kateeteriseerimisel. Katsuteid parema ja vasema neeru uriiniga tuleb hoolikalt märgistada. Haigusprotsessi lokaliseerumisel

ühte neeru kuulub viimane sageli operatiivsele eemaldamisele. Võimaliku laboratoorse eksituse korral võib aga eemaldada just terve neeru, mis võib põhjustada haige surma. Mikrobioloogiliseks uurimiseks võetakse uriini tavaliselt 10-15 ml.

R o e. Rooja võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks defekatsioonil või vahetult parasoolest rektaaltampoonidega, klaastorukestega, plastmassist pulkadega jne. Külve on kõige parem teostada vahetult haigevoodi juures. Vastavate võimaluste puudumisel saadetakse roe (samuti rektaaltampoonid, klaastorukesed jne.) laboratooriumi mitmesuguste konservantidega katsuteis. Kui roe sisaldab limatombukesi, milles haigusetekitajaid leidub tavaliselt kõige enam, saadetakse uurimiseks just neid. Rooja saatmiseks laboratooriumi on kõige paremad spetsiaalsed tavalise korgi ja väikese metall-lusikakesega varustatud katsutid, mis asetatakse vastavatesse metall- ja puuümbristesse. Saadetava rooja hulk on 1-2 g.

K u r g u- ja n i n a l i m a. Kurgu- ja ninalima võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks steriilsetesse katsutitesse monteeritud vatt-tampoonidega. Vajaduse korral kasutatakse kurgulima võtmisel spaatlit, millega surutakse alla keelepära. Kui kurgus on näha katte, tuleb uurimiseks võtta esmajoones just neid. Mingil juhul ei tohi kurgulima võtta peale kuristamist desinfitseerivate vahenditega või kurgu töötlemist antibiootikumidega.

S e l j a a j u v e d e l i k. Seljaajuvedelikku võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks steriilsesse katsutisse lumbaalpunksioonil. Laboratooriumi saatmisel tuleb katsuti soojalt sisse pakkida, et kaitsta temperatuuri kõikumistele tundlikke meningokokke. Vältida tuleb ka katsuti loksutamist, mis võib takistada tuberkuloosse meningiidi diagnoosimisel tähtsust omava "ämblikuvõrgu" teket. Seljaajuvedelikku võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks 8-10 ml.

N a h a k e t u d ja j u u k s e k a r v a d. Nahakette ja juuksekarvu võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks pintsetiga, valides esmajoones kahjustatud juuksekarvu. Nahakette ja juuksekarvu on kõige parem saata laboratooriumi kahe esemeklaasi vahel.

M ä d a. Mäda võetakse mikrobioloogiliseks uurimiseks steriilsesse katsutisse mädakollete avamisel või punktsioonil, samuti juba avanenud mädakoldeist. Mäda tuleb võtta elusa ja nekrootilise koe piirilt, kus elujõulisi mikroobe leidub kõige enam. Kui mäda on vähe, võib seda võtta steriilse vatt-tampooniga.

M ä d a m i k r o s k o o b i l i n e u u r i m i n e .

Mäda on üheks haigelt võetavaks uurimismaterjaliks, mille teke võib olla tingitud väga mitmesugustest mikroobidest: kokkidest, bakteritest, tuberkuloositekitajatest (*Mycobacterium tuberculosis*), kiirikseentest jne. Kuna ravi erinevate mikroobiliikide puhul on erinev, on mädatekitajate määramisel suur tähtsus.

Mäda uuritakse nii mikroskoobiliselt kui ka bakteriooloogiliselt. Bakterioloogilist mäda uurimist käsitletakse erimikrobioloogia kursuse praktikumides, siinkohal aga puudutatakse vaid lühidalt mäda mikroskoobilist uurimist haigelt võetava materjali mikrobioloogilise uurimise näitena.

Mikroskoobiliseks mäda uurimiseks tuleb valmistada kaks preparaati, värvides neist ühe Grami, teise Ziehl-Neelsen'i järgi. Küllalt vedelast mädast valmistatakse preparaadid külviaasaga, paks sitke materjal aga tõmmatakse laiali kahe esemeklaasi vahel (nagu rõga korral).

Mädatekitajast võib anda teatud ettekujutuse ka mäda iseloom. Nii näiteks on *Pseudomonas aeruginosa*'le iseloomulik sinakasroheline värske puuvilja lõhnaga mäda, kiirikseente puhul võib mädas täheldada nõõpnõelapeasuursi teri (druusid), *Proteus vulgaris*'e poolt tingitud mäda on sageli pruunja värvusega ning võika lõhnaga jne.

M i k r o o b i d e t o k s i i n i d .

Mõned patogeensed mikroobiliigid valmistavad spetsiifilisi toksine e. mürkaineid, mis inimese või looma organismi sattudes kutsuvad esile iseloomulikke kahjustusi nende

elundeis või kudedes. Mikroobide toksine liigitatakse ekso-
toksiinideks ja endotoksiinideks.

Ekstoksiine eritavad mikroobirakud neid ümbritsevasse
keskkonda, säilitades ise seejuures oma eluvõime. Endotoksiinid
on vahetult seotud mikroobiraku protoplasmaga ja vabanevad
ainult surnud mikroobide lagunemisel. Ekstoksiini valmistavad
difteeria tekitaja *Corynebacterium diphtheriae*, teetanuse
e. kangestuskramptõve tekitaja *Clostridium tetani*, botulismi
tekitaja *Clostridium botulinum* jt. Endotoksiini valmistavad
Escherichia coli, kõhutüüfuse tekitaja *Salmonella typhi*,
koolera tekitaja *Vibrio comma*, katku tekitaja *Pasteurella pestis* jt.

Võrreldes endotoksiinidega, on ekstoksiinid tunduvalt
toksilisemad, termolabiilsemad ja lihtsama keemilise struktuuriga.
Vastandina endotoksiinidele avaldavad nad valikulist kahjustavat
toimet teatud kindlaile organismi elundeile ning kudedele ja seda
vaid lõimetusjärgu möödudes, kutsuvad organismis esile neid
neutraliseerivate spetsiifiliste antitoksiinide tekke ja võivad
muutuda anatoksiinideks e. toksoidideks, kaotades toksilisuse ning
säilitades antigeensed omadused.

Toksiini toimivust hinnatakse minimaalse surmava annuse
e. dosis letalis minima e. lühendatult Dlm järgi. Toksiini
Dlm-ks nimetatakse vähimat toksini annust, mis teatud aja
vältel surmab kindla kaaluga katselooma. Nii näiteks nimetatakse
Corynebacterium diphtheriae ekstoksiini Dlm-ks seda vähimat
toksiini annust, mis süstituna naha alla surmab 250 g raskuse
merisea 96 tunni vältel.

Clostridium tetani ekstoksiini Dlm määramine.

1. Valmistatakse steriilselt füsioloogilise keedusoola lahusega
1:1000 lahjendatud toksini alglahus.

2. Pipeteeritakse nelja katsutisse steriilselt 1 ml füsioloogilise
keedusoola lahust. Esimesse katsutisse lisatakse 1 ml toksini
alglahust. Sellest katsutist viiakse pärast loksutamist teise
katsutisse üle 1 ml vedelikku, edasi teisest katsutist kolmandasse
ja kolmandast katsutist neljandasse

pärast loksutamist samuti 1 ml vedelikku. Iga katsuti tarvis võetakse uus pipett. Nii saadakse toksiini lahjendused 1:2000, 1:4000, 1:8000 ja 1:16000.

3. Hiirtele süstitakse tagajäseme reielihastesse 0,2 ml toksiini lahjendusi. Kui töötatakse ühe süstlaga, süstitakse algul suuremaid, siis väiksemaid lahjendusi.

Õöpäeva möödudes hakkavad katseloomadel ilmnema esimesed teetanuse nähud: spastilised sabalihaste ja süstekohale kõige lähemate lihasgruppide kontraktuurid, mis algul levivad teistele sama kehapoole, hiljem aga ka vastaspoole lihasele. Areneb nn. "astsendeeruv teetanus", mis põhjustab katselooma surma 2-3 ööpäeva vältel.

Toksiini Dlm-ks on toksiini suurim lahjendus, mis veel tingis katseloomade surma.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Registreerida *Escherichia coli* ja *Bacillus mesentericus*'e erinevat termoresistentsust näitava katse tulemused.
2. Arvutada klooramiini fenoolikoefitsient *Staphylococcus aureus*'e suhtes.
3. Hinnata diagnostiliste ketastega määratud *Staphylococcus aureus*'e, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*'e, *Sarcina lutea* ja *Pseudomonas aeruginosa* kultuuride penitsilliin-, streptomütsiin-, levomütsetiin- ja biomütsiintundlikkuse määramise tulemusi.
4. Tutvuda vivaariumiga.
5. Nakatada katseloomi *Klebsiella pneumoniae* puljongkultuuri-ga, kasutades selleks mitmesuguseid nakatamisviise.
6. Koostada saatekiri mikrobioloogia laboratooriumi saadeta-vale uurimismaterjalile.
7. Teostada mäda mikroskoobiline uuring.

XIII p r a k t i k u m .

T e e m a : I M M U U N S U S R E A K T S I O O N I D .

K a t s e l o o m a d e l a h k a m i n e
j a m i k r o b i o l o o g i l i n e u u r i m i n e .

Katseloomade lahkamise eesmärgiks on elundite makroskoopilise ja mikroskoopilise leiu, samuti elundkõlvide varal selgitada, milline mikroobiliik leidus loomale süstitud materjalis, millist toimet avaldab uuritav mikroobiliik katseloomale jne.

Nakatatud katselooma lahkamisel ja mikrobioloogilisel uurimisel tuleb täita teatud põhinõudeid. Nende põhinõuete kohaselt:

1. Nakatatud katseloom lahatakse ja mikrobioloogiliselt uuritakse võimalikult kiiresti pärast surma või surmamist. Lahanguni säilitatakse laip külmas.
2. Lahangut, samuti lahangumaterjali külve ning preparaate tehakse steriilsetes tingimustes.
3. Lahangumaterjalisse ei tohi enne külve sattuda desinfitseerivaid vahendeid.
4. Laiba jäänused kahjutustatakse. Parimaks kahjutustamisviisiks on põletamine. Võib kasutada ka desinfitseerivaid vahendeid ja kuumutamist autoklaavis.
5. Makroskoopiline lahanguleid, samuti mikrobioloogilise uurimise tulemused protokollitakse.
6. Nakatatud katselooma lahkamisel ja lahangumaterjali uurimisel tuleb vältida igasugust haigusetekitajate levikuvõimalust.

Nakatatud katselooma lahkamise põhinõuded on kehtivad ka koolnute lahkamisel ja mikrobioloogilisel uurimisel.

Lahkamisele kuuluvad nii pärast nakatamist ise surnud kui ka teatud aja möödudes surmatud katseloomad. Valgeid hiiri ja merisigu surmatakse tavaliselt eetriga või kloroformiga, küülikutele süstitakse kõrvaveeni 10-20 ml õhku. Tarbekorral võib valgeid hiiri dekapiteerida teravate kääridega. Parempoolne on surmata katseloomi tüüpilise kliinilise pildi arenedes, mitte aga nende surma ootama jäädes.

Mikrobioloogiliseks uurimiseks võetakse lahangu materjali mitmesuguseist elundeist ja kudetest. Alati tuleb algul teha külvid, siis võtta materjali varuks steriilsetesse Petri tassidesse ja lõpuks valmistada äige- või puutepreparaadid.

Tahketele söötmetele tehakse külv külviaasaga, vedelsöötmetesse viiakse pintsetiga väikesed elunditükikesed. Vastavatel näidustustel valmistatakse üksikelundeist suspensioonid uhmrites steriilse füsioloogilise keedusoola lahusega, mis siis külvatakse söötmetele või uuritakse mikroskoobiliselt. Söötmete valik sõltub uuritavast materjalist ja arvatavast haigussetekitajast.

Äigepreparaadi valmistamisel hõõrutakse pintsetiga fikseeritud elundi või koetükikese lõikepind vastu esemeklaasi. Puutepreparaadi valmistamisel võetakse elundi- või koetükike pintsetiga, kuid preparaadi saamiseks puudutatakse lõikepinda ainult ettevaatlikult esemeklaasiga. Puutepreparaat annab teatud ettekujutuse nii koestruktuurist kui ka mikroobide paigutamisest kudedes.

Lahanguinstrumendid (mitmesuguses suuruses käärid, pintsetid, veresoonesulgurid jne.) steriiliseeritakse keetmisel lestilleeritud vees 20 minuti vältel ja tuuakse lahangule etüülalkoholiga täidetud keeduklaasis. Lahangu käigus enne tarvitamist, samuti iga üksikmanipulatsiooni järel steriiliseeritakse instrumendid veel leegis, kastes neid enne alkoholi. Koejäänuste kõrvaldamiseks instrumentidelt on otstarbekohane neid enne alkoholi kastmist veega immutatud vatitükist läbi tõmmata.

Lahangu hõlbustamiseks kinnitatakse laialisirutatud

laip steriilse paberiga kaetud alusele. Tavaliselt kasutatakse alusena valgete hiirte puhul kork- või puulauakesi, merisigade ja küülikute lahkamisel aga erilisi operatsioonilaudu. Viimaseid võib asendada ka vastava suurusega lauakestega, mille servadesse on löödud naelad. Rinna- ja kõhuõõne avamiseks kinnitatakse loomad kõhuga, koljuõõne avamiseks aga seljaga ülespoole. Hiirte kinnitamiseks kasutatakse nõõpnõelu, torgates need läbi jäsemete. Suuremad katseloomad seotakse jäsẽmeidpidi operatsioonilaua külge. Lauakesed koos neile kinnitatud katseloomadega asetatakse lahanguks küvetti, mille põhjas on desinfitseerivat vedelikku (5%-line lüsool, 3%-line klooramiin jne.).

Enne lahkamist teostatakse laiba välisvaatlus, märkides esinevad muutused, siis niisutatakse katselooma karvakate korralikult 5%-lise lüsooliga (või mõne muu desinfitseeriva vahendiga).

Lahangut alustatakse rindkere avamisega, siis avatakse kõhuõõs ja vastavate näidustuste juures ka kolju. Kääridega tehakse nahalõik alalõuast sümfüüsini ning edasi lõiked jäsemeteni ja prepareeritakse nahk kõrvale (mitte vigastada musklikudet!). Nahaaluses sidekoos võib täheldada veresoonte laiendamist, verevalumeid, turset, lümfisõlmede suurenemist jne. Kui lümfisõlmed on suurenenud või sisaldavad mädã, tehakse neist külvid ja preparaadid.

Edasi töödeldakse nõõlitud katseloom alkoholiga ja avatakse rindkere. Selleks võetakse pintsetiga kinni mõõkjätkest ja tehakse selle alla väike sisselõige. Sisselõikesse viiakse kääride üks haru ja lõigatakse läbi kõhumuskliid, minnes möõda roidekaart algul ühele, siis teisele poole. Roided lõigatakse läbi, tehes kääridega kaks lõiget mõõlemalt poolt rindkere looma alalõua suunas ja heidetakse saadud kolmnurkne rindkere eesmise seina osa kõrvale.

Avatud rinnaõõnes registreeritakse võimalik vedelik, põõratakse tähelepanu südame ja kopsude pindmisele makroskoopilisele leiule. Pintsetiga fikseeritakse südame kodadepoolne osa, kääridega lõigatakse ära südametipp ja südameõõnest võetakse verd uurimiseks Pasteuri pipetiga (hiirel võib seda

teha ka küviaasaga). Järgnevalt lõigatakse kopsud rindkerest välja.

Avanud kõhuõõne lõikega sümfüüsini, pööratakse tähelepanu vedeliku olemasolule, kõhukelme ja kõhuõõneelundite makroskoopilisele leiule. Tavaliselt võetakse uurimiseks materjali maksast ja põrnast. Tähtis on ka nende elundite suurus ja neis nähtavad võimalikud haiguskolded. Neerud kuuluvad uurimisele vaid vastava näidustuse puhul.

Koljuõõne avamine osutub kõige sagedamini tarvilikuks valgetel hiirtel mitmesuguste neuroviiruste uurimisel. Katseloom fikseeritakse seljaga ülespoole. Pea ja kaela karvakate niisutatakse alkoholiga ja kõrvetatakse. Katselooma pea fikseeritakse kaela kohal vasakus käes hoitava pintsetiga ja lõigatakse kääridega ära kõrvad ühes koljut katva nahaga. Koljuluud töödeldakse alkoholiga. Väikeste teravate kääride üks haru viiakse koljuõõnde läbi parema kuulmekäigu ja ringikujulise lõikega eemaldatakse koljulagi. Mõlemad harud koos, viiakse käärid peaaegu alla tagant ette ja, lõiganud läbi seljaaju, tõstetakse peaaegu välja.

Pärast lahanguit steriliseeritakse lahanguinstrumendid keetmisel destilleeritud vees 20 minuti vältel, puhastatakse ja kuivatatakse. Laiba jäänused kahjutustatakse.

F a g o t s ü t o o s .

Fagotsütoosil on organismi enesekaitsemehhanismis suur osatähtsus ja seda esmajoones just bakteriaalsete nakkuste puhul. Sisuliselt kujutab fagotsütoos endast mittespetsiifilist protsessi. Spetsiifilised opsoniinid ja bakteriotropiinid aga soodustavad valikuliselt vastavate bakterite fagotsütoosi, andes protsessile spetsiifilise iseloomu.

Laboratoorselt võib fagotsütoosi uurida nii in vivo kui ka in vitro.

Fagotsütoosi uurimine in vivo.

Fagotsütoosi in vivo uuritakse sageli valgete hiirte kõhuõõnes. Selleks:

1. Katselooma kõhuõõnde süstitakse 2 ml steriilset liha-peptoonpuljongit. Tänu leukotsüütide positiivsele kemotaksi- sele peptooni suhtes koguneb neid suurel hulgal kõhukelmevede- likku.

2. 2-4 tunni pärast süstitakse kõhuõõnde 0,5-1 ml tihe- dat uuritava mikroobi suspensiooni füsioloogilises keedusoola lahuses.

3. Kõhuõõnest aspireeritakse süstlaga eksudaat äigepre- paraatide valmistamiseks 10-15 minutit pärast mikroobide kultuuride süstimist. Kui tahetakse uurida fagotsütoosi dünaa- mikas, korratatakse eksudaadi võtmist teatud ajavahemike järel.

Eksudaadi saamiseks viiakse nõel kõhuõõnde, hoides hiirt pea allapoole. Siis surutakse nõel vastu kõhukoopa seina ja pidevalt aspireerides pööratakse hiir jälle peaga ülespoole. Äigepreparaatide valmistamiseks hõõrutakse materjal kas otse nõelaga või külviaasaga esemeklaasidele laiali.

4. Leegil ettevaatlikult fikseeritud preparaati värvitakse paar sekundit Löffleri metüleensinisega.

Preparaadi mikroskoobilisel uurimisel on näha suurel hul- gal leukotsüüte, mille tuumad on värvunud tume-, protoplasma aga helesiniseks. Protoplasmas paigutuvad siniselt värvunud mikroobirakud. Kohati on leukotsüüdid mikroobirakke lausa täis kiilunud.

Kui uuritakse *Mycobacterium tuberculosis*'e fagotsütoosi, värvitakse preparaadid Ziehl-Neelseni järgi. Sel juhul on fa- gotsüütide helesinises protoplasmas kontrastselt näha puna- seid mikroobirakke. Fagotsüteerimata mikroobirakkude konglo- meraate ümbritsevad suurel hulgal leukotsüüdid. See pilt meenu- tab punase tuumikuga siniseid rosette.

Fagotsütoosi hindamiseks loetakse fagotsüteeritud mikroo- bide hulk sajas leukotsüüdis. Jagades saadud arvu sajale, saa- dakse fagotsütaarnäitaja.

Fagotsütoosi uurimine in vitro.

Fagotsütoosi in vitro uuritakse kas katsuteis või Pas- teuri pipettides, mis sisaldavad vastavat mikroobide suspen- siooni ja leukotsüüte. Enne preparaatide valmistamist hoitakse

se mikroobide suspensiooni koos leukotsüütidega teatud aeg termostaadis.

Fagotsütoosi uurimist in vitro kasutatakse mitmesuguste nakkushaiguste diagnoosimisel, määrates nn. opsoniin - fagotsütaarindeksi. Selle määramiseks võetakse ühte katsutisse uuritava haige vereseerumit, vastavate mikroobide suspensiooni ja leukotsüüte, teise aga normaalvereseerumit uuritava haige vereseerumi asemel. Mõlemas katsutis määratakse fagotsütaarnäitajad. Jagades uuritava vereseerumi fagotsütaarnäitaja normaalvereseerumi fagotsütaarnäitajale, saame otsitava opsoniin - fagotsütaarindeksi. Opsoniin - fagotsütaarindeks on seega seda suurem, mida kõrgem on vastavate spetsiifiliste opsoniinide tiiter uuritavas vereseerumis. Spetsiifiliste opsoniinide tiiter tõuseb aga vastava nakkushaiguse puhul.

P r e t s i p i t a t s i o o n i r e a k t - s i o o n .

Pretsipitatsioonireaktsioon kujutab endast antigeeni väljasadestumist lahusest spetsiifiliste antikehade toimel.

Reaktsiooni puhul tekkivat sadet nimetatakse pretsipitaadiks, reaktsioonist osavõtvaid antikehi pretsipitiinideks ja antigeeni pretsipitinogeeniks.

Pretsipitatsioonireaktsioon iseloomustub väga kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega. Nii näiteks on selle reaktsiooni abil võimalik sedastada valku lahjenduses 1:100000 ja enam, määrates seejuures ka valgu liigilise kuuluvuse. Reaktsiooni kasutatakse valkude diferentseerimiseks kohtuarstiteaduses, nakkushaiguste diagnoosimisel, mikroobide antigeense struktuuri uurimisel, nende toksilisuse määramisel jne.

Paljud bakteriaalsed pretsipitinogeenid on termostabiilsed, mis võimaldab antigeeni saamiseks uuritavat materjali keeta 100° C juures. Pretsipitatsioonireaktsiooni termostaabiilse antigeeniga nimetatakse termopretsipitatsioonireaktsiooniks - näiteks Ascoli termopretsipitatsioonireaktsioon siberi katku diagnoosimisel.

Pretsipitatsioonireaktsioon väljendub kahel kujul:

1. Antigeeni ettevaatlikul kihistamisel immuunseerumile tekib vedelikkude kokkupuutepinnal valkjas rõngas - pretsipitatsioonirõngas, mistõttu seda reaktsiooni sageli nimetatakse rõngaspretsipitatsioonireaktsiooniks.

2. Antigeeni lisamisel immuunseerumile tekivad vedelikus väikesed helbed ja terakesed, mis sadestuvad teatud aja möödudes.

Viimasel ajal leiab üha laialdasemat kasutamist pretsipitatsioonireaktsioon gel-is. Tavaliselt tarvitatakse gel-ina täiesti läbipaistvat agarit. Reaktsioon toimub katsutites või Petri, tassides. Seerum ja antigeen difundeerivad agaris teineteisele vastu. Nende kokkupuutekohal tekib valkjas pretsipitaat.

Pretsipitatsioonireaktsiooniks kasutatavaid spetsiifilisi immuunseerumeid tavaliselt ei lahjendata või lahjendatakse füsioloogilise keedusoola lahusega ainult 1:2-1:5, küll aga lahjendatakse füsioloogilise keedusoola lahusega antigeeni. Reaktsiooniks kasutatavad seerumid ja antigeenid peavad olema täiesti läbipaistvad, katsutid kitsad (mitte üle 0,75 cm läbimõdduga).

Rõngaspretsipitatsioonireaktsiooniks pipeteeritakse katsutisse 0,5 ml seerumit. Pasteuri pipetiga kihitatakse seerumile peale 0,5 ml antigeeni, lastes antigeenil ettevaatlikult mööda katsuti seina alla valguda. Positiivse reaktsiooni korral tekib valkjas pretsipitatsioonirõngas vedelikkude kokkupuutepinnal 5-10 minuti vältel. Reaktsiooniga üheaegselt tuleb teha kolm kontrolli:

- 1) spetsiifiline seerum + spetsiifiline antigeen,
- 2) spetsiifiline seerum + füsioloogiline keedusoola lahus,
- 3) normaalne seerum + uuritav antigeen.

Rõngaspretsipitatsioonireaktsiooni vaadeldakse tumedal foonil (näiteks katsutite taha asetatakse must paber).

Spetsiifilisi diagnostilisi pretsipiteerivaid seerumeid ja neile vastavaid kontrollantigeene toodavad diagnostilistele laboratooriumidele vaktsiinide ja seerumite instituudid.

A g l u t i n a t s i o o n i r e a k t s i o o n .

Aglutinatsioonireaktsioon kujutab endast mikroobide, samuti teiste rakkude kokkukleepumist antikehade toimel. Reaktsioon toimub ainult elektrolüütide juuresolekul. Seega on aglutinatsioonireaktsiooniks tarvis kolm komponenti:

- 1) rakususpensioon antigeenina ehk aglutinogeenina,
- 2) immuunseerum antikehadena ehk aglutiniinidena,
- 3) füsioloogiline keedusoola lahus (0,85%) elektrolüüdina.

Olgu mainitud, et aglutinatsioonireaktsioon võib tegelikult olla tingitud mitte ainult antikehadest - nii näiteks kutsuvad viirused esile hemaglutinatsiooni.

Liikuvatel bakteritel esineb raku kehas somaatiline ehk O-antigeen ja viburites viburiline ehk H-antigeen. Need antigeenid kutsuvad organismis esile vastavalt O- ja H-aglutiniinide tekke.

O-aglutiniinide toimel kleepuvad kokku mikroobirakkude kehad, andes peeneteralise O-aglutinatsiooni. O-aglutinatsioon iseloomustub suhteliselt aeglaselt tekkiva väikestest kompaksetest terakestest koosneva sademega, mis raskesti homogeniseerub loksutamisel.

H-aglutiniinide toimel kleepuvad kokku mikroobirakkude viburid, andes suurehelbelise H-aglutinatsiooni. H-aglutinatsioon iseloomustub suurtest helvetest suhteliselt kiiresti tekkiva mahuka sademega, mis kergesti homogeniseerub loksutamisel.

Aglutinatsioonireaktsioon on spetsiifiline ja tehniliselt lihtne, mistõttu seda kasutatakse laialdaselt nakkushaiguste diagnoosimisel. Reaktsiooni võib rakendada:

1. Uuritavast materjalist isoleeritud mikroobide samastamisel tuntud seerumite abil.
2. Antikehade sedastamisel haige seerumis tuntud mikroobide abil.

Mikroobide samastamiseks aglutinatsioonireaktsiooni abil kasutatakse aglutineerivaid diagnostilisi seerumeid. Selliste seerumite saamiseks immuniseeritakse küülikuid, oi-

naid, hobuseid jt.loomi, süstides neile korduvalt tõusvais annuseis teatud kindla mikroobiliigi kultuuri suspensiooni. Immuniseerimiseks tarvitatakse nii elusaid kui ka surmatud mikroobe. Tavaliselt alustatakse immuniseerimist surmatud mikroobidega, siis minnakse üle elusatele mikroobidele, mis tagab kõrge tiitriga aglutineerivate seerumite saamise. Aglutineeriva seerumi tiitriks loetakse seda kõrgeimat seerumi lahjendust, mis kutsub veel esile vastava mikroobi aglutinatsiooni.

O- ja H- seerumite saamiseks immuniseeritakse loomi kas O- või H- antigeeniga. O- antigeeni valmistamisel toimitakse mikroobidele etüülalkoholiga või kuumutatakse neid vesivannis kahe tunni vältel 100° C juures, H- antigeeni valmistamisel aga toimitakse neile formaliiniga. O- antigeeni valmistamismetoodika põhineb selle antigeeni suuremal alkoholi- ja termoresistentsusel võrreldes H- antigeeniga. Formaliin vähendab O- antigeeni aktiivsust, millega seletub selle kasutamine H- antigeeni valmistamisel.

Uuritavate mikroobide samastamiseks kasutatakse viimasel ajal põhiliselt ainult nn. spetsiifilisi adsorbeeritud diagnostilisi aglutineerivaid seerumeid. Need seerumid sisaldavad vaid spetsiifilisi aglutiniine, kuna aga grupiaglutiniinid on neist eemaldatud Castellani aglutiniinide adsorbtsioonireaktsiooni abil.

Diagnostilisi aglutineerivaid seerumeid toodavad vastavad instituudid, turustades neid veetustatult ampullides. Laboratooriumis lahustatakse selline kuivseerum destilleeritud vees. Lahustamiseks võetak vee hulk vastab seerumi mahule enne kuivatamist ja on märgitud ampulli etiketil.

Etiketil võib olla märgitud ka seerumi tiiter. Spetsiifilistel adsorbeeritud diagnostilistel aglutineerivatel seerumitel pole tiiter tavaliselt märgitud ja neid kasutatakse laboratooriumis eelneva lahjendamiseta. Märgitud tiitriga seerumeid lahjendatakse peale destilleeritud vees lahustamist füsioloogilise keedusoolalahusega.

Haige vereseerumis antikehade sedastamiseks aglutinatsioonireaktsiooni abil võetakse haigelt 5-7 ml verd(vt.prakti-

kum XII). Laboratooriumis vabastatakse verehüübe katsuti seinast steriilse klaaspulga või külvinõelaga ja asetatakse katsuti külmutuskappi verehüübe ja üksikute rakuliste elementide settimiseni. Seerumi saamist võib kiirendada tsentrifugeerimisega. Kui laboratooriumi tuuakse värskelt võetud halvasti hüübinud veri, paigutatakse see eelnevalt 1-2 tunniks termostaati. Reaktsiooniks kõlblik on läbipaistev mittehemolüütiline seerum. Antigeeninina kasutatakse nii elusate kui ka surmatud mikroobide suspensioone. Ka instituudid toodavad vastavaid nn. diagnostikume. O- ja H- aglutiniinide määramiseks kasutatakse O- ja H- diagnostikume.

Eristatakse mikro- ja makroaglutinatsioonireaktsiooni, kusjuures makroaglutinatsioonireaktsiooni võib teostada nii esemeklaasil kui ka katsutis. Makroaglutinatsioonireaktsiooni nimetatakse tavaliselt lihtsalt aglutinatsioonireaktsiooniks.

Mikroaglutinatsioonireaktsioon.

Mikroaglutinatsioonireaktsiooni kasutatakse praktiliselt harva. Puhtale kattedklaasile võetakse Pasteuri pipetiga tilk lahjendatud seerumit (haige seerum lahjenduses 1:10, diagnostiline aglutineeriv seerum lahjenduses 1:100). Sellesse tilka suspendeeritakse külvinõelaga uuritavat kultuuri või diagnostikumi ja tehakse harilikul viisil rippuv tilk (vt. praktikum VI). Kontrolliks valmistatakse rippuv tilk uuritava kultuuri või diagnostikumi suspensioonist füsioloogilises keedusoolalahuses. Uuritava kultuuri suspendeerimisel tuleb silmas pidada, et suspensioon peab olema täiesti homogeenne.

Esemeklaasid rippuvate tilkadega paigutatakse termostaati 37° C juures, uurides neid mikroskoobiliselt 10, 20, 30 ja 45 minuti järel. Positiivse reaktsiooni korral on näha kokkukleepunud mikroobe väikeste konglomeratidena. Vabalt liikuvaid mikroobe pole või on näha vaid üksikuina. Negatiivse reaktsiooni puhul liiguvad kõik mikroobid nii nagu kontrollis. Preparaatide pikemaajalisel seismisel langevad mikroobid tilga alumisse ossa, andes näiliselt positiivse reaktsiooni.

Liikumatusel mikroobidel on mikroaglutinatsioonireakt-

sioon ebaselge.

Aglutinatsioonireaktsioon esemeklaasil.

Seda reaktsiooni kasutatakse kõige sagedamini mikroobide samastamisel. Puhtale esemeklaasile võetakse Pasteuri pipetiga tilk diagnostilist aglutineerivat seerumit ja selle kõrvale kontrolliks teise pipetiga tilk füsioloogilist keedusoola- lahust. Mõlemasse tilka suspendeeritakse külvinõelaga uuritava kultuuri nii, et suspensioonid saaksid täiesti homogeen- sed. Külvinõela tuleb kuumutada pärast kultuuri lisandamist igale tilgale, et ära hoida seerumi sattumist kontrolltilka.

Reaktsiooni kiirendamiseks soojendatakse esemeklaasi ettevaatlikult leegil ja kallutatavate liigutustega segatakse tilkade sisu, vältides seejuures nende kokkuvoolamist. Aglu- tinatsiooni tekkimist jälgitakse palja silmaga või luubi abil tumedal foonil. Positiivse reaktsiooni korral moodustuvad seerumitilgas teralised või helbelised mikroobide konglome- raadid, vedelik aga muutub läbipaistvaks. Kontrolltilk peab jääma ühtlaselt häguseks.

Aglutinatsiooni puudumisel asetatakse esemeklaas nn. "niiskesse kambrisse" - Petri tassi, mille põhjas on veega niisutatud filterpaber ja sellel kaks klaaspulka esemeklaasi- de alusena. Niiskes kambris hoitakse esemeklaas 5-10 minutit võimaliku aeglaselt tekkiva aglutinatsioonireaktsiooni kind- lakstegemiseks. Esemeklaasi võib asetada niiskesse kambrisse ka kohe pärast uuritava kultuuri suspendeerimist tilkadesse.

Aglutinatsioonireaktsiooniks esemeklaasil kasutatakse diagnostilisi aglutineerivaid seerumeid füsioloogilise kee- dusoolalahusega 1:100 lahjendatult. Adsorbeeritud spetsii- filisi seerumeid ei lahjendata.

Uuritav kultuur peab olema 24-tunniline, tahkel söötmel- tavaliselt längagaril. O- seerumitega töötades võetakse kul- tuuri längagari ülemisest servast, H- seerumitega töötades aga kondensatsioonivedeliku piirilt.

Aglutinatsioonireaktsioon katsutis.

Reaktsiooni kasutatakse kõige sagedamini antikehade se-

dastamiseks haige vereseerumis. Uuritavast seerumist valmistatakse rida lahjendusi füsioloogilise keedusoolalahusega - tavaliselt 1:50 - 1:1600. Selleks tehakse esiteks seerumi alglahjendus 1:25, võttes 0,4 ml seerumit ja 9,6 ml füsioloogilist keedusoolalahust (tarbekorral võib seerumi alglahjenduse valmistada ka väiksemas mahus, võttes 0,1 või 0,2 ml seerumit ja vastavalt 2,4 või 4,8 ml füsioloogilist keedusoolalahust). Edasi pipeteeritakse seitsmesse katsutisse 1 ml füsioloogilist keedusoolalahust. Esimesse katsutisse lisatakse 1 ml seerumi alglahjendust. Sellest katsutist viiakse pipetiga 1 ml vedelikku teise, teisest kolmandasse, kolmandast neljandasse, neljandast viiendasse ja viiendast kuuendasse katsutisse. Viimasest katsutist lihtsalt eemaldatakse 1 ml vedelikku. Seitsmes katsuti sisaldab ainult füsioloogilist keedusoolalahust ja jääb kontrolliks (nn. anti-geeni kontroll).

Kõikidesse katsutitesse lisatakse 1-2 tilka antigeeni. (antigeeni tihedus on umbes 10 miljardit mikroobirakku 1 ml-is) ja pärast loksutamist paigutatakse katsutid termostaati 37°C juures. Termostaati paigutatakse ka katsuti seerumi alglahjendusega, nn. seerumi kontroll, kuhu antigeeni ei lisata. Reaktsiooni hinnatakse 2 ja 24 tunni pärast palja silmaga või aglutinoskoobiga.

Positiivse reaktsiooni korral muutub katsuti sisu läbipaistvaks, katsuti põhja aga koguneb peeneteraline (O- aglutinatsioon) või suurehelbeline (H- aglutinatsioon) sade, mis kergel loksutamisel üles kerkib. Antigeeni kontroll peab jääma ühtlaselt häguseks, seerumi kontroll aga läbipaistvaks.

Määratavate antikehade tiiter vastab sellele seerumi suurimale lahjendusele, milles on veel täheldatav aglutinatsioon. Igale aglutinatsioonireaktsioonile on omane teatud kindel diagnostiline tiiter - vähim seerumi lahjendus, mille juures positiivsel reaktsioonil on juba diagnostilist väärtust.

Vajaduse korral uuritakse vereseerumit mitme antigeeniga, valmistades siis selleks vastav arv seerumilahjenduste rida.

Vahel kasutatakse lahjendatud antigeene. Nendega töötades tehakse seerumi lahjendused 0,5 ml mahus ja lisatakse vastavat antigeeni samuti 0,5 ml. Seejuures tuleb silmas pida, et selline antigeeni lisamine lahjendab seerumit kahekordselt. Nii näiteks lisades antigeeni seerumi lahjendusele 1:200, saame tegelikult lahjenduse 1:400.

Reaktsiooni tarvis kasutatakse nn. seroloogilisi katseteid suurusega 10 x 0,8 - 1 cm.

Kõhutüüfuse seroloogilisel diagnoosimisel kasutatavat aglutinatsioonireaktsiooni katsutis nimetatakse Widali reaktsiooniks, brutselloosi puhul aga Wrighti reaktsiooniks.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Lahata Klebsiella pneumoniae puljongkultuuriga intraperitoneaalselt nakatatud valge hiir, selle põrnast ning maksast teha külvid ja valmistada preparaadid. Viimased värvida Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
2. Määrata mitmesuguste mikroobiliikide fagotsütaarnäitaja valgete hiirte kõhuõõnes.
3. Teostada rõngaspretsipitatsioonireaktsioon.
4. Samastada tundmatu kultuur aglutinatsioonireaktsiooniga esemeklaasil aglutineerivate diagnostiliste seerumitega.
5. Määrata haige vereseerumis Salmonella typhi O- ja H- antikehad aglutinatsioonireaktsiooniga katsutis Salmonella typhi O- ja H- diagnostikumidega.

XIV praktikum.

T e e m a: IMMUUNSUSREAKTSIOONID.

E e l m i s e p r a k t i k u m i t ö ö d e
l ö p e t a m i n e .

Katseloomade lahkamine ja mikrobioloogiline
uurimine.

Aglutinatsioonireaktsioon.

V e r e g r u p i d .

Inimese erütrotsüüdid on kaetud suure hulga mitmesuguste antigeenidega, mida seni on veel küllaltki vähe uuritud. Need antigeenid kuuluvad kolme rühma:

1. Heterofiilsed antigeenid - need on inimesele mitte-spetsiifilised looduses laialdaselt levinud antigeenid, näiteks Forssmani antigeen.

2. Liigispetsiifilised antigeenid - antigeenid, mis esinevad eranditult kõikidel inimestel.

3. Tüübispetsiifilised ehk isoantigeenid esinevad küll inimestel, kuid mitte kõikidel. Isoantigeenidest sõltuvad veregrupid, mistõttu neid ka grupiantigeenideks nimetatakse.

Käesoleva ajani on kindlaks tehtud 28 isoantigeeni, mis jaotuvad 9 antigeenide süsteemi.

Praktiliselt on kõige suurema tähtsusega ABO süsteemi kuuluvad antigeenid A ja B. Nendele antigeenidele vastavad anti-kehad anti -A ehk α ja anti- B ehk β . ABO süsteemi antigeenide järgi eristatakse 4 põhilist veregruppi:

I ehk 0-(null) grupp - erütrotsüütides pole A ja B anti-

geene, vereseerumis leiduvad α ja β antikehad;

II ehk A- grupp- erütrotsüüdid sisaldavad A antigeeni, vereseerumis leiduvad β antikehad;

III ehk B -grupp -erütrotsüüdid sisaldavad B antigeeni, vereseerumis leiduvad α antikehad;

IV ehk AB- grupp- erütrotsüüdid sisaldavad A ja B antigeene, vereseerumis α ja β antikehad puuduvad.

Eespool toodust nähtub, et inimese vereseerumis ei leidu antikehi, mis võiksid reageerida tema enda erütrotsüütides leiduvate ABO süsteemi kuuluvate antigeenidega. See on ka täiesti loomulik, sest vastasel korral toimuks antigeen-antikeha reaktsiooni tulemusena erütrotsüütide kokkukleepumine - hemaglutinatsioon sellele järgneva hemolüüsiga.

Veregruppide määramine osutub väga tähtsaks kliinikus seoses veretransfusiooniga ehk vereülekanega, samuti mõningate verehaigustega. Inimest, kellele tehakse vereülekanet, nimetatakse retsiplendiks; inimest aga, kellelt võetakse verd, doonoriks. Doonori erütrotsüüdid ei tohi sisaldada antigeene, mis võiksid reageerida retsiplendi vereseerumis leiduvate antikehadega. Kui näiteks retsiplend kuulub A- gruppi, tohib talle üle kanda A- ja O- grupi verd. Täiesti keelatud on B- ja AB grupi vere ülekanemine, mille erütrotsüüdid reageeriksid kohe retsiplendi seerumis leiduvate β antikehadega.

Põhiliste veregruppide järgi nimetatakse O- grupiga inimesi universaalsseteks doonoriteks ja AB- grupiga inimesi universaalsseteks retsiplendideks. Alati tuleb siiski vereülekanel eelistada doonori verd, mis vastaks retsiplendi veregrupile.

Olgu mainitud, et A ja B antigeenid leiduvad mitte ainult erütrotsüütides, vaid ka teistes kudedes ja isegi sekreetides.

Teistest antigeenidest võib nimetada MNSs ja Lewisi süsteemi kuuluvaid antigeene. Suur tähtsus on Rhesus (Rh) süsteemi kuuluvatel antigeenidel.

1940. aastal immuniseerisid Landsteiner ja Wiener külli-

kuid ahvide *Macacus rhesus* erütrotsüütidega. Selgus, et immuniseeritud küülikute vereseerum aglutineeris mitte ainult *Macacus rhesus*'e, vaid ka enamiku inimeste erütrotsüüte. Inimesi, kelle erütrotsüüdid sisaldavad Rh- süsteemi antigeene, nimetatakse rhesus-positiivseteks, kellel need aga puuduvad, rhesus-negatiivseteks. Inimese vereseerumis võivad esineda antikehad anti-rhesus, mis vahel tingivad vereülekandejärgseid tüsistusi, samuti vastsündinute hemolüüsitõbe. Rhesus-negatiivsetele retsipientidele võib üle kanda ainult rhesus-negatiivsete doonorite verd, rhesus-positiivsetele retsipientidele aga nii rhesus-positiivsete kui ka rhesus-negatiivsete doonorite verd.

Kohtuarstiteaduses tuleb silmas pidada, et Rh-süsteemi kuuluvad antigeenid ei eritu sekreetidega.

Veregruppide määramine.

Veregruppide määramiseks algutineeritakse uuritava isiku erütrotsüüte O-, A- ja B- grupi vereseerumitega. Uuritavalt isikult võetakse verd sõrmest Francki nõelaga. Nii sõrm kui ka Francki nõel desinfitseeritakse eelnevalt alkoholi, siis eetriga. Veritsevat sõrme puudutatakse kolm korda puhta esemeklaasiga, saades viimasele kolm veretilka. Pasteuri pipettidega tilgutatakse esimese veretilga kõrvale tilk O- grupi vereseerumit, teise tilga kõrvale tilk A- grupi ja kolmanda tilga kõrvale tilk B- grupi vereseerumit (iga vereseerumi tarvis võtta eraldi pipetti!). Vastavad vere- ja seerumitilgad ühendatakse ja segatakse teise esemeklaasi nurkadega, kasutades iga tilgapaari jaoks eraldi nurka.

Hemaglutinatsiooni teket jälgitakse palja silmaga, esemeklaasi tilkadega valgel foonil ettevaatlikult edasitapasi kallutatades. Hemaglutinatsioon iseloomustub algul punaste terakeste, siis suuremate konglomeraatide tekkega, kusjuures vedelik ise muutub läbipaistvaks. Reaktsiooni jälgitakse 5 minuti vältel, tarbekorral kasutades niisket kambrit.

Reaktsiooni tulemused üksikute seerumitega, sõltuvalt uuritava vere gruppidest, on toodud alljärgnevas tabelis.

Veregrupp	s e e r u m		
	O	A	B
O	-	-	-
A	+	-	+
B	+	+	-
AB	+	+	+

K o m p l e m e n d i s i d u m i s e r e a k t s i o o n .

Komplementi sidumise reaktsioon (KSR) on üks tundlikemaid ja spetsiifilisemaid seroloogilisi reaktsioone, mida kasutatakse nakkushaiguste mikrobioloogilisel diagnoosimisel. Selle reaktsiooniga võib määrata nii tundmatut antigeeni tuntud immuunseerumitega (antikehadega) kui ka vastupidi: määrata seerumis tundmatuid antikehi tuntud antigeenidega.

KSR viiakse läbi kahes järgus ja see koosneb kahest süsteemist: p õ h i s ü s t e e m i s t (nn. bakteriolüütiline süsteem) ja i n d i k a a t o r s ü s t e e m i s t (nn. hemolüütiline süsteem). Põhisüsteemi kuuluvad antigeen (kas tuntud või määratav), antikehad (kas määratavad või tuntud) ja komplement. Indikaatorisüsteemi kuuluvad erütrotsüüdid (antigeen) ja spetsiifiline hemolüütiline seerum (antikehad).

Põhisüsteemis tekib immuunseerumi reageerides spetsiifilise antigeeniga kompleks antigeen + antikeha, mis adsorbeerib, seob komplementi. Kui antigeen ja antikehad pole vastastikku spetsiifilised, siis kompleksi antigeen + antikeha ei teki ja komplement jääb vabaks. Põhisüsteemis kulgenud reaktsioon jääb aga silmale nähtamatuks. Selleks, et seda reaktsiooni silmale nähtavaks teha, lisatakse põhisüsteemile indikaatorisüsteem.

Indikaatorisüsteemis on erütrotsüüdid ühinenud spetsiifiliste antikehadega - hemolüsiinidega, s.t. on tekkinud kompleks antigeen + antikeha, mis on võimeline siduma vaba komp-

lementi. Komplementi sidumine selle kompleksi poolt väljendub juba silmaga nähtavas reaktsioonis - hemolüüsis. Seega näitab indikaatorsüsteem vaba komplementi olemasolu - kui vaba komplementi on, tekib hemolüüs, kui ei, siis hemolüüsi ei teki. Vaba komplementi olemasolu aga sõltub reaktsioonist põhisüsteemis: kui reaktsioon oli negatiivne, on komplement vaba, kui positiivne, siis komplement on juba seotud. Seega positiivse KSR-1 korral hemolüüsi ei toimu, negatiivne KSR ise loomustab aga hemolüüsiga.

Komplementi sidumise reaktsiooni komponendid.

E r ü t r o t s ü ü d i d. KSR-is kasutatakse 3%-list oina erütrotsüütide suspensiooni füsioloogilises keedusoolalahuses. Steriilselt võetud veri defibrineeritakse ja erütrotsüüdid pestakse tsentrifugeerimisel kolm korda füsioloogilise keedusoolalahusega. Selleks filtritakse defibrineeritud oina veri läbi marlifiltri tsentrifuugi katsutisse, lisatakse samas koguses füsioloogilist keedusoolalahust ja tsentrifugeeritakse 10 minutit 2000 tiiru minutis. Pipetiga eemaldatakse katsutist vedelik, sademes olevatele erütrotsüütidele valatakse peale füsioloogilist keedusoolalahust, katsuti sisu loksutatakse segi ja tsentrifugeeritakse uuesti.

Pärast seda korratakse kogu toimingut veel üks kord. Kui erütrotsüütidepealne vedelik on siis täiesti läbipaistev ja värvusetu, võib erütrotsüüte reaktsiooniks kasutada. Tarviliku suspensiooni saamiseks võetakse sademest 3 ml erütrotsüüte ja 97 ml füsioloogilist keedusoolalahust.

H e m o l ü ü t i l i n e s e e r u m. KSR-iks vajalik hemolüütiline seerum saadakse küülikutel neid oina erütrotsüütidega immuniseerides. Selleks süstitakse küülikutele intravenoosselt 2-5 ml 50%-list oina erütrotsüütide suspensiooni 3-4 korda 2-3 päevaste vaheaegadega. Tavalistele diagnostilistele laboratooriumidele toodavad hemolüütilist seerumit instituudid.

KSR-is kasutatakse hemolüütilist seerumit 3-4 kordses tiitris, s.t. kui seerumi tiiter on näiteks 1:1500, võetakse reaktsiooni seerum lahjenduses 1:500. Hemolüütilise seerumi

tiitriks nimetatakse seda seerumi maksimaalsed lahjendust, mille 0,5 ml on võimeline esile kutsuma 0,5 ml erütrotsüütide hemolüüsi 0,5 ml lahjendatud komplemendi juuresolekul ühe tunni vältel 37° C juures.

K o m p l e m e n t. Komplemendina kasutatakse värsket merisea vereseerumit. Enne KSR-i läbiviimist tuleb komplement alati tiitrida nn. "komplemendi tööannuse" määramiseks.

Valmistatakse komplemendi alglahjendus 1:10 (0,4 ml komplementi + 3,6 ml füsioloogilist keedusoolalahust) ja pipeteeritakse see tõusvates hulkades 0,05 - 0,5 ml vastavalt skeemile katsutitesse. Edasi lisatakse füsioloogilist keedusoolalahust nii, et vedeliku üldmaht katsutites oleks 1,5 ml ja paigutatakse katsutid termostaati 45 minutiks 37° C juures.

Samaaegselt valmistatakse hemolüütiline süsteem. Selleks segatakse võrdsetes hulkades hemolüütiline seerum ning 3%-line oina erütrotsüütide suspensioon ja paigutatakse see 30 minutiks termostaati 37° C juures sensibiliseerimiseks, s.t. hemolüsiinide ühinemiseks erütrotsüütidega.

Hemolüütilist süsteemi lisatakse komplemendiga katsutitesse 1 ml ja pärast loksutamist paigutatakse need taas termostaati - seekord 30 minutiks. Selle aja möödudes hinnatakse komplemendi tiitrimistulemused, määrates katsutid, kus toimus hemolüüs. Hemolüüsi puhul muutub vedelik läbipaistvaks roosakaspunaseks, meenutades lakkii (nn. "lakkveri"). Hemolüüsi puududes jääb vedelik häguseks.

Komplemendi tiitriks nimetatakse seda komplemendi vähimat hulka, mille juures toimub veel täielik hemolüüs. KSR-is kasutatakse nn. komplemendi tööannust, mis ületab komplemendi tiitri 20-25% võrra. Praktiliselt vastab see annus komplemendi hulgale selviimases katsutis, milles toimus veel täielik hemolüüs. Komplemendi hulga suurendamise vajadus on tingitud sellest, et nii uuritav seerum kui ka antigeen võivad teatud määral kahjustada komplemendi aktiivsust, avaldada nn. "antikomplementaarset toimet".

A n t i g e e n. KSR-is kasutatakse mitmesuguseid anti-geene, mis valmistatakse mikroobidest, normaalsetest ja pato-

Komplemendi tiitrimise skeem.

Katsuti number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontroll	
											11	12
Komplement lahjenduses 1:10 ml-tes	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	-
Füsioloogiline keedusoolalahus ml-tes	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5

Termostaati 37° C juures 45 minutiks

Hemolüütiline süsteem ml-tes	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5 ml 3% oina erütrotsüüti-de suspensioon	1,0
------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	-----

Termostaati 37° C juures 30 minutiks.

loogiliselt muutunud kudedest jne. Antigeen kuulub samuti tiitrimisele võimaliku antikomplementaarse toime tõttu. Selleks lisatakse antigeeni vähenevaks annuseis komplementi ja hemolüütilist süsteemi sisaldavatesse katsutitesse. Antigeeni tiitriks nimetatakse seda antigeeni suurimat annust, mille juuresolekul toimub täielik hemolüüs, s.t. suurimat annust, mis ei avalda antikomplementaarset toimet. Võimaliku antikomplementaarse toime täielikuks vältimiseks võetakse antigeen reaktsiooni pooles tiitris.

S e e r u m. KSR-is kasutatav seerum kuumutatakse eelnevalt vesivannis 56° C juures 30 minuti vältel, s.t. inaktiveeritakse. Inaktiveerimine taotleb nii seerumis leiduva komplemendi kahjustamist kui ka reaktsiooni soodustavat seerumikolloidide stabiliseerumist.

Haige seerum võetakse KSR-i lahjenduses 1:5 (0,1 ml seerumit + 0,4 ml füsioloogilist keedusoolalahust), spetsiifilised immuunseerumid aga olenevalt nende aktiivsusest mitmesugustes lahjendustes - 1:20 - 1:1000.

F ü s i o l o o g i l l i n e k e e d u s o o l a - l a h u s. See valmistatakse keemiliselt puhta naatriumkloriidi lahustamisel destilleeritud vees (0,85%-line lahus). Füsioloogiline keedusoolalahus steriliseeritakse autoklaavis 1 atm. juures 20 minuti vältel.

KSR-iks kasutatavat klaasmaterjali (katsutid, pipetid, kolvid jne.) ei tohi kasutada muuks otstarbeks.

Komplemendi sidumise reaktsiooni meetodika.

KSR viiakse läbi kahes järgus termostaadis 37° C juures. Esimeses järgus kulgeb reaktsioon põhisüsteemis 60 minuti, teises järgus aga indikaatorsüsteemis 30-60 minuti vältel. Iga komponenti võetakse 0,5 ml, nii et reaktsiooni üldmaht on 2,5 ml. Seejuures lahjendatakse eelnevalt komplement ja antigeen füsioloogilise keedusoolalahusega selliselt, et iga 0,5 ml lahuse kohta tuleks üks tööannus komplementi või antigeeni. Uuritavat seerumit lahjendatakse vahetult reaktsioonikatsutites, võttes 0,1 ml seerumit ja 0,4 ml füsioloogilist keedusoolalahust. Alljärgnevalt on toodud KSR-i põhiskeem.

KSR-1 põhiskeem

Katsuti number	Esimene järk					Teine järk	
	seerum ml-tes	antigeen ml-tes	füsioloogiline keedusoolalahus	komplement	termos-taati 37°C juures 60 minutiks	indikaator-süsteem	termos-taati 37°C juures 30-60 minutiks
1	0,1	0,5	0,4	0,5		1,0	
2	0,1	-	0,9	0,5		1,0	
3	-	0,5	0,5	0,5		1,0	

Esimene katsuti on reaktsioonikatsuti, milles positiivse reaktsiooni puhul hemolüüsi ei toimu. Teine katsuti on seerumi kontrollkatsuti ja kolmas antigeeni kontrollkatsuti. Nendes katsutites peab toimuma täielik hemolüüs. Kui kontrollkatsutites hemolüüsi pole, ei saa reaktsiooni hinnata ja see tuleb korrata. Ajaliselt hinnatakse KSR-1 tulemusi vahetult peale termostaati, vahel ka teistkordselt järgmisel päeval.

Positiivse KSR-1 intensiivsust märgitakse plussidega järgmiselt:

- + + + + hemolüüsi pole - vedelik on värvusetu, tugev erütrotsüütidest sade;
- + + + selgesti eristatav hemolüüsi puudumine - vedelik on roosaka värvusega, tugev erütrotsüütidest sade;
- + + osaline hemolüüs - vedelik roosakaspunane, selgesti täheldatav erütrotsüütidest sade;
- + peaaegu täielik hemolüüs - vedelik intensiivselt värvunud roosakaspunaseks, minimaalne erütrotsüütidest sade;
- ± praktiliselt täielik hemolüüs - vedelik intensiivselt värvunud roosakaspunaseks, põhjas värvu täheldatav pilvjas erütrotsüütidest sade;
- täielik hemolüüs - vedelik intensiivselt värvunud roosakaspunaseks, ilma igasuguse sademeta - nn. "lakkveri".

Mõningate nakkushaiguste diagnoosimisel võib KSR-1 põhiskeemis esineda üksikuid muudatusi, kuid reaktsiooni põhimõteline ülesehitus jääb alati samaks.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Valge hiire elundkülvidest valmistada preparaadid, värvida need Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
2. Hinnata aglutinatsioonireaktsiooni tulemused.
3. Vastastikku naabriga määrata veregrupid.
4. Teostada komplemendi sidumise reaktsioon reaktsiooni põhiskeemi järgi.

XV p r a k t i k u m .

T e e m a: FILTREERUVATE VIIRUSTE MORFOLOOGIA JA KASVATAMINE.

Filtreeruvate viiruste hulka kuuluvate mikroorganismide põhilisteks tunnusteks on:

1. Nad on väiksed: enamik ei ole nähtavad tavalises mikroskoobis, filtreeruvad läbi portselankurnade kui ka kolloidmembraanide, mida ei läbi bakterid.
2. Viirused ei kasva kunstlikkudel söötmetel, vaid ainult elusates organismides, kudedes ja koerakkudes.
3. Viirustel peaaegu puudub iseseisev ainevahetus vähearenenud fermentsüsteemist tingituna. Selle tõttu arenevad nad rakusiselt ja on sageli erilise afiinsusega just teatud koerakkudele, näit. närvikoele jne.

Filtreeruvad viirused on läbimõõdus 10-400 $m\mu$, nii et ainult suuremad neist (200 $m\mu$ alates) on nähtavad tavalises mikroskoobis. Mikroskoobilisel või elektronmikroskoobilisel uurimisel nähtavaks tehtud viiruste korpuskulaarseid moodustisi nimetatakse viiruste elementaarkehakesteks.

Viiruste elementaarkehakesed võivad olla kerajad, kuupjad või niitjad moodustised.

Viiruste elementaarkehakeste nähtavaks tegemiseks võib kasutada mitut võimalust:

1. Tavaline mikroskoobiline uurimismeetod. Selleks kasutatakse kõigepealt värvimismeetodeid, kus värvaine objekti pinnal sadestudes muudab seega uuritava objekti paremini nähtavaks. Viiruste elementaarkehakesed värvitakse sel juhul Romanovski-Giems, Pascheni, Macchiavello või Fontana meetodi järgi.

2. Elementaarkehakesi saab suurematel viirustel nähtavaks teha, kasutades pimeväljameetodit nähtava valguse abil. Ka sel juhul näivad viirused tegelikkusest suuremad ja on nähtavad tavalises mikroskoobis.
3. Viiruste kuju uurimiseks kasutatakse fotografeerimist ultraviolettkiirguses, selleks kasutatakse ultraviolettspekt-rist teatud lainepikkust, näit. lainepikkuse 257 m μ juures on hästi eraldatavad 75 m μ läbimõõduga elementaarkehakesed.
4. Viiruste kuju uurimiseks kasutatakse fluörestsentsmikroskoopiat.
5. Parimad võimalused viiruste uurimiseks loob elektronmikroskoop. Praegu võib eraldada elektronmikroskoobis 1 m μ läbimõõduga aineosakesi ja kasutada suurendust kuni 200 000 korda.
6. Viiruste uurimiseks võib kasutada ka faaskontrastmikroskoopi.

Nende uurimismeetodite abil on võimalik nähtavaks teha viirusi, s.o. näha nende elementaarkehakesi ja määrata nende kuju.

Viiruste elementaarkehakeste suurust saab 1) otseselt mõõta elektronmikroskoobis, 2) määrata filtrimisel, kasutades selleks tuntud urvete läbimõõduga ultrafiltreid; 3) võib määrata tsentrifuugimisel. Selleks kasutatakse ultratsentri- fuuge, mille kiirus on 80 000 - 160 000 tiiru/min. Tsentri- fuugimisel saab määrata viiruse suurust selle järgi, et tea- tud aja jooksul jäävad kindla suurusega aineosakesed peatuma teatud vedelikusamba kõrgusel. Tavaliselt määratakse elemen- taarkehakeste suurus kõigi kolme erineva meetodi järgi.

Elementaarkehakeste värvimine Pascheni järgi.

Värvilahused:

- A. 0,3 g baas. fuksiini,
10 ml etüülalkoholi.
- B. 5 g fenooli,
95 ml aq.dest.

Värvimiseks segatakse 1 osa A lahust ja 9 osa B lahust ja filtritakse.

Löffleri peits:

- 100 ml 20%-list ac.tannic.vesilahust,
 - 50 ml küllastatud FeSO_4 vesilahust,
 - 10 ml baas. fuksiini küllastatud alkoholset lahust.
- Lastakse seista ja filtritakse.

Värvimine:

1. Preparaat asetatakse 3 minutaks destilleeritud vette, lastakse õhus kuivada.
2. Asetatakse 5 minutiks absoluutsesse alkoholi, valatakse eetriga üle ja lastakse õhus kuivada.
3. Valatakse peale Löffleri peits, kuumutatakse auruni ja toimitakse 5-10 minutit.
4. Loputada hästi veega.
5. Valatakse värvilahus (A + B), kuumutatakse ettevaatlikult kuni auru ilmumiseni 1 minut, siis lastakse seista 10 minutit.
6. Pestakse kiirelt destilleeritud veega, kuivatatakse filterpaberiga.

Rõugevaktsiini viiruse elementaarkehakesed on tumepunased.

Värvimine Macchiavello järgi.

Värvilahused:

- 1) 0,25%-line baasiline fuksiin fosfaatpuhvris pH 7,4,
 - 2) 0,5%-line acid.citric. vesilahus,
 - 3) 1%-line metüleensinise vesilahus.
1. Preparaat lastakse õhus kuivada, siis asetatakse preparaadile pandud filterpaberile 0,25%-line baas.fuksiini lahus 4 minutiks.
 2. Loputatakse kiiresti 0,5% ac.citric. lahusega.
 3. Loputatakse kraaniveega.
 4. Värvitakse 1%-lise metüleensinise lahusega 10 minutit.
 5. Loputatakse veega.
 6. Lastakse kuivada õhus.

Elementaarkehakesed on sinised.

Värvimine Morozovi meetodi järgi.

1. Valmistatakse rõugevaktsiini viirusest õhuke äigepreparaat.
2. Kuivanud preparaadile valatakse peale dest.vesi 10-15 min.
3. Lastakse kuivada.
4. Valatakse peale A lahus 1 min.

(A lahus: 1 ml ac.acetic.glac.,
2 ml 40% formalini,
100 ml dest.vett).

5. Loputatakse veega.
6. Valatakse peale B lahus, soojendades aurumiseni 30-60 sek.
(B lahus: 1 g acid. carbol. cryst.,
5 g tanniini,
100 ml dest.vett).
7. Loputatakse destilleeritud veega 30 sek.
8. Fontana lahus 1-2 min.lastakse toimida soojendades
(kirjeldatud Fontana-Tribondeau m. juures koostis)
9. Loputatakse dest. veega.
10. Kuivatatakse, uuritakse.

Elementaarkehakesed mustad, suhteliselt suured helekollasel foonil.

E l e k t r o n m i k r o s k o o p .

1930.aastal võeti kasutusele elektronmikroskoop, mida peagi laialdaselt rakendati arstiteaduses just viiruste ja ka muude mikroobide ehituse uurimiseks.

Elektronmikroskoobis uurimiseks valmistatakse preparaadid kolloodiumembraanile 10 m μ paksusega. Parema kontrastsuse saamiseks kaetakse õhukese kulla, kroomi, uraani või mõne teise metalli kihiga. Sel viisil valmistatud preparaadide uurimisel saab uuritavaist objektidest reljeefse pildi.

Elektronmikroskoop erineb tavalisest mikroskoobist järgmiselt:

1. Tavaline valgusallikas on siin asendatud elektrontoruga, mis on elektronide allikaks.
2. Flaaslähtsed on asendatud elektromagnetitega.
3. Kujutis on fookustatud fluorestseerival ekraanil ja tule-

mused registreeritakse fotoplaadil.

4. Valguskiired tavalises mikroskoobis läbivad õhu ja klaasi, siin aga elektronide voog läbib vaakuumi.
5. Kujutist ei fookustata läätsede liigutamise abil, vaid elektromagnetilises poolis magnetvälja tugevuse muutmisega.
6. Kui elektronid läbivad objekti, siis osa absorbeeritakse, osa hajub ja kontrastsus, mis preparaadis tekib, registreeritakse tundlikul plaadil või fluorestseerival ekraanil.
7. Elektronmikroskoobis võib määrata esemete kuju, pikkust, laiust ja sügavust.

Praktiliselt on elektronmikroskoobi eraldusvõime 1 kuni 2 m μ ja suurendus 6000 kuni 80 000 korda, koos fotograafilise suurendusega kuni 200 000 korda.

I n k l u s i o o n k e h a d .

Viirusnakkuste puhul kahjustatud kudedes võib leida mõningatel juhtudel kas koerakkude plasmas või koguni tuumasiseselt tundmata päritoluga moodustisi. Neid nimetatakse inklusioonkehakesteks ehk sulundkehakesteks. Inklusioonkehad on ümarad, ovaalsed või ebakorrapärase kujuga moodustised. Nad võivad olla ühtlase või teralise struktuuriga. Nad on küllaltki suured, läbimõõdus 1-30 μ ja hästi nähtavad tavalises mikroskoobis. Inklusioonkehakeste kindlakstegemiseks valmistatakse kas histoloogilised lõigud või tehakse kudedest äigepreparaadid. Kasutatakse erilisi värvimismeetodeid, näit. lüsa viiruse inklusioonkehakesi saab nähtavaks teha Muromtsevi meetodiga.

Muromtsevi meetod

(modifitseeritud).

1. Marutõbise koera ajast valmistatud äigepreparaat fikseeritakse seguga alkohol + eeter $\bar{a}\bar{a}$, 25 minutit 37^o C juures.
2. Loputatakse veega.
3. Kuivatatakse filterpaberiga.
4. Asetatakse peale Manson'i värvilahus 1:50 10 minutiks.

(Mansoni värvilahus: 2 g metüleensinist,
5 g booraksit,
100 ml dest.vett.)

5. Asetatakse preparaadile 10%-lise ac.tannic.vesilahus 10 minutiks.
6. Loputatakse veega. Kuivatatakse filterpaberiga.
7. Valatakse üle alkohol + atsetoon $\bar{a}\bar{a}$ seguga.
8. Kuivatatakse filterpaberiga.

Negri kehad on violetsed, ajurakud hallid, ajurakutuomad sinised.

V i i r u s t e k a s v a t a m i n e k a n a e m b r ü o s .

Arenevas kanaembrüos, nii kestadel, ekstraembrüonaal-
ses vedelikus kui ka rebukotis on ideaalsed kasvutingimused
paljudele viirustele. Seega leiavad kanaembrüod kasutamist
viiruste paljundamiseks nii teaduslikus uurimistöös, diag-
nostikas kui ka viirusvaktsiinide valmistamisel.

Viiruste kasvatamiseks valitakse valgete leghorni kana-
de kuni 5 päeva vanad viljastatud munad. Mune inkubeeritakse
küllaldase niiskuse ja hea ventilatsiooni juures termostaa-
dis 37,5 - 38° C juures 5-12 päeva enne nakatamist. Areneva
embrüo vanus on erinev erimeetodite rakendamisel kui ka eri-
nevate viiruste kasvatamisel. Inkubeerimise ajal, enne kui
ka pärast nakatamist, on munad asetatud aukudega varustatud
metallstatiividele püstasendis, tõmbi otsaga ülespoole.

Kanaembrüote nakatamine peab toimuma aseptilistes tingi-
mustes ja steriilses keskkonnas; tavaliselt seda teostatakse
steriilsetes boksides, kusjuures töötajal on steriilne kittel,
naomask, müts ja steriilsed kummikindad. Nakatamiseks vajali-
kud manipulatsioonid sooritatakse steriilsete riistade, nagu
pipettide või süstaldega.

Enne nakatamist valgustatakse kanaembrüod ovoskoobiga
läbi, märgitakse pliiatsiga munakoorele õhuruumi- ja embrüo
asend ja vajaduse korral ka lubikoore avamise koht, näit.
koorionallantoisikestale nakatatud materjali viimisel. Sel

juhul tuleb valida koht lubikoorel, mille all ei ole suuri veresooni.

Kanaembrüot võib viiruste kasvatamiseks kasutada, nii et nakatatakse koorionallantoisi kesta või materjal viiakse allantoisiõõnde, amnioniõõnde, rebukotti, allantoisiveeni või embrüoelundesse, nagu ajju, maksa jne. Sagedamini neist leiavad kasutamist koorionallantoisikesta, allantoisiõõne, rebukoti ja amnioniõõne nakatamine.

Koorionallantoisi kestale viirusliku materjali viimine teostatakse järgmiselt:

Selleks kasutatakse 7-12 päeva vanuseid kanaembrüoid. Läbivalgustamisel märgitakse lubikoorel avamise koht vastavalt eespool mainitud nõuetele. Lubikoor puhastatakse nii avamise kohal kui ka õhuruumi kohal alkoholiga või jood-alkoholiga, a koholi jääk süüdatakse leegil põlema ja kustutatakse kohe. Lubikoor avatakse tavaliselt hambapuuriga karborundketta abil, läbides lubikoore kolmnurgakujuliselt (iga külj umbes 0,5 cm). Siis eemaldatakse lubikoore kolmnurk steriilse nõela abil. Asetatakse kestale 1 tilk steriilset füsioloogilist lahust. Läbitakse nõelaga ettevaatlikult lubikoorealune tihe kest tilga kohal ilma vahenditult selle all olevat koorionallantoisi kesta vigastamata. Füsioloogiline lahus imendub lubikoorealuse kesta ja koorionallantoisi kesta vahelt ja sel kohal tekib kunstlik õhuruum areneva embrüo ümberpaigutuse tõttu kogu ulatuses, nii et täitub loomulik õhuruum. Kui seda ei toimu, siis imetakse loomuliku õhuruumi tehtud väikse ava kaudu pikkamisi kummiballooniga õhk loomulikust õhuruumist, et soodustada muna sisu ümberpaigutust. NÜÜD eraldatakse kolmnurkse ava kohal tihe kest ja selle kolmnurkse ava kaudu viiakse vajalik materjal steriilse pipeti või süstla abil koorionallantoisi kestale 0,05 - 0,1 ml koguses. Kohe peale nakatamist kaetakse ava steriilse kattedklaasiga parafiin-vaseliin segu abil ja viimasega suletakse ka ava loomuliku õhuruumi kohal. Muna inkubeeritakse NÜÜD vajaliku aja kestel edasi asendis, et kunstlik õhuruum on ülal.

Kuna sellel meetodil embrüo ümberasetusega siiski võivad tekkida traumad, embrüod hävivad, on hakatud eelistama

võimaluse korral allantoisi õõnde materjali süstimist, mis on palju lihtsam. Selleks võetakse 10-11 päeva vanused embrüod. Märgitakse õhuruum ja tehakse steriilsesse lubikoosesse vaslava nõelä või naaskliga ava õhuruumi keskohta. Läbi selle ava süstitakse 18-20 mm pikkuse süstlanõelaga, muna vertikaalses asendis olles, vajalik materjal koguses 0,1 ml allantoisi õõnde ja ava suletakse parafiiniga või parafiinvaselliini seguga.

Rebukotti nakatamiseks kasutatakse 5-10 päeva vanuseid embrüoid. Muna asetatakse statiivile, nii et õhuruum jääb paremale ja embrüo alla. Siis süstitakse materjal läbi desinfitseeritud muna lubikoosesse tehtud ava kaudu 3-4 cm pikkuse nõelaga kas läbi õhuruumi keskosa või ülalt alla embrüole vastaspoolt ja viiakse materjal rebukotti koguses 0,2-0,3-1,0 ml.

Viirusliku materjali amnioni õõnde viimiseks kasutatakse 6-11 päeva vanuseid kanaembrüoid. Desinfitseeritud lubikoor avatakse õhuruumi piiril ja eemaldatakse kogu õhuruumi ulatuses. Avatakse ettevaatlikult lubikoorealune kest ja eemaldatakse samuti kogu nähtava osa ulatuses. Fikseeritakse steriilsete pintsettidega ettevaatlikult amnion läbi koorionallantoisi kesta ja silma kontrolli all juba süstitakse materjal tõmbi otsaga nõelaga amnioni õõnde koguses 0,05-0,1 ml. Peale nakatamist suletakse lubikoore ava erilise klaaskuplikesega parafiinvaselliini segu abil. Embrüoid inkubeeritakse edasi püstasendis, õhuruum ülespoole.

Nakatatud kanaembrüoid inkubeeritakse termostaadis 35 - 38° C juures 3-7 päeva kestel, olenevalt uuritavast viiruse liigist. Siis avatakse aseptilistes tingimustes embrüod, eraldatakse koorionallantoisi kest, asetatakse see glütseriinis kahe klaasi vahele ja uuritakse muutusi, mis avalduvad sageli nähtavate valkjate põletikuliste kalletena sellel klaasjal kestal veresoonte ümbruses. Koemuutusi võib uurida ka histoloogiliselt. Viiruse olemasolu ja hulka määratakse embrüonaalseis vedelikes kui ka koorionallantoisi kesta viiruse neutralisatsiooni testiga vastavate immuniseerumite abil. See osa tuleb erimikrobioloogias täp-

semale käsitlesele.

K o e k u l t u u r i d v i i r u s t e k a s v a t a m i s e k s .

Viimasel ajal leiavad viiruste uurimiseks üha sagedamini rakendamist koekultuurid. Enamik viirusi areneb hästi koekultuurides. Koekultuurid on suhteliselt lihtsad käsitada ja kergesti rakendatavad vastavates küllaltki lihtsalt sisustatud viroloogia laboratooriumides.

Viirused arenevad hästi kunstlikes tingimuses, organismist eraldatud kasvavais koerakkudes.

Koekultuuridena leiavad kasutust: 1. Inimese embrüonaalsed koed. Selleks vastav materjal saadakse inimesel terapeutiliseks otstarbeks vajaliku 12-18 nädala vanuse embrüo eraldamisel operatsioonidel. Embrüolt kasutatakse naha-musklikude, kopsukude ja mõnikord ka teisi elundeid.

2. Inimese postnataalseist kudetest leiavad kasutamist operatsioonidel eemaldatud neerukude, testised, tonsillid, prepuutsiumikude, uterus, kilpnääre jne.

3. Eriti sageli kasutatakse koekultuuridena ahvi neerukudet ja testiseid.

4. Viimasel ajal leiavad koekultuuridena kasutamist inimeselt opereeritud pahaloomuliste epiteliaalsete kasvajate eriliselt kohandatud koekultuurid, nagu HeLa ja HeP jne. kultuurid. HeLa kultuur on saanud inimese emakakaela epidermoidkartsinoomist.

Kõige sagedamini kasutatavad koekultuuride meetodid on järgmised:

1. Suspendeeritud koerakkude või koetükikeste kultuur Maitlandi järgi.

Selleks leiavad sagedamini kasutamist inimese embrüonaalsed koed ja ahvi neerukude. Peenustatud koetükikesed asetatakse Erlenmeyeri kolbi suspendeerituna söötmes, lastakse seista 3-4 päeva ja vahetatakse toitelahus enne viirusliku materjali lisamist. Söötmele võib indikaatorina lisada fenoolpunast, mis näitab kaudselt viiruste arengut koekultuuris, sellega et viirus, tungides koerakkudesse, purustab need

ja häirib hapete moodustumise rakkudes, mis väljendub siis pH muutuses.

2. Fikseeritud koerakkude või -tükkide kultuur katsuteis kas liikuvale või statsionaarsel printsiiбил.

Siin kaetakse katsuti seinad hepariniseeritud kana-plasmaga, seejärel asetatakse koetükikesed ühtlaselt laiali katsutisse, lisatakse juurde veidi kanaembrüo ekstrakti, mis koaguleerib plasma ja nii fikseeruvad koetükikesed katsuti seinale. Nüüd lisatakse katsutisse sööde või toitelahus, mida vahetatakse üks kord enne viirusliku materjali lisamist. Sellised koekultuuride katsutid asetatakse liikuva printsiiibi rakendamisel 10-12 korda/tunnis pöörlevasse trumliisse nii enne kui ka pärast viirusliku materjali lisamist. Sel puhul ühob toitelahus pidevalt kultuuri.

Sama fikseeritud koekultuuri võib kasutada ka statsionaarses ehk paigalasendis kasvatamiseks. Sel puhul on katsutid 9° nurga all lüngasendis. Koetükikeste fikseerimiseks katsuti seinale võib kasutada soojendamist 45° C juures. See fikseerib koetükikesed katsuti seinale ja nad püsivad seal ka toitelahuse lisandamisel.

3. Trüpsiiniga töödeldud koerakkude kultuur Dulbecco järgi.

Siin kasutatakse ühekihilist ühtlast (neeru- või testisekoe) koerakkude kihti Petri tassi põhjal. Selle saamiseks asetatakse Petri tassi trüpsiniseeritud koerakkude suspensioon toitelahuses. Kui Petri tassi põhja katab ühtlane ühekihiline koerakkude kiht, siis asetatakse sinna viiruslik materjal väga madalal kontsentratsioonil. Lühikese ajavahe- miku järele kaetakse pinnalt toitelahuseagariga, mis nüüd lokaliseerib viiruse piirkonnas, kus ta nakatas koerakud. Viiruse paljunemisel hävib nakatatud koerakk ühes naabruses olevate koerakkudega 24-48 t. möödumisel ja neile kohtadele jäävad heledad laigud - "negatiivsed kolooniad". Dulbecco järgi tekib selline hele laik ühe viiruseosakese toimel, nii et sel viisil on võimalik tiltrida viirusi, isoleerida viiruse "puhaskultuuri" jne. Sama ühekihilise koekultuuri paljundamist võib teha katsutites, näit. trüpsiniseeritud

ahvi neerukoerakud asetatakse toitelahuses katsuteisse, rakud kinnituvad klaasi seinale ja moodustavad paljunemisel ühekihilise ühtlase katte, mis 6-7 päeva pärast on sobiv viirusega nakatamiseks.

Kõiki neid eelmainitud koekultuure iseloomustab, et nad ühekordselt valmistatakse ette viiruste paljundamiseks, sealjuures neid samu koekultuure ei säilitata järgnevateks töödeks korduvate külvipassaažide kaudu.

4. Mitmesugused inimpäritoluga rakkude koekultuurid, mida säilitatakse laboratooriumis in vitro kasvatamisel ja kasutatakse vajadusel viiruste paljundamiseks.

Sellisel leiavad kasutamist trüpsiiniga eraldatud koerakud, mida kasvatatakse ühekihilise kultuurina kas katsutis või kolvis. Enne järgnevat passaaži tavaliselt eraldatakse ühtlase kihina kasvavad rakud trüpsiiniga ja rakkude suspensioon toitelahuses annab järgmises passaažis jällegi uuesti ühekihilise koerakkude kasvu vastaval pinnal ehk madratsil. Niisugusena paljundatavad koekultuurid on näit. inimeselt eraldatud emakakaela epidermoidvähi rakkude kultuur HeLa jne.

Organismist steriilselt eraldatud koed lõigatakse ja peenustatakse suurtes ümara põhjaga nõudes 1-2 mm läbimõõduga tükikesteks. Kuivamise vältimiseks lisatakse nõusse puhversoolade lahust. Sellist koesuspensiooni võib säilitada 5^o C juures isegi 19-29 päeva kestel.

Vähksematest koeosakestest ja rakkudest valmistatakse suspensioon vastavas sötmes ja kasvatatakse kas katsutites või lamedate külgedega kultuuripudelites, mis on suletud õhukindlalt kummikorkidega. Koekultuuri võib kasvatada 2-4 nädalat 35-36^o C juures, kui vahetada söödet 3-5 päeva järele.

Klaasipind ise võib esineda koekultuurile kasvuks vajaliku madratsina. Klaasmadratsilt eemaldatakse selline koekultuur, nii et rakud eraldatakse trüpsiinilahusega või verseeniga (etüleeni-diamiini-tetra-atseethappega), mis asetatakse kultuuripinnale, ja 37^o C juures loksutatakse katsutit käes 30 minuti kestel. Siis eralduvad üksikud rakud, ja tsentri- fuugimisel 10 minutiga 200-1000 t/min. eraldatakse vedelik.

Saadud rakud suspendeeritakse Hanksi puhverlahusesse ja söötme lisandamisel asetatakse edasi uutesse nõudesse kasvama.

Rakkude arv määratakse lugemisel hemotsütomeetri abil ja tihedus edasikülviks peab olema 150 000 - 300 000 rakku/ml. Kui seda rakkude suspensiooni kasvatada 4-5 päeva, siis areneb klaasmadratsil ühtlane ühekihiline kultuur. Rakukihi kasvu võib kontrollida mikroskoobis nõrga suurendusega.

Elundirakke kasvatatakse esialgselt söötmes, mis sisaldab 50% inimese seerumit, 2% kanaembrüo ekstrakti ja 48% Hanksi lahust pH juures 7,4. Hanksi lahuse koostis on järgmine: A lahus: 160 g NaCl, 8 g KCl, 4 g MgSO₄·7 H₂O lahustatud 800 ml vees ja siis 100 ml vees lahustatud 2,8 g CaCl₂ segada ning lisada vett kuni 1000 ml-ni. Seda lahust säilitatakse 2 ml kloroformi lisamise järel 5° C juures.

B lahus: 3,04 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 1,2 g KH₂PO₄ ja 20 g glükoosi lahustatud 800 ml vees, lisada 100 ml 0,4%-list fenoolpunase-lahust ja vett kuni 1000 ml-ni ning 2 ml kloroformi. Võetakse 1 osa A ja 1 osa B lahust ja 18 osa vett, segatakse, filtritakse läbi bakterite kurna ja enne kasutamist lisatakse steriilset 1,4%-list NaHCO₃ lahust 2,5 ml iga 100 ml Hanksi lahuse kohta.

Koekultuuride söötmeina on kasutusel peale inimese vere-seerumi veel teised toitelahused, näit. lisatakse söötmele 5%-list laktalbumiinhüdrolüsaati ja 10% vasika seerumit Hanksi lahuses.

Süntetilised söötmed HeLa kultuuride kasvatamiseks on sageli väga keerulise koostisega, näit. Eagle' lahus sisaldab 13 amiinohapet ja 8 vitamiini; sellele lisatakse 10% inimese seerumit.

Viimasel ajal lelab edukat kasutust sööde nr.199, mis oma keerulise koostise tõttu sageli valmistatakse kesklaboratooriumis ja on saadaval tööks niiõelda valmissöötmena. Selle tõttu on teda praktiliselt lihtne kasutada koekultuuride kasvatamiseks.

Viirust paljundatakse koekultuurides 5-10 päeva.

Viiruste olemasolul koekultuurides tekib tsütopatoogeenne efekt - koerakkude degeneratsioon. Sel juhul ei moodusta rakud

ühtlast kihti madratsil, puuduvad rakkudevahelised sillakesed, rakud on muutunud kujuga, eemalduvad madratsilt, raku-
tuumad on püknootilised. Tsütopatogeense efekti järgi saab
määrata viiruse arengut üldse koekultuuris, kuid mitte seda,
millise viiruse liigiga on tegemist.

Viiruse liiki on võimalik määrata või viirust samastada,
lisades koekultuurile juurde vastavaid immuunseerumeid tsütö-
patogeense efekti vältimiseks. Ainult vastav tüübispetsiifi-
line seerum neutraliseerib viiruse koerakke kahjustavaid oma-
dusi.

R i k e t s i a t e m o r f o l o o g i a.

Riketsiad on bioloogiliselt asetusest vahepealsed väikes-
tele bakteritele ja suurematele viirustele. Nad sarnanevad
viirustega selle poolest, et arenevad elusates koerakkudes,
kuid erinevad sellega, et kasvavad lüliljalgsete seedetraktis,
tehes läbi seal teatud arenguastme. Bakteritele on nad sar-
nased, kuna on kindla kujuga ja küllaltki suured - nähtavad
tavalises mikroskoobis.

Oma kujult meenutavad riketsiad kokkobaktereid, on kera-
jad või ovaalsed moodustised, mille mõõdud on $0,25 \times 0,35 \mu$,
kuid võib esineda ka suuremaid vorme. Nad on asetatud kas
üksikult, paarikaupa või lühikestes ahelates, värvuvad gram-
negatiivselt. Romanovski-Giemska järgi värvuvad nad purpur-
punaselt. Samuti võib neid värvida Macchiavello järgi. Nende
täpsemat kuju ja ehitust saab määrata elektronmikroskoobili-
sel uurimisel.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Õppida tundma rõugevaktsiini viiruse elementaarkehakesi,
pimeväljameetodi järgi demonstreeritavas preparaadis.
2. Õppida tundma rõugevaktsiini viiruse elementaarkehakesi
Pascheni järgi värvitud ja demonstratsiooniks välja-
pandud preparaadis.
3. Rõugevaktsiini viiruse elementaarkehakestega tutvuda de-
monstratsiooniks väljapandud preparaatides Fontana ja

Macchiavello järgi värvitult.

4. Koera ajust tehtud valmispreparaat värvida Muromtsevi meetodi järgi ja uurida viiruse inklusioonkehakesi.
5. Jälgida demonstratsiooni kanaembrüote nakatamisest rõugevaktsiini viirusega koorionallantoisi kestale ja rebukotti.
6. Jälgida demonstratsiooniks esitatud rõugevaktsiini viirusega nakatatud koorionallantoisi kestal olevaid muutusi.
7. Jälgida demonstratsiooni korras normaalse koekultuuri kasvu ja viiruse põhjustatud tsütopatogeenset efekti koekultuuris.
8. Tutvuda demonstratsiooniks väljapandud Rickettsia pro-wazekii kujuga Romanovski-Giemsä järgi värvitud preparaadis.

XVI p r a k t i k u m.

T e e m a: BAKTERIAALSED PREPARAADID.

Nakkushaiguste spetsiifilises ravis, profülaktikas ja diagnoosimisel kasutatakse väga mitmesuguseid bakteriaalseid preparaate. Nende tootmiseks on Nõukogude Liidus loodud terve võrk nn. vaktsiinide ja seerumite teadusliku uurimise instituute. Kõiki selliste instituutide poolt toodetavaid bakteriaalseid preparaate kontrollitakse enne turustamist Moskväs asuvas L.A.Tarasevitši nimelises Riiklikus Meditsiiniliste ja Bioloogiliste Preparaatide Kontrollinstituudis. Selline kontrollsüsteem tagab ainult teatud kindlatele nõuetele vastavate preparaatide turustamise. Peale igapäevase tootva töö tegelevad instituudid ka teadusliku uurimistööga, mille põhiliseks eesmärgiks on üha efektiivsemate preparaatide loomine ja nende skilitatavuse paremustamine.

Bakteriaalseid preparaate turustatakse klaasampullides ja pudelites. Iga ampull või pudel peab olema varustatud etiketiga, millel on märgitud preparaati valmistanud instituut, preparaadi nimetus, hulk, seeria number, riikliku kontrolli kuupäev ning number ja kuupäev, milleni on tagatud preparaadi tarvitamiskõlblikkus.

Säilitama peab bakteriaalseid preparaate 4° C juures kuivas pimedas kohas. Kõige parem on selleks kasutada külmustkappi.

Bakteriaalsete preparaatide säilitatavuse parendamiseks turustatakse neid sageli veetustatult. Veetustamist teostatakse lüofiliseerimismenetluse abil, mille puhul ainete veetustamine toimub külmutatult vaakumis.

Enne bakteriaalse preparaadi kasutamist tuleb hoolikalt kontrollida, kas ampull või pudel on terve ja preparaat pole aegunud.

Bakteriaalseid preparaate võib jagada ravi-profülaktilisteks ja diagnostilisteks preparaatideks.

Ravi-profülaktilised preparaadid.

Ravi-profülaktiliste preparaatide hulka kuuluvad vaktsiinid, ravi-profülaktilised seerumid ja bakteriofaagid.

Vaktsiine liigitatakse elusvaktsiinideks, surmatud vaktsiinideks, keemilisteks vaktsiinideks ja anatoksiinideks.

Elusvaktsiinidena kasutatakse nii mikroobe, mis pole virulentsed vaktsineeritavale loomaliigile või inimesele (näiteks rõugevaktsiin), kui ka vähendatud virulentsusega (attenueeritud) mikroobe. Elusvaktsiinide valmistamiseks kasutatavate tüvede virulentsust on vähendatud väga mitmesugusel viisil. Calmette ja Guérin said oma kuulsa tuberkuloosivaktsiini BCG, kasvatades virulentset *Mycobacterium bovis*'e kultuuri 13 aastat sappi sisaldaval kartulsöötmel. Pokrovskaja toimis katku vaktsiini saamisel *Pasteurella pestis*'e kultuurile spetsiifilise bakteriofaagiga, Elbert ja Gaiski tulareemia vaktsiini saamisel *Pasteurella tularensis*'e kultuurile aga spetsiifilise immuunseerumiga. Rida vaktsiine on saadud virulentsete mikroobide korduvate passaažide tule-

musena läbi vastuvõtmatute katseloomade organismi - näiteks marutõve ja gripi vaktsiinid.

Surmatud vaktsiinide valmistamisel toimitakse mikroobidele formaliiniga või kuumutatakse neid 56-60° C juures. Viimasel ajal kasutatakse mikroobide surmamiseks ka ultraviolettkiiri ja ultrahelilaineid. Surmatud vaktsiinidest kasutatakse düsenteeria, kõhutüüfuse, koolera, läkakõha, tähnilise soetõve, puugientsefaliidi jt. vaktsiine.

Keemilised vaktsiinid ei sisalda terveid mikroobirakke, vaid ainult nendest saadud spetsiifilisi antigeene. Tuntu- maks keemiliseks vaktsiiniks on Aleksandrovi ja Hefeni polü- vaktsiin NIISI, mis sisaldab kõhutüüfuse tekitaja Salmonella typhi, paratüüfuste A ning B tekitajate Salmonella paratyphi A ning Salmonella paratyphi B, düsenteeria tekitajate Shigella flexneri ning Shigella sonnei ja koolera tekitaja Vibrio comma spetsiifilisi antigeene, samuti teetanuse tekitaja Clostridium tetani anatoksiini.

Anatoksiinidest on tuntumad teetanuse ja difteeria anatoksiinid.

Vaktsiine liigitatakse veel monovaktsiinideks, divaktsiinideks, trivaktsiinideks jne. vastavalt sellele, kui mitme nakkushaiguse tekitajaid või nende antigeenseid komponente vaktsiinid sisaldavad.

Tüvede päritolu järgi liigitatakse vaktsiine ka autovaktsiinideks ja heterovaktsiinideks. Autovaktsiinideks nimetatakse vaktsiine, mis on valmistatud sama indiviidi organismist isoleeritud mikroobidest, kelle vaktsineerimiseks seda vaktsiini kasutatakse. Autovaktsiinid on väga efektiivsed, kuid nende laialdast kasutamist piiravad tehnilised raskused.

Ravi-profülaktiliste seerumitena kasutatakse meditsiinis loomseid immuunseerumeid ja rekonvalesentsentide ning vastavat nakkushaigust kunagi põdenud inimeste seerumeid. Viimaseid võib kasutada ainult siis, kui tegemist on nakkushaigusega, mille läbipõdemisel antikehad säilivad elu lõpuni. Hiljuti on hakatud kasutama ka seerumitest saadavat γ -globuliini, mis annab veel paremaid tulemusi. See on tingitud sellest, et γ -globuliini manustamisega viiakse organismi põhiliselt

ainult antikeyhi, seerumi süstimisega aga satuivad sinna sageli ka kahjulikult mõjuvad teised ained.

Loomsete immuunseerumite saamiseks immuniseeritakse loomi vastavate haiguste tekitajatega. Loomadest on selleks sobivaimad hobused, andes hulgaliselt kõige enam seerumit.

Ravi-profülaktilisi seerumeid liigitatakse antitoksilisteks, antibakteriaalseteks ja antiviiiruslikeks seerumiteks. Antitoksilisi seerumeid kasutatakse näiteks difteeria ja tetanuse raviks ning profülaktikas. Antibakteriaalseid ja antiviiiruslike seerumeid kasutatakse käesoleval ajal põhiliselt ainult nakkushaiguste profülaktikas, näiteks katku, puugientsefaliidi, leetrite jne. nakkushaiguste puhul.

Bakteriofaagid kuuluvad samuti esijoones just profülaktiliste bakteriaalsete preparaatide hulka. Nii näiteks on üldtunnustatud efektiivseteks profülaktilisteks preparaatideks düsenteeria, kõhutüüfuse ja koolera bakteriofaagid.

Diagnostilised preparaadid.

Diagnostilisi bakteriaalseid preparaate võib liigitada nakkushaiguste seroloogilisel diagnoosimisel, mikroobide samastamisel ja allergiliste nahareaktsioonide teostamisel vajalikeks preparaatideks.

Nakkushaiguste seroloogilisel diagnoosimisel on vajalikud mitmesugused diagnostikumid ja antigeenid, mida põhiliselt kasutatakse aglutinatsiooni- ja komplemendi sidumise reaktsioonides.

Diagnostikumid kujutavad endast kindla kontsentratsiooniga surmatud mikroobirakkude suspensioone. Need suspensioonid ei tohi peale loksutamist sisaldada mingisuguseid helbeid ega terakesi, mis võiksid jäljendada positiivset aglutinatsioonireaktsiooni. Antigeene valmistatakse mikroobirakkudest, samuti patoloogiliselt muutunud või normaalsetest kudedest. Normaalsetest kudedest valmistatakse näiteks süüfilise seroloogilisel diagnoosimisel (Wassermanni reaktsioonis) kasutatavaid antigeene.

Mikroobide samastamisel on vajalikud mitmesugused diagnostilised seerumid ja bakteriofaagid. Diagnostilisi seeru-

meid kasutatakse aglutinatsiooni, pretsipitatsiooni ja komplemendi sidumise reaktsioonides. Diagnostilisi seerumeid saadakse loomadelt neid vastavate mikroobidega immuniseerides. Viimasel ajal on hakatud valmistama nn. fluorestseerivaid antikehi, s.t. fluorestseerivate värvainetega (fluorokroomidega) märgistatud antikehi. Selliste antikehadega on luminescentsmikroskoobi abil mikroobe võimalik sedastada ja samastada vahetult uuritavas materjalis. Vahetult uuritavas materjalis on mikroobe võimalik sedastada ja samastada ka bakteriofaagi tiitri tõusu reaktsiooni abil, milleks kasutatakse spetsiifilisi diagnostilisi bakteriofaage. Samade bakteriofaagidega on võimalik samastada uuritavast materjalist isoleeritud mikroobe.

Allergilisteks nahareaktsioonideks kasutatakse allergeene, mis kujutavad endast mitmesuguste menetlustega saadud mikroobide koostisosi ja ainevahetusprodukte. Neist tuntumad on tuberkuliin, brutselliin, tulariin, malleiin ja mõningad teised, mida kasutatakse vastavalt tuberkuloosi, brutselloosi, tulareemia ja malleuse diagnoosimisel.

Autovaktsiini valmistamine.

Autovaktsiine kasutatakse tavaliselt siis, kui pole saadud rahuldavaid ravitulemusi kemoterapeutiliste ja antibiootiliste preparaatidega, samuti heterovaktsiinidega. Sageli on sellisteks juhtudeks ravimresistentsete kokkide poolt tekitatud mädapõletikud.

Autovaktsiini valmistamisametoodika on järgmine:

1. Mädakolle töödeldakse alkoholiga ja avatakse steriilse skalpelliga. Mäda võetakse külvinõelaga terve ning nekrootilise koe piirilt ja külvatakse tüvede isoleerimiseks veri- või lihapeptonagarplaatidele. Külvid paigutatakse 24 tunniks termostaati 37° C juures.

Luubi abil valitakse 2-3 tüüpilist pesa ja valmistatakse neist preparaadid. Viimased värvitakse Grami järgi ja uuritakse mikroskoobiliselt. Kui pesad koosnevad ainult kokkidest, tehakse neist külvid neljale lüngagarile. Külvid paigutatakse 24 tunniks termostaati 37° C juures.

Längagaril kasvanud kultuuride puhtust kontrollitakse samuti Grami järgi värvitud preparaate mikroskoobilisel uurimisel. Kui tegemist on puhaskultuuridega, on need vakt-siini valmistamiseks kõlblikud.

2. Mikroobide suspensiooni saamiseks pipeteeritakse igale längagarile 2 ml steriilset füsioloogilist keedusoola-lahust. Katsutid asetatakse 15 minutiks längasendisse sel-liselt, et vedelik kataks söötme pinna. Eraldunud kultuurid pestakse söötmelt maha katsuteid ükshaaval peopesade vahel edasi-tagasi rullides. Üksikutelt längagaritelt saadud mik-roobide suspensioonid pipeteeritakse ühte steriilsesse kat-sutisse, vältides seejuures söötme vigastamist pipetiga.

3. Mikroobide surmamiseks kuumutatakse suspensiooni 60 minuti vältel vesivannis 60° C juures. Peale kuumutamist tehakse suspensioonist külviaasaga kontrollkülv lihapeptoon-puljongisse ja paigutatakse see 72 tunniks termostaati 37° C juures. Kontrollkülv tulemuste selgumiseni säilitatakse mikroobide suspensiooni külmutuskapis. Kui kontrollkülvis pole kasvu, on suspensioon valmis. Kasvu korral kuumutatakse suspensiooni uuesti vesivannis 60° C juures, kuid ainult 30 minuti vältel. Peale kuumutamist tehakse jälle kontrollkülv, milles ei tohi olla kasvu. Tarbekorral kuumutatakse suspensi-ooni teistkordselt 30 minuti vältel.

4. Surmatud mikroobide suspensioonist valmistatakse vakt-sineerimiseks kasutatavad lahjendused, s.t. standardiseeri-takse vaktsiin ja lisatakse konservandina karbolhapet. Kirjel-datud viisil valmistatud suspensioon sisaldab umbes 25 mil-jardit mikroobirakku ühes ml-s. Vaktsineerimiseks on otstar-bekohane kasutada kolm autovaktsiini lahjendust: 500 miljo-nit, 2,5 ja 5 miljardit mikroobirakku 1 ml-s. Need lahjendu-sed valmistatakse järgmise skeemi kohaselt:

Autovaktsiini lahjendus	Algsuspensiooni ml-tes	Füsioloogilist keedusoolala - must ml-tes	5%-list karbhapet ml-tes
500 miljonit mikroobirakku 1 ml-s	0,2	8,8	1,0
2,5 miljardit mikroobirakku 1 ml-s	1,0	8,0	1,0
5 miljardit mikroobirakku 1 ml-s	2,0	7,0	1,0

Valmis autovaktsiini lahjendust on kõige otstarbekohasem säilitada steriilsetes penitsilliinipudelites.

Olgu mainitud, et vaktsiinide standardiseerimisel kasutatakse kõige sagedamini nn. hägususe standardeid, samuti nefelomeetrilist meetodit. Tarbekorral võib kasutada vere või seljaajuvedeliku rakuliste elementide lugemiskambreid. Tarvilikud vaktsiinide kontsentratsioonid võivad olla erinevad.

5. Autovaktsiini manustamisskeem võib olla mitmesugune. Alati alustatakse aga vaktsineerimist väiksemate vaktsiiniannustega, neid järk-järgult tõstes. Süstitakse autovaktsiini naha alla. Eespool toodud autovaktsiini kontsentratsioonide juures võib kasutada järgmist manustamisskeemi:

Vaktsi- neeri- mis- päev	Vaktsii- ni lah- jendus	Vakt- siini hulk ml-tes	Vakt- sinee- rimis- päev	Vaktsii- ni lah- jendus	Vakt- siini hulk ml-tes	Vaktsi- neeri- mis- päev	Vakt- siini lahjen- dus ml	Vaktsii- ni hulk ml-tes
1	500 mil- jonit	0,1	15	2,5 mil- jardit	0,2	29	5 mil- jardit	0,4
3	"	0,2	17	"	0,4	31	"	0,5
5	"	0,3	19	"	0,4	33	"	0,6
7	"	0,4	21	"	0,6	35	"	0,7
9	"	0,6	23	"	0,6	37	"	0,8
11	"	0,8	25	"	0,8	39	"	0,9
13	"	1,0	27	"	0,8	41	"	1,0

Autovaktsiini manustamisele ei tohi järgneda tugevat kohalikku või üldist reaktsiooni.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Demonstratsiooni korras tutvuda mitmesuguste bakterioloogiliste preparaatidega.
2. Demonstratsiooni korras tutvuda autovaktsiini valmistamisega.

K I R J A N D U S .

- Schlossmann, K., Üldine mikrobioloogia ja immuunsusõpetus, Tartu 1940.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7. Edition, Baltimore 1957.
- Doerr, R., Hallauer, C., Handbuch der Virusforschung, Wien 1939.
- Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases 2. Edition, American Public Health Association, New York 1956.
- Heinrich, H., Grundriss der Bakteriologie und Serologie, Jena 1959.
- Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria 9. Edition, Geneva N.Y. 1948.
- Martinek, R., Bakteriologisch-serologisches Praktikum Jena, 1958.
- Oginsky, E.L., Umbreit, W.W., Introduction to Bacterial Physiology, San Francisco 1959.
- Rhodes, A.J., and Rooyen, C.E., Textbook of Virology, Baltimore 1953.
- Zinsser Bacteriology, 11. Edition, New York 1957.
- Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity 4. Edition, London 1957.
- Wildfuhr, G., Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie Teil I, Leipzig 1959.
- Доссе Ж., Иммуногематология, Медгиз, Москва, 1959.
- Елкин И.И., Курс эпидемиологии, Медгиз, Москва, 1958.
- Зилбер Л.А., Основы иммунологии, Медгиз, Москва, 1958.

- Кашкин П.Н.,
Лебедева М.Н., Микробиология, Медгиз, Москва, 1958.
Руководство к практическим занятиям
по медицинской микробиологии, Медгиз,
Москва, 1955.
- Пронин И.В., Пособие к практическим занятиям по
медицинской микробиологии, Томск,
1958.
- Розанов Н.И., Микробиологическая диагностика
заболеваний сельскохозяйственных
животных, Сельхозиздат, Москва, 1952.
- Сахаров П.П., Метелкин А.И. и Гудкова Е.И., Лабораторные
животные, Медгиз, Москва, 1952.
- Синай Г.Я. и Биргер О.Г., Микробиологические методы
исследования при инфекционных
заболеваниях, Медгиз, Москва, 1949.
- Тец В.И., Санитарная микробиология, Медгиз,
Ленинград, 1958.
- Тимаков В.Д. и Гольдфарб Д.М., Основы экспериментальной
медицинской бактериологии, Медгиз,
Москва, 1958.
- Шубладзе А.К. и Гайдамович С.Я., Краткий курс практи-
ческой вирусологии, Медгиз, 1954.

S i s u k o r d .

	EESÕNA	3
S. Laanes		
I	praktikum LABORATOORIUMIS TÖÖTAMISE KORD JA LABORATOORIUMI SISUSTUS . .	5
II	praktikum BAKTERITE VÄRVIMINE JA NENDE MORFOLOOGIA	20
III	praktikum BAKTERITE EHITUS	28
IV	praktikum MIKROORGANISMIDE MORFOLOOGIA .	34
V	praktikum MIKROOBIDE FÜSIOLOOGIA	43
E. Tallmeister		
VI	praktikum PUHASKULTUURI ISOLEERIMINE. ÕHU JA VEE MIKROBIOLOOGILINE UURIMINE	55
VII	praktikum VEE MIKROBIOLOOGILINE UURIMINE. MIKROOBIDE KEEMILINE AKTIIVSUS.	68
VIII	praktikum MIKROOBIDE KEEMILINE AKTIIVSUS.	82
IX	praktikum INIMESE KEHA JA MAAPINNA MIK- ROFLOORA UURIMINE MIKROOBIDE HINGAMINE. HAPPE- KÄÄRIMISED	92
X	praktikum INIMESE KEHA JA MAAPINNA MIK- ROFLOORA. UURIMINE. MIKROOBI- DE FÜSIOLOOGIAALASTE KÜSIMUS- TE KORDAMINE	100
A. Lenzner		
XI	praktikum VÄLISKESKKONNA TEGURITE TOIME MIKROOBIDELE	101
XII	praktikum INFEKTSIOON	113
XIII	praktikum IMMUUNSUSREAKTSIOONID.	128
XIV	praktikum IMMUUNSUSREAKTSIOONID.	141
S. Laanes		
XV	praktikum FILTREERUVATE VIIRUSTE MORFO- LOOGIA JA KASVATAMINE	151
A. Lenzner		
XVI	praktikum BAKTERIAALSSED PREPARAADID. . .	163
	Kirjandus	173

Hind 33 kop.