TRÜ

E. TALLMEISTER, S. LAANES,
A. LENZNER JA H. JAAKMEES

LABORATOORSED TÖÖD MIKROBIOLOOGIAS

II

TARTU 1961

A-23772

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL
MIKROBIOLOOGIA, NAKKUSHAIGUSTE JA
DERMATOLOOGIA KATEEDER

E. TALLMEISTER, S. LAANES,
A. LENZNER JA H. JAAKMEES

LABORATOORSED TÖÖD MIKROBIOLOOGIAS II

TARTU 1961

Тартуский государственный университет
ЭССР, г. Тарту, ул. Юликооли, 18
Е. Таллмейстер, С. Лаанес, А. Ленцнер
и Х. Яаакмеес

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ II

На эстонском языке

Arh.
Tartu Riiklik Ülikool
Raamatukogu
101

Vastutav toimetaja E. Tallmeister
Korrektor E. Oja

TRÜ rotaprint 1961. Trükipoognaid 13.
Tir. 600 eks. MB 05791. Tell. nr. 566.

Hind 39 kop.

E e s s õ n a .

Erimikrobioloogia praktikum käsitleb neid mikrobioloogilisi uurimisi, mis leiavad rakendamist mitmesuguste erinevate nakkushaiguste diagnoosimisel. Mikrobioloogiline diagnoos haarab kompleksselt kõiki uurimismeetodeid, mis on seotud haigusetekitaja mikroobi isoleerimise ja samastamisega, samuti ka tema põhjustatud spetsiifiliste reaktsioonide kindlakstegemisega nakatatud organismis. Siia kuuluvad mikroskoobiline uurimine, haigusetekitaja isoleerimine kunstlikel söötmeil seroloogiline ja bioloogiline meetod, allergilised nahatestid jne. Uuritavast materjalist isoleeritud mikroobi täpsema samastamise käik, nagu see eriti toimub tundmata või atüüpilise bakteriliigi avastamisel, on üldise skeemina esitatud raamatu lõpus asuvas lisas 1.

Erimikrobioloogia praktikumis tutvustatakse kõigi tähtsamate patogeensete mikroobiliikide isoleerimise ja samastamise käiguga. Seejuures on üksikute bakteriliikide klassifitseerimisel põhimiselt aluseks võetud Bergey' mikroobide määraja 7. väljaanne, seente osas P. Frágneri esitatud jaotus ja algloomade osas C. M. Wenyoni ja O. Jirovec'i andmed.

Mikroobide üldise klassifikatsiooni tabel on samuti esitatud raamatu lõpus asuvas lisas 2.

I praktikum.

Teema: PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Gram-positiivsetest kokkidest tekitavad inimesel kõige sagedamini mitmesuguseid haigusprotsesse stafülokokid, streptokokid ja pneumokokid, gram-negatiivsetest kokkidest aga gonokokid ja meningokokid.

Stafülo- ja streptokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogiline diagnoos.

Stafülokokid ehk kobarkokid on kerasarnased mikroobid, mis oma asetuselt meenutavad viinamarjakobaraid. Nad on grampositiivsed, liikumatud, eoseid ei moodusta, kasvavad hästi lihtsöötmeil.

Stafülokokid kuuluvad Genus Staphylococcus'esse ja Genus Peptococcus'esse. Genus Staphylococcus hõlmab fakultatiivselt anaeroobseid, Genus Peptococcus aga obligaatselt anaeroobseid stafülokokke.

Genus Staphylococcus'esse kuulub kaks liiki:

1) Staphylococcus aureus ja
2) Staphylococcus epidermidis.

Tavaliselt on Staphylococcus aureus - kuldkollane stafülokokk - inimpatogeenne, Staphylococcus epidermidis aga normaalsesse naha mikrofloorasse kuuluv saprofüüt. Staphylococcus

aureus võib kasvada ka valgete või sidrunkollaste pesadena.

Patogeensete stafülokokkide diferentsimine saprofüütsetest on suure praktilise tähtsusega mitmesuguste haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel, võimaldades eristada tõelist haigusetekitajat uuritavasse materjali juhuslikult sattunud mikroobidest. Sageli nõuab mikroobide patogeensuse määramine mitmesuguseid loomkatseid, patogeenseid stafülokokke saprofüütsetest on aga võimalik eristada in vitro. Nimelt moodustavad tavaliselt ainult patogeensed stafülokokid

1) kuldkollast pigmenti,
2) hemolüsiini (stafülolüsiini),
3) stafülokinaasi (koagulaasi),
4) hüaluronidaasi,
5) fosfataasi,
6) manniiti lõhustavat fermenti ja
7) želatinaasi.

Tuleb silmas pidada, et iga patogeenne tüvi ei pea evima just kõiki patogeensetele stafülokokkidele iseloomulikke tunnuseid - tähtsaimaks kriteeriumiks tüve patogeensuse hindamisel on stafülokinaasi moodustamine. Praktiliselt määratakse veel pigmenti ja hemolüsiini, harvemini aga fosfataasi, želatinaasi, samuti manniidi lõhustamist.

Stafülokokid tekitavad furunkleid, karbunkleid, abstsesse, mastiite, panariitsiume, osteomüeliite, jmt. mädapõletikke, samuti võivad nad põhjustada raskekujulist septitseemiat, gastroenteriiti. Stafülokokid võivad olla ka tüsistuste tekitajaiks mitmesuguste nakkushaiguste puhul (gripp, rõuged, aktinomükoos jne.).

Genus Peptococcus'esse kuuluvad stafülokokid põhjustavad sünnitusjärgset sepsist, siis endometriiti, vaginiiti, tsüstiiti, peritoniiti jt. põletikulisi protsesse.

Streptokokid ehk ahelkokid on kerasarnased mikroobid, mis oma asetuselt meenutavad pärlikeed. Nad on gram-positiivsed, liikumatud, eoseid ei moodusta, söötmete suhtes, võrreldes stafülokokkidega, nõudlikumad, kasvades paremini verd, seerumit, astsiitvedelikku, samuti glükoosi sisaldavail sööt-

meil. Valdav enamik streptokokke on fakultatiivsed anaeroobid ja kuuluvad Genus Streptococcus'esse.

Veriagaril kasvades põhjustavad ühed streptokokid täieliku söötme selginemise - nn. β-hemolüüsi, teised vaid osalise söötme selginemise ja selle värvumise rohekasmustaks - nn. α-hemolüüsi, kolmandad aga jätavad söötme muutumatuks. Viimasel juhul räägitakse nn. γ-hemolüüsist. Vastavalt streptokokkide kasvule veriagaril eristati:

1. Streptococcus haemolyticus (põhjustab β-hemolüüsi),
2. Streptococcus viridans (põhjustab α-hemolüüsi),
3. Streptococcus anhaemolyticus (põhjustab γ-hemolüüsi).

Lancefieldi järgi jaotatakse üksikud streptokokkide liigid 15 seroloogilisse gruppi, võttes aluseks pretsipitatsioonireaktsioonis sedastatavaid grupispetsiifilisi polüsahhariide. Vastavaid seroloogilisi gruppe tähistatakse ladina tähestiku suurte tähtedega: A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P ja Q. Mõned streptokokid ei sisalda grupispetsiifilisi polüsahhariide ja seisavad seetõttu klassifikatsioonis väljaspool gruppe. Olgu mainitud, et ainult seroloogiline grupp A hõlmab umbes 40 streptokokkide tüüpi.

Arstiteaduslikus mikrobioloogias on kõige tähtsam seroloogiline grupp A, kuhu kuulub β-hemolüüsi põhjustav Streptococcus pyogenes. See mikroob on flegmoonide, panariitsiumide, mastiitide, roosi, angiinide jt. mitmesuguste põletike ja mädapõletike tekitajaks. Samasse seroloogilisse gruppi kuuluvad ka sarlakite puhul kurgulimast kõige sagedamini isoleeritavad streptokokid.

Streptococcus pyogenes võib anda nn. mukoosusvormi, mis mikroskoopiliselt iseloomustub kihnudega, veriagaril aga limajalt niiskete pesadega. See vorm vastab varem iseseisva liigina käsitletud Streptococcus mucosus'ele ja võib põhjustada ka α-hemolüüsi. Mukoosusvormi tuleb diferentsida pneumokokkide III tüübist (vt. II praktikum).

Seroloogilisse gruppi D kuuluvaid streptokokke nimetatakse enterokokkideks. Morfoloogiliselt meenutavad nad pneumokokke, asetudes sageli paarikaupa. Enterokokke iseloomustab suur

resistentsus: nad taluvad kuumutamist 30 minuti vältel 60°C juures, kasvavad 0,65 % NaCl sisaldavates, samuti tugevasti leelistes (pH 9,6) söötmetes, 40%-lisel sappveriagaril, 0,1%-lises metüleensinisepiimas. Nende kasv toimub 10 - 45°C juures. Enterokokid kuuluvad inimese sooletrakti normaalsesse mikrofloorasse, kuid võivad olla ka tsüstiidi, püeliidi, peritoniidi, enteriidi, isegi alaägeda endokardiidi jt. põletikuliste haigusprotsesside tekitajaiks.

Väljaspool seroloogilisi gruppe seisev α -hemolüüsi põhjustav Streptococcus viridans on üheks sagedasemaks endocarditis lenta tekitajaks. Pesitsedes suukoopas ning ninakurguruumis, tungib see mikroob verre ja juba sekundaarselt kutsub esile südame sisekesta põletiku.

Esineb ka obligaatselt anaeroobseid streptokokke, mida ühendatakse Genus Peptostreptococcus'esse. Need streptokokid võivad olla mitmesuguste gangrenoossete põletikuliste haigusprotsesside tekitajaiks.

Stafülo- ja streptokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse põhiliselt haigusetekitaja isoleerimist ja mikroskoobilisi, harvemini aga bioloogilisi ja seroloogilisi uurimismeetodeid.

Uuritav materjal.

Sagedasemaks uurimismaterjaliks on mäda, kurgulima ja veri, harvemini uriin ja roe.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobiliselt uuritakse mäda, kurgulima ja uriini (vt. Laboratoorsed tööd mikrobioloogias I, lk. 125: Mäda mikroskoobiline uurimine). Vere ja rooja mikroskoopia tulemusi ei anna. Mädast, kurgulimast ja uriini tsentrifugeerimisel (20 - 25 minutit 3500 tiiru juures minutis) saadud sademest valmistatakse kaks preparaati ja värvitakse neist ühte Grami, teist Ziehl-Neelseni järgi.

Stafülokokid võivad preparaadis asetuda tüüpiliste kobaratena, kuid ka üksikult, paarikaupa ja väikeste 3 - 5 rakust koosnevate rühmadena. Värske haigusprotsessi puhul paigutub enamik stafülokokke ekstratsellulaarselt, hiljem nad aga fagotsüteeritakse. Streptokokke võib leida pärlikeena, 3 - 4 rakust koosnevate ahelatena, väikeste rühmadena, paarikaupa ja üksikuina. Ka streptokokid võivad paigutuda intratsellulaarselt. Mikroskoobiliselt ei õnnestu alati uuritavas materjalis eristada stafülokokke streptokokkidest.

Ziehl-Neelseni järgi värvitud preparaatides tuleb peamiselt otsida Mycobacterium tuberculosis't.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Stafülo- ja streptokokkide isoleerimiseks uuritavast materjalist kasutatakse söötmetest veriagarit, lihapeptoonagarit, broomtümoollaktoosagarit ja glükoospuljongit.

Veriagaril kasvavad stafülokokid küllaltki suurte (läbimõõt 1 - 3 mm), ümarate, kumerate, läikivate pesadena, mida võib ümbritseda täiesti läbipaistev hemolüüsivöönd. Pigmendi moodustumine pole neil sellel söötmel kuigi tüüpiline. Streptokokkide pesad veriagaril on tunduvalt väikesemad (läbimõõt umbes 0,5 mm), õrnemad, lamedamad ja kuivemad, samuti on nad hallikalt läbipaistvad. Pesi võib ümbritseda α - või β -hemolüüsi vöönd.

Lihapeptoonagaril on stafülokokkide pesad sarnased nende pesadele veriagaril, kuid siin ilmneb tüüpiline pigmendi moodustumine, mis intensiivistub külvi seismisel toatemperatuuri juures. Streptokokkide kasv lihapeptoonagaril on kiduram kui veriagaril.

Broomtümoollaktoosagaril meenutab stafülo- ja streptokokkide kasv nende mikroobide kasvu veri- ja lihapeptoonagaril.

Glükoospuljongis kasvades tingivad stafülokokid söötme ühtlase hägunemise, streptokokid seevastu aga jätavad söötme läbipaistvaks, andes vaid teralise sademe.

Stafülokokkidele iseloomulik asetumine viinamarjakoba-

raina ilmneb kõige paremini lihapeptoonagaril, streptokokkidele tüüpilised pärlikeed on aga eriti ilusad glükoospuljongis.

Mäda, kurgulima, uriini ja rooja uurimine.

Esimene päev. Mäda, kurgulima ja uriini uurimisel tehakse külvid veriagarile, lihapeptoonagarile ja glükoospuljongisse, rooja uurimisel aga ka veel broomtümoollaktoosagarile.

Külvid paigutatakse 24 tunniks termostaati 37°C juures.

Teine päev. Kahtlastest pesadest tahkeil söötmeil ja glükoospuljongist valmistatakse preparaadid, värvitakse need Grami järgi ja uuritakse mikroskoobiliselt. Glükoospuljongist tehakse külv veriagarile, 2 - 3 stafülokokkide pesast längagarile ja 2 - 3 streptokokkide pesast glükoospuljongisse ning veriagarsektoreile.

Külvid paigutatakse 24 tunniks termostaati 37°C juures.

Kolmas päev. Veriagaril kasvanud pesi uuritakse mikroskoobiliselt Grami järgi värvitud preparaatides. Kui selliseid mikroobe polnud esmaskülvides tahkeil söötmeil, külvatakse nad längagarile, glükoospuljongisse ja veriagarsektoreile.

Stafülo- ja streptokokkide puhaskultuuridest valmistatakse preparaadid, värvitakse need Grami järgi ja uuritakse mikroskoobiliselt. Isoleeritud stafülokokkidel määratakse tüve patogeensust iseloomustavad omadused. Streptokokkide tüvedel määratakse tarbekorral nende kuuluvust ühte või teise seroloogilisse gruppi, diferentsitakse neid pneumokokkide III tüübist.

Neljas päev. Antakse uuringu vastus. Üksikjuhtudel jätkatakse tööd glükoospuljongist isoleeritud tüvedega.

Vere uurimine.

Verekülvid teostatakse vahetult haigevoodi juures, külvatakse 2 - 3 ml verd 25 - 30 ml glükoospuljongisse. Vere bakteritsiidse toime vältimiseks ei tohi külvatud vere hulk moodustada üle 15% söötme hulgast. Verekülvide puhul võib söötme-

na kasutada ka Kitt-Tarozzi söödet.

Verekülvid hoitakse termostaadis 7 päeva vältel 37°C juures. Iga päev tehakse neist külvid veriagarile. Strepto- või stafülokokkide kasvu puhul veriagaril jätkatakse uuringut analoogiliselt mäda, kurgulima, uriini ja rooja uurimisele.

Stafülokokkide patogeensust iseloomustavate tunnuste määramise metoodika.

Stafülokinaasi määramine. Stafülokinaas ehk koagulaas mõjub protrombiinitaoliselt ja pärsib fagotsütoosi. Määratakse stafülokinaasi plasmakoagulatsioonitestiga: 10 ml steriilset küüliku verd lisatakse 1 ml steriilsele 5%-lisele naatriumtsitraadilahusele. Peale vere vormelementide settimist eemaldatakse plasma pipetiga ja säilitatakse külmutuskapis 4°C juures. Vahetult enne kasutamist lahjendatakse plasma 1:4 steriilse füsioloogilise keedusoolalahusega ja pipeteeritakse 0,5 ml hulkades katsutitesse. Viimastesse külvatakse 12 - 24-tunnilised uuritavad stafülokokkide kultuurid ja paigutatakse külvid termostaati 37°C juures. Positiivse plasmakoagulatsioonitesti puhul hüübub plasma 2 - 10, tavaliselt 4 tunni vältel.

Kasutada võib ka inimplasmat. Seejuures tuleb silmas pidada, et enne vere võtmist ei tohi doonorile manustada glükoosi.

Fosfataasi määramine. Fosfataas lõhustab fosfaate. Fosfataasi määratakse fenoolftaleiinfosfaat-testiga: lihapeptoonpuljongile lisatakse 0,01% fenoolftaleiinfosfaati ja külvatakse sinna üks aasatäis 24-tunnilist uuritavat stafülokokkide kultuuri. Külv paigutatakse 12 - 16 tunniks termostaati 37°C juures, siis lisatakse sellele paar tilka 10%-list naatrium- või kaaliumhüdroksüüdilahust. Positiivse fenoolftaleiinfosfaat-testi puhul muutub katsuti sisu roosakaspunaseks. Test põhineb fosfataasi toimel vabaneva fenoolftaleiini värvimuutusel leelises keskkonnas.

Želatinaasi määramine. Želatinaasi määramiseks tehakse uuritavast stafülokokkide kultuurist pistekülv želatiinsöödt-

messe. Külvi hoitakse 20 päeva vältel toatemperatuuri juures. Patogeensetele stafülokokkidele on iseloomulik želatiinsöötme kotikujuline veeldamine.

Bioloogiline uurimine.

Stafülo- ja streptokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse bioloogilisi uurimismeetodeid väga harva. Praktiliselt tuleb rakendada bioloogilist uurimismeetodit ainult gastroenteriitide korral, määrates sel juhul isoleeritud stafülokokkidel enterotoksiini Dolmani testi abil.

Dolmani test.

Uuritava kultuuri filtraati keedetakse 30 minuti vältel vesivannis hemolüsiini hävitamiseks ja süstitakse noortele kassidele intraperitoneaalselt. Süstitava filtraadi annus: 1 ml 1 kg kehakaalu kohta. Positiivse testi puhul haigestuvad katseloomad umbes 30 minuti pärast: ilmneb oksendamine, intensiivne sülje-eritus, kõhulahtisus. Haigusnähud püsivad umbes paar tundi.

Seroloogiline uurimine.

Seroloogilisi uurimismeetodeid ei kasutata vahetult stafülo- ja streptokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel. Viimasel ajal on aga hakatud kasutama mitmesuguseid seroloogilisi reaktsioone reuma diagnoosimisel - näiteks anti-O-streptolüsiinide tiitri määramise reaktsioon, Waaler-Rose'i reaktsioon jt.

Anti-O-streptolüsiinide tiitri määramise reaktsioon.

Seroloogilisse gruppi A kuuluvad streptokokid moodustavad kaks streptolüsiini (hemolüsiini): O- ja S-streptolüsiini.

O-streptolüsiin on happe- ja termoresistentne, kuid hapnikutundlik, S-streptolüsiin aga happe- ja termolabiilne, kuid hapnikuresistentne. O-streptolüsiinil on täisantigeeni omadused, põhjustades organismis spetsiifiliste antikehade, anti-O-streptolüsiinide tekke. Need antikehad pärsivad in vitro O-streptolüsiinide poolt tingitud hemolüüsi.

Anti-O-streptolüsiinide tiitrit hinnatakse nn. antistreptolüsiiniühikutes - ASÜ-des. 1 ASÜ-ks nimetatakse seda anti-O-streptolüsiinide hulka, mis neutraliseerib ühe streptolüsiiniühiku - 1SÜ. 1 SÜ-ks nimetatakse seda 2,5-kordset minimaalset streptolüsiini hulka, mis põhjustab 0,5 ml 5%-lise küüliku erütrotsüütide suspensiooni hemolüüsi.

Normaalseerumi anti-O-streptolüsiinide tiiter võrdub 200 - 400 ASÜ-le. Ägeda polüartriidi puhul tõuseb anti-O-streptolüsiinide tiiter, püsides kõrgetel väärtustel mitte ainult kliiniliste nähtude vaibumiseni, vaid ka streptokokkide nakkuse lakkamiseni.

Waaler-Rose'i reaktsioon.

See reaktsioon põhineb nn. aglutinatsiooniaktiveerimisfaktori sedastamisel. Uuritavast vereseerumist eemaldatakse oina erütrotsüütide normaalaglutiniinid. Reuma korral on selline seerum veel lahjenduses 1:32 ja enam siiski võimeline aglutineerima eelnevalt spetsiifilise hemolüütilise seerumiga töödeldud (sensibiliseeritud) oina erütrotsüüte.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Mädast valmistada preparaat, värvida see Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
2. Teostada mäda külvid veri- ja lihapeptoonagarplaatidele ja glükoospuljongisse.
3. Teostada vere külv glükoospuljongisse.
4. Demonstratsiooni korral tutvuda stafülo- ja streptokokkide kasvuga veriagaril, längagaril ja glükoospuljongis. Kirjel-

dada nende mikroobide kasvu erinevusi mainitud söötmeil.

5. Demonstratsiooni korras uurida stafülo- ja streptokokkide preparaate, mis on valmistatud nende mikroobide kultuuridest veriagaril, längagaril ja glükoospuljongis. Kirjeldada mainitud preparaatides sedastatavaid erinevusi.

II praktikum.

Teema: PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Eelmise praktikumi tööde jätkamine.

Mäda uurimine.
Vere uurimine.

Pneumokokkide poolt tekitatud haigusprotsessside mikrobioloogiline diagnoos.

Pneumokokid - Diplococcus pneumoniae kuuluvad Genus Diplococcus'esse. Morfoloogiliselt on pneumokokid lantsetjad, meenutades küünlaleeki. Tavaliselt asetuvad nad paarikaupa (kaksikkokid) jämedate otstega vastakuti, kuid vedelsöötmeis võivad moodustada ka lühemaid ahelaid. Pneumokokid on gram-positiivsed, liikumatud, eoseid ei moodusta, haigelt võetud uurimismaterjalis ja katseloomade organismis omavad spetsiifi-

lisi polüsahhariide sisaldavat kihnu.

Nõudlikkuselt söötmete suhtes ületavad pneumokokid streptokokke, kasvades vaid verd, seerumit või astsiitvedelikku sisaldavail söötmeil. Pneumokokid on fakultatiivsed anaeroobid.

Antigeense struktuuri järgi jaotatakse pneumokokid I, II ning III tüüpi ja X-gruppi. Viimane hõlmab suurt hulka tüüpe, mis antigeenselt struktuurilt erinevad I, II ja III tüübist. Kasvult tahkeil söötmeil erinevad III tüübi pneumokokid teistest, moodustades limajaid pesi, siit ka nende nimetus - Pneumococcus mucosus.

Tavaliselt on I, II ja III tüübi pneumokokid krupoosse pneumoonia ja primaarsete meningiitide, peritoniitide ning otiitide tekitajaiks, x-gruppi kuuluvad pneumokokid aga tekitavad postoperatiivseid bronhopneumooniaid, posttraumaatilisi meningiite, konjunktiviite, ulcus serpens corneae't jne. Otiite tekitavad kõige sagedamini just III tüübi pneumokokid.

Pneumokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse mikroskoobilisi ja bioloogilisi uurimismeetodeid, harvemini haigusetekitaja isoleerimist.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on pneumooniate puhul röga, meningiitide puhul seljaajuvedelik, otiitide puhul kõrvamäda, peritoniitide puhul kõhukelmevedelik jne.

Mikroskoobiline uurimine.

Pneumokokke uuritakse mikroskoobiliselt metüleensinisega ja Grami järgi värvitud preparaatides. Preparaatide valmistamiseks rögast valatakse uuritav materjal Petri tassi ja valitakse sellest limajaid mädatombukesi. Seljaajuvedeliku uurimisel valmistatakse preparaadid tsentrifugeerimisel (20 - 25 minutit 3500 tiiru juures minutis) saadud sademest.

Haigelt võetud uuritavas materjalis asetuvad lantsetjad pneumokokid paarikaupa ja on ümbritsetud kihnuga.

Vahetult rögas võib määrata ka pneumokokkide tüüpi, kasutades selleks Neufeldi kihnupundumisetesti.

Neufeldi kihnupundumisetest. Esemeklaasile kantakse külviaasaga 4 mädatombukest ja lisatakse igale neist üks aasatäis metüleensinise värvilahust. Edasi lisatakse kolmele tombukesele vastavalt üks aasatäis pneumokokkide I, II ja III tüübi seerumit, neljandale aga kontrolliks üks aasatäis füsioloogilist keedusoolalahust. Tilgakesi segatakse hoolikalt ja kaetakse katteklaasidega. Reaktsiooni hinnatakse mikroskoobiliselt 5 ja 30 minuti möödumisel.

Tilgas, milles seerum vastab uuritavate pneumokokkide tüübile, on mikroobirakkude kihnud paksenenud ja teravasti piiristatud. Pneumokokkide kihnude paksenemist spetsiifiliste seerumite toimel peeti kihnude puudumise tulemuseks (siit ka testi nimetus - kihnupundumisetest). Viimased uurimused näitavad aga, et tegemist on kihnude pinnal toimuva pretsipitatsioonireaktsiooniga.

Neufeldi testi võib kasutada ainult siis, kui tegemist on värske, mitte üle kahe tunni seisnud uuritava materjaliga, mis sisaldab mikroskoobiliselt küllaldasel hulgal sedastatavaid mikroobirakke.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Pneumokokkide isoleerimiseks kasutatakse söötmetest seerum- või astsiitpuljongit (3 osa lihapeptoonpuljongit + 1 osa seerumit või astsiitvedelikku) ja veriagarit. Tavaliselt süstitakse uuritav materjal eelnevalt valgetele hiirtele intraperitoneaalselt ja isoleeritakse pneumokokid juba katseloomade organismist. Verd, mäda, seljaaju- ja kõhukelmevedelikku võib külvata vahetult söötmetele.

Seerum- või astsiitpuljongis kasvades tingivad pneumokokid söötme hägunemise, andes ka õrna peeneteralise sademe.

Veriagaril kasvavad pneumokokid väikeste õrnade ühtlase ääriga lamedate läbipaistvate pesadena. Pesi ümbritseb rohekas hemolüüsivöönd.

Vedelsöötmeist valmistatud preparaatides meenutavad pneumokokid sageli streptokokke. Sarnane on ka nende mikroobide kasv veriagaril. Pneumokokkide diferentsimine streptokokkidest põhineb nende erineval sapitundlikkusel ja inuliini fermentatsioonil, samuti erineval patogeensusel valgetele hiirtele. Nimelt lüseeruvad pneumokokid sapis, streptokokid aga mitte; pneumokokid lõhustavad inuliini, streptokokkidest aga lõhustavad inuliini vaid üksikud tüved; pneumokokid on väga patogeensed valgetele hiirtele, streptokokkidest aga on hiirtele patogeensed tegelikult ainult enterokokid, kuid viimaseil puudub katseloomade organismis kihn. Erinev on ka pneumo- ja enterokokkide termoresistentsus - pneumokokid hävivad 10 minuti vältel 52°C juures, enterokokid aga taluvad 30-minutilist kuumutamist 60°C juures.

Pneumokokkide samastamiseks kasutatakse samuti mikroaglutinatsioonireaktsiooni spetsiifiliste diagnostiliste seerumitega. Selle reaktsiooni abil määratakse ka isoleeritud pneumokokkide tüüp.

Sapiproov. Ühte katsutisse tilgutatakse 5 tilka steriilset härjasappi, teise 5 tilka füsioloogilist keedusoolalahust. Mõlemasse katsutisse lisatakse 10 tilka ööpäevast uuritava mikroobi puljongkultuuri ja paigutatakse need 30 minutiks termostaati 37°C juures. Kui tegemist on pneumokokkidega, siis muutub sappi sisaldava katsuti sisu mikroobide lüseerumise tulemusena läbipaistvaks. Streptokokkide (sealhulgas ka enterokokkide) puhul jääb mõlema katsuti sisu häguseks.

Bioloogiline uurimine.

Valgete hiirte nakatamine on kindlaimaks meetodiks pneumokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel. Katseloomadele süstitakse intraperitoneaalselt 0,5 ml uuritavat materjali. Tarbekorral suspendeeritakse see

eelnevalt lihapeptoonpuljongisse. Juba paari tunni pärast ilmnevad valgetel hiirtel esimesed haigusnähud ja 8-72 tunni möödumisel nad surevad. Kõhukelmevedelikus, siseelundeis ja veres leidub massiliselt pneumokokke, mida võib sedastada metüleensinisega või Grami järgi värvitud preparaatides. Kõhukelmevedelikku võib kasutada ka mikroaglutinatsioonireaktsiooniks spetsiifiliste diagnostiliste seerumitega. Kultuuri isoleerimiseks on kõige parem külvata söötmetele südameverd, kusjuures katselooma võib surmata juba 6 tundi peale nakatamist.

Seroloogiline uurimine.

Pneumokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel seroloogilisi uurimismeetodeid praktiliselt ei kasutata.

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

Gonokokid - Neisseria gonorrhoeae kuuluvad Genus Neisseria'sse. Morfoloogiliselt meenutavad nad kohviube ja asetuvad paarikaupa kaksikkokkidena. Gonokokid on gram-negatiivsed, liikumatud, eoseid ei moodusta, värvuvad hästi metüleensinisega. Nende kasv toimub vaid inimverd, inimseerumit ja astsiitvedelikku sisaldavail söötmeil, kusjuures kasvu soodustab süsihappegaasirikas keskkond. Gonokokkidele on iseloomulik nende minimaalne resistentsus väliskeskkonna tegurite toimele. Nii näiteks hävivad nad juba 40 - 41°C juures, mäda kuivamisel püsivad eluvõimelistena ainult paar tundi jne.

Gonokokid on gonorröa tekitajaiks, kuid vastsündinuil võivad põhjustada ka mädavoolust silmadest - blennorröad.

Gonokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse põhiliselt mikroskoobilisi, harvemini seroloogilisi uurimismeetodeid, samuti hai-

gusetekitaja isoleerimist.

Uuritav materjal.

Tavaliselt on uuritavaks materjaliks meestel kusiti, naistel veel tupe, emakakaela ning pärasoole mädajad eritised. Lastel uuritakse samuti tupe, kusiti ning pärasoole, blennorröa puhul aga ka silma sidekesta mädajat eritist. Eritisi uuritakse enamasti vaid mikroskoobiliselt. Preparaadid (vähemalt kaks) valmistatakse vahetult peale uuritava materjali võtmist vatt-tampooni abil.

Haigusetekitaja isoleerimiseks saadetakse uuritava materjaliga immutatud vatt-tampoonid laboratooriumi termostes, et vältida temperatuuri muutuste ja kuivamise kahjustavat toimet mikroobidele. Seejuures ei tohi eelnevalt vähemalt 1-2 päeva vältel raviks kasutada desinfitseerivaid vahendeid ja kemoterapeutilisi ning antibiootilisi preparaate.

Meestel on vähese eritise puhul (krooniline gonorröa, ägeda gonorröa ravi lõpp-periood) uuritavaks materjaliks uriinis leiduvad limaniidid ja helbed.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobiliselt uuritakse gonokokke kõige sagedamini metüleensinisega ja Grami järgi värvitud preparaatides. Uuritavas materjalis paigutuvad gonokokid enamasti rakusiseselt, moodustades leukotsüütides ja epiteelirakkudes kohvioataolistest kaksikkokkidest koosnevaid mikroobide kogumikke. Vahel võib rakkudes leida ainult üksikuid gonokokke, vahel jälle paigutuvad nad epiteelirakkudes korrapäraste ridadena.

Kroonilistelt ja ravitud haigetelt võetud materjalis on gonokokkide morfoloogia sageli muutunud. Preparaatides võib leida kaksikkokke, mis koosnevad suurtest kerakujulistest või erineva suurusega mikroobidest, samuti suuremaid ja väiksemaid üksikuina asetuvaid kokke. Võivad esineda ka väga väikesed kaksikkokid. Morfoloogiliselt muutunud gonokokid võivad pai-

gutuda nii rakusiseselt kui ka rakuväliselt ja värvuda vahel isegi gram-positiivselt.

Praktiliselt värvitakse üks laboratooriumi saadetud preparaatidest 1:10 lahjendatud Löffleri metüleensinisega 2 - 3 sekundit, teine aga Grami järgi. Metüleensinisega värvitud preparaadis on tumesinised gonokokid hästi eraldatavad õrnsinakas rakkude protoplasmas. Gonokokkidest heledamad on samuti teised võimalikud mikroobid. Kui värvilahuse toimeaeg pikeneb, värvuvad aga rakkude protoplasma ja teised mikroobid siniseks, mille tulemusena gonokokkide sedastamine muutub raskeks.

Värvides preparaate gonokokkide avastamiseks Grami järgi, tuleb karboolgentsiaanavioletiga toimida vaid ühe minuti vältel. Vastasel korral võivad gonokokid näida gram-positiivseina.

Gonokokkide sedastamiseks värvitakse preparaate ka Unna-Pappenheimi järgi.

Unna-Pappenheimi värvimismeetod. Selle meetodi kasutamisel on püroniiniga erepunaseks värvunud gonokokid hästi nähtavad metüülroheliseega sinakas-roheliseks värvunud rakkude protoplasmas. Tuumad värvuvad sinakasroheliseks.

Unna-Pappenheimi värvilahus:

metüülrohelist 0,15
püroniini 0,25
etüülalkoholi 2,5
glütseriini 20,0
0,5% karboolvett ad 100,0.

Preparaati värvitakse 5 - 7 minuti vältel, loputatakse veega, kuivatatakse ja uuritakse mikroskoobiliselt.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Kroonilise või juba ravitud ägeda gonorröa puhul ei anna mikroskoobilised uurimismeetodid alati tulemusi, mistõttu neil juhtudel tuleb vahel kasutada ka haigusetekitaja isoleerimist. Selleks külvatakse uuritav materjal astsiitagarile (2 osa li-

hapeptoonagarit + 1 osa astsiitvedelikku) ja astsiitpuljongisse. Kõige parem on teostada külvid vahetult peale uurimismaterjali võtmist. Gonokokkide tüvede erinevat hapniku- ja süsihappegaasivajadust arvestades kasvatatakse üks osa külve aeroobsetes tingimustes, teine aga süsihappegaasirikkas (kuni 10%) keskkonnas.

Astsiitagaril kasvavad gonokokid läbipaistvate ühtlase äärisega sileda läikiva pinnaga veniva konsistentsiga kastetilku meenutavate pesadena. Astsiitpuljongi jätavad gonokokid läbipaistvaks, andes vaid söötme pinnal õrna kelme. Viimase põhja langemisel tekib teraline või helbeline sade.

Isoleeritud kultuuri samastamisel määratakse selle fermentatiivne aktiivsus glükoosi, maltoosi ja sahharoosi suhtes astsiitvedelikku sisaldavail söötmeil, samuti kasvu lihapeptoonagaril: gonokokid lõhustavad ainult glükoosi happeks ega kasva lihtsöötmeil. Kasutatakse ka aglutinatsioonireaktsiooni diagnostiliste seerumitega.

Bioloogiline uurimine.

Gonokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel ei kasutata bioloogilisi uurimismeetodeid.

Seroloogiline uurimine.

Seroloogilistest reaktsioonidest on diagnostilise väärtusega ainult komplemendi sidumise reaktsioon haige vereseerumiga, mis muutub positiivseks 3. - 4. nädalal pärast haigestumist. Antigeeniks on tavaline gonovaktsiin või spetsiaalne antiformiinantigeen. Seda reaktsiooni kasutatakse praktiliselt gonorröa hilistüsistuste (artriidid, prostatiidid, epididümiidid jne.) diagnoosimisel.

Meningokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogiline diagnoos.

Meningokokid - Neisseria meningitidis kuuluvad koos gonokokkidega Genus Neisseria'sse. Nad on kohvioataolised kaksikkokid, meenutades seega ka morfoloogiliselt gonokokke. Meningokokid on gram-negatiivsed, liikumatud, eoseid ei moodusta. Meningokokkide isoleerimine õnnestub ainult värd, seerumit ja astsiitvedelikku sisaldavail söötmeil, kuid kasvavad nad siiski gonokokkidest paremini. Ka on meningokokid vähesel määral resistentsemad väliskeskkonna tegurite toimele.

Antigeense struktuuri järgi jaotatakse meningokokid I, II, III ja IV seroloogilisse tüüpi, mida Nõukogude Liidus märgistatakse suurte ladina tähtedega A, B, C ja D. Meil esinevad peamiselt tüübid A ja B.

Meningokokid on epideemilise tserebrospinaalse meningiidi tekitajaiks. Nad võivad põhjustada ka rinofarüngiiti, sepsist, erandjuhtudel endokardiiti, neeruabstsesse jt. põletikulisi protsesse. Meningokokke võib leida tervete inimeste nina-kurguõõnes - st. esineb meninokokkide bakterikandjaid.

Meningokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse haigusetekitaja isoleerimist ja mikroskoobilisi, harvemini seroloogilisi uurimismeetodeid.

Uuritav materjal.

Sagedasemaks uurimismaterjaliks on seljaajuvedelik, siis kurgu- ja ninalima ning vahel harva ka veri. Meningokokkide vähest resistentsust arvestades tuleb uuritav materjal kiires korras saata laboratooriumi, vältides seejuures kuivamist ja temperatuuri muutusi. Kõige parem on uuritava materjali transportimiseks kasutada termost.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobiliselt uuritakse ainult seljaajuvedelikku. Selleks valmistatakse seljaajuvedeliku tsentrifugeerimisel (20 - 25 minutit 3500 tiiru juures minutis) saadud sademest kolm preparaati ja värvitakse neist ühte 10 - 20 sekundit metüleensinisega, teist Grami ja kolmandat Ziehl-Neelseni järgi. Preparaatides on näha kohvioataolisi kaksikkokke, mis paigutuvad nii rakusiseselt kui ka rakuväliselt, samuti suurel hulgal polünukleaarseid leukotsüüte. Sageli paigutuvad meningokokid rakkudes neljakaupa. Alati siiski ei õnnestu uuritavas materjalis meningokokke mikroskoobiliselt sedastada, samuti võib olla raskendatud nende eristamine teistest mikroobidest.

Ziehl-Neelseni järgi värvitud preparaadis otsitakse Mycobacterium tuberculosis't, kuna epideemilist tserebrospinaalset meningiiti tuleb alati diferentsida tuberkuloossest meningiidist.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Meningokokkide isoleerimiseks külvatakse uuritav materjal astsiitagarile, veriagarile ja astsiitpuljongisse. Kurguja ninalima ning verd on kõige parem külvata vahetult haigevoodi juures. Seljaajuvedelikku võib eelnevalt paigutada 24 - 48 tunniks termostaati ja alles siis teha külvid mainitud söötmeile. Meningokokkide tüvede erinevat hapniku- ja süsihappegaasivajadust arvestades kasvatatakse üks osa külve aeroobsetes tingimustes, teine aga süsihappegaasirikkas (5-10%) keskkonnas.

Astsiitagaril kasvavad meningokokid väikeste, ümmarguste, klaasjalt läbipaistvate pesadena, mis pealtvalgustusel omandavad pärlmutriläike. Veriagaril on meningokokkide pesad hallikad, hemolüüsivööndiga. Pesad on tahked söötmel võitaolise konsistentsiga, mis võimaldab neid külviaasaga kergesti laiali hõõruda. Astsiitpuljongis kasvades annavad meningokokid

õrna hägususe ja vähese teralise sademe.

Söötmeil kaotavad meningokokid oma kohvioataolise kuju ja paarikaupa asetumise. Meningokokkide kultuuridest valmistatud preparaatides on näha erineva suurusega ja värvusega kerakujulisi mikroobe, mis asetuvad üksikuina ja suuremate või väiksemate rühmadena.

Analoogiliselt gonokokkidele määratakse ka meningokokkide kultuuri samastamisel selle fermentatiivne aktiivsus glükoosi, maltoosi ja sahharoosi suhtes astsiitvedelikku sisaldavail söötmeil, samuti kasv lihapeptoonagaril. Kui gonokokid lõhustasid happe tekkega ainult glükoosi , siis lõhustavad meningokokid peale glükoosi ka maltoosi. Lihapeptoonagaril värskelt isoleeritud meningokokkide kultuurid ei kasva. Korduvate ümberkülvidega astsiitagaril õnnestub vahel siiski saada kultuure, mis kasvavad ka lihtsöötmeil.

Meningokokkide samastamisel kasutatakse samuti aglutinatsioonireaktsiooni diagnostiliste seerumitega, mis võimaldab määrata ka isoleeritud kultuuride serotüüpi.

Meningokokke tuleb eristada nina-kurguõõnes leiduvatest gram-negatiivsetest, põhiliselt saprofüütsetest kokkidest. Neid mikroobe ühendatakse pseudomeningokokkide gruppi. Siia kuuluvad Neisseria catarrhalis, samuti Neisseria sicca, Neisseria cinerea, Neisseria flava jmt. Pseudomeningokokkide grupi mikroobid kasvavad lihtsöötmeil, kusjuures sageli juba toatemperatuuri juures moodustavad neist paljud pigmenti. Meningo- ja gonokokkidega võrreldes on erinev ka nende fermentatiivne aktiivsus.

Bioloogiline uurimine.

Meningokokkide poolt tekitatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel bioloogilisi uurimismeetodeid praktiliselt ei kasutata. Uuritavat materjali võib siiski koos munakollase, koore või mutsiiniga süstida valgetele hiirtele intraperitoneaalselt. Vähemalt 12 tunni möödumisel surmatakse katseloomad, kõhukelmevedelikku uuritakse mikroskoobili-

selt ja külvatakse siis söötmeile. Katseloomade nakatamine ilma munakollase, koore või mutsiinita ei anna tulemusi.

Seroloogiline uurimine.

Meningokokkide poolt põhjustatud haigusprotsesside mikrobioloogilisel diagnoosimisel ei kasutata seroloogilisi reaktsioone, mis põhineksid spetsiifiliste antikehade sedastamisel haige vereseerumis. Diagnostilise väärtusega on pretsipitatsioonireaktsioon ja komplemendi sidumise reaktsioon seljaajuvedelikuga. Need reaktsioonid võimaldavad sedastada meningokokkide antigeeni seljaajuvedelikus spetsiifiliste diagnostiliste seerumite abil. Pretsipitatsioonireaktsiooniga võib määrata isegi haigusprotsessi põhjustanud meningokokkide tüüpi.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Mäda külvidest veri- ja lihapeptoonagarplaadil ning glükoospuljongis valmistada preparaadid, värvida need Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt. Stafülokokkidę pesast teha külv längagarile, streptokokkide pesast aga glükoospuljongisse ja veriagarplaadi sektoreile.
2. Verekülvist valmistada praparaat, värvida see Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
3. Demonstratsiooni korral tutvuda pneumo- ja streptokokkide kasvuga veriagaril ja seerumpuljongis, kirjeldada nende mikroobide kasvu erinevusi mainitud söötmeil.
4. Teostada sapiproov pneumo- ja streptokokkide puljongkultuuridega.
5. Pneumokokkidega nakatatud valge hiire kõhukelmevedelikust valmistatud preparaat värvida metüleensinisega ja uurida mikroskoobiliselt.
6. Demonstratsiooni korras tutvuda gonorröahaige kusiti mäda-

jast eritisest valmistatud preparaatidega, mis on värvitud metüleensinisega, Grami ja Unna-Pappenheimi järgi.

7. Lahtise diagnoosiga haige kusiti mädajast eritisest valmistatud preparaadid värvida metüleensinisega ning Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt.

8. Demonstratsiooni korras tutvuda preparaatidega, mis on valmistatud epideemilise tserebrospinaalse meningiidiga haige seljaajuvedelikust ja värvitud metüleensinisega ning Grami järgi.

III praktikum.

Teema: PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Eelmise praktikumi tööde lõpetamine.

Mäda uurimine.

Stafülokokkide kultuurist längagaril ja streptokokkide kultuurist glükoospuljongis ning veriagarsektoril valmistada preparaadid, värvida need Grami järgi ja uurida mikroskoobiliselt. Demonstratsiooni korras tutvuda stafülokokkide patogeensust iseloomustavate omaduste määramise tulemustega.

Iseseisev töö.

IV praktikum.

Teema: KATKU, TULAREEMIA JA BRUTSELLOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Iseseisva töö lõpetamine.

Katku mikrobioloogiline diagnoos.

Katku tekitaja Pasteurella pestis kuulub Ordo Eubacteriales'e Familia Brucellaceae Genus Pasteurella'sse.

Pasteurella pestis on gram-negatiivne, eosteta, liikumatu, kihnuga ümbritsetud pulgake. Pasteurella pestis'ele on tüüpiline ovoidne kuju ja bipolaarne värvuvus - mikroobi otsad (poolused) värvuvad intensiivselt, keskosa aga jääb kahvatuks. Selliseina näeme katkutekitajaid haige inimese ja looma kudedest ning eritistest, samuti noortest puljongkultuuridest valmistatud preparaatides. Viimaseis asetuvad mikroobirakud sageli ahelaina . Tahkeil söötmeil kaotab Pasteurella pestis ovoidse kuju ja bipolaarse värvuvuse, esinedes pikemate kepikestena, mis sageli annavad mitmesuguseid involutsioonivorme.

Pasteurella pestis kasvab lihtsöötmeil, kusjuures selle mikroobi optimaalne kasvutemperatuur on 25 - 30°C. Tavaliselt kasvatatakse katkutekitajaid 28°C juures. Pasteurella pestis pole tundlik madalate temperatuuride toimele, säilides näiteks maetud laipades 0° juures 5 - 6 kuu vältel.

Katk kuulub eriti ohtlike nakkushaiguste hulka, mistõt-

tu katkualast mikrobioloogilist uurimist tohib teostada ainult NSV Liidu Tervishoiuministeeriumi vastavates instruktsioonides toodud reziiminõuete kohaselt. Nende nõuete täpne täitmine kaitseb laboratooriumi töötajaid nakatumisest ja väldib katkutekitajate levikut. Tavaliselt tegelevad katku mikrobioloogilise diagnoosimisega ainult selleks kohandatud erilised laboratooriumid. Töö nendes laboratooriumides toimub kaitseriietuses, nn. katkuvastases kostüümis.

Arvestades katku äärmiselt raskekujulist kulgu ja suurt kontagioossust, on selle nakkushaiguse õigeaegne mikrobioloogiline diagnoosimine tohutu tähtsusega. Laboratoorium on kohustatud andma katkualaste uuringute esialgse vastuse 30 - 36 tunni vältel, lõpliku vastuse aga 10 - 11 ööpäeva pärast. Katku mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse haigusetekitaja isoleerimist, mikrobioloogilisi ja bioloogilisi, harvemini seroloogilisi uurimismeetodeid.

Uuritav materjal.

Haigelt võetav uurimismaterjal sõltub katku kliinilisest vormist. Nahavormi puhul võetakse materjali mädavillidest, karbunklitest ja haavanditest, buboonkatku korral aga buboonidest (buboonid - muhkkatku puhul esinevad muhud - on põletikuliselt suurenenud lümfisõlmed). Katku kopsuvorm nõuab röga, soolevorm limajas-veriste väljaheidete ja septiline vorm vere uurimist. Kõikide haigusvormide korral tuleb uurida verd mikroobide suhtes ja seda vaatamata haiguspäevale.

Mädavillidest võetakse mäda steriilse süstlaga, kusjuures nõel viiakse mädavilli selle servas paralleelselt nahapinnale. Uuritavat materjali buboonist saadakse bubooni punktsioonil. Tuleb silmas pidada, et kõige kergem on isoleerida Pasteurella pestis't nendest buboonidest, mis ei sisalda veel mäda ega ole perforeerunud. Koevedeliku saamist sellistest buboonidest kergendab eelnev 2 - 3 ml steriilse füsioloogilise keedusoolalahuse süstimine bubooni.

Pasteurella pestis'e isoleerimist raskendab sulfanüüla-

miidide ja streptomütsiini kasutamine, mistõttu esmakordselt uuritavat materjali püütakse võtta enne ravi alustamist.

Lahangult võetakse põrna, maksa, kopsude ning lümfisõlmede tükikesi ja seda just elundite kõige enam kahjustatud osadest. Kui on tegemist juba roiskuva koolnuga, tuleb uurimiseks saagida välja tükk toruluud koos luuüdiga (tavaliselt tükk puusa- või sääreluud).

Epidemioloogiliselt on suure tähtsusega närijate (susslikud, tarabaganid, rotid, hiired jt.) ja nende ektoparasiitide uurimine. Nimelt on närijad Pasteurella pestis'e reservuaariks looduses, ektoparasiidid (kirbud) aga mikroobide ülekandjaiks.

Pasteurella pestis säilib hästi füsioloogilises keedusoolalahuses, mis võimaldab viimast kasutada konservandina. Praktiliselt osutub konservant harva vajalikuks, kuna katku mikrobioloogilise diagnoosimisega tegelevad laboratooriumid asuvad tavaliselt endeemilistes rajoonides ja tarbekorral nakkuskoldeis.

Materjali saatmisel laboratooriumi tuleb igati vältida katkutekitajate võimalikku levikut. Selleks pakitakse uuritavat materjali sisaldavad klaasnõud hermeetiliselt suletavasse metallkasti. Väliselt töödeldakse metallkast korralikult 5%-lise lüsooliga või mõne teise desinfitseeriva vahendiga ja pakitakse sama desinfitseeriva vahendiga immutatud riidesse või marlisse.

Mikroskoobiline uurimine.

Verest valmistatakse preparaate vahetult haigevoodi juures, teisest uurimismaterjalist aga laboratooriumis. Preparaate fikseeritakse 15 - 20 minuti vältel Nikiforovi lahuses. Kasutada võib ka etüül- või metüülalkoholi. Leegil fikseeritud preparaatides on Pasteurella pestis'e bipolaarne värvuvus halvasti nähtav.

Preparaate värvitakse metüleensinisega ja Grami järgi. Gram-negatiivsete ovoidse kuju ja bipolaarse värvuvusega mik-

roobirakkude sedastamine lubab kahtlustada katku. Soovitav on uuritavaid preparaate võrrelda Pasteurella pestis'e kultuuriga nakatatud merisea elundeist valmistatud puutepreparaatidega. Vastava kliinilise pildi ja epidemioloogiliste andmete juures kohustab mikrobioloogiline leid viibimata rakendama kõiki epideemiavastaseid abinõusid. Katku lõplik diagnoos eeldab aga Pasteurella pestis'e puhaskultuuri isoleerimist.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Pasteurella pestis'e isoleerimiseks kasutatakse tavaliselt lihapeptoonagarit, lihapeptoonpuljongit ja Tumanski söödet (lihapeptoonagar, mis sisaldab gentsiaanavioletti 1:100000 ja 10%-list hemolüseerunud verd 1-2%).

Tahkeil söötmeil meenutavad Pasteurella pestis'e pesad kasvu algperioodil haralisi niite, edasi niitide kogumikke ja siis pitsrätikuid. Pitsrätikutaolised pesad on õrnad, läbipaistvad, sakilise äärisega. Teise ööpäeva vältel muutub nende keskosa tihedamaks, tumedamaks, läbipaistmatuks kuplitaoliseks moodustiseks, mida jääb ümbritsema lame pitsitaoline õrn läbipaistev sakiline ääris.

Lihapeptoonpuljongis kasvades annab Pasteurella pestis õrna kelme ja peenehelbelise sademe, jättes söötme läbipaistvaks. Kelmest laskuvad alla ja sademest tõusevad üles purikataolised moodustised - nn. katku stalaktiidid.

Uuritav materjal võib peale Pasteurella pestis'e sisaldada ka katkutekitaja bakteriofaagi ja seda eriti just pikaldaselt kulgeva haigusprotsessi puhul (nii inimestel kui ka närijatel). Uurimismaterjalis leiduv bakteriofaag raskendab tunduvalt Pasteurella pestis'e isoleerimist. Selle lüütilise toime pärssimiseks kasutatakse nn. antifaagilist seerumit, mida saadakse küülikute immuniseerimisel Pasteurella pestis'e bakteriofaagiga. Antifaagilist seerumit pipeteeritakse tahketele söötmetele 0,1 ml ja hõõrutakse ühtlaselt laiali Drigalski kepikesega. Kõige parem on seda teha 15 - 20 minutit enne külvi.

Uuritav materjal külvatakse:

1) 1 - 2 antifaagilise seerumiga lihapeptoonagarplaadile,
2) 1 - 2 ilma antifaagilise seerumita lihapeptoonagarplaadile,
3) 1 - 2 antifaagilise seerumiga Tumanski söötmele,
4) 1 - 2 ilma antifaagilise seerumita Tumanski söötmele ja
5) lihapeptoonpuljongisse.

Ilma antifaagilise seerumita tahkeile söötmeile võib tilgutada spetsiifilist diagnostilist katku bakteriofaagi – kui uuritavas materjalis tõesti leidub Pasteurella pestis't, jäävad söötmele kasvuvabad laigud.

Vere külvid tehakse vahetult haigevoodi juures, külvates 3 - 10 ml verd 200 ml lihapeptoonpuljongisse ja 1 - 2 tilka verd tahkeile söötmeile.

Külvid paigutatakse termostaati 28°C juures.

Tüüpiline kasv söötmeil ja spetsiifilise diagnostilise bakteriofaagi toime lubavad sageli juba 10 - 18 tunni pärast anda uuringule esialgselt positiivse vastuse.

Pasteurella pestis'e puhaskultuuri samastamisel tuleb seda diferentsida Pasteurella pseudotuberculosis'est. Selleks kasutatakse spetsiifilisi diagnostilisi aglutineerivaid seerumeid ja bakteriofaage, määratakse kultuuri biokeemiline aktiivsus kirjus reas, nakatatakse katseloomi jne. Pasteurella pestis lõhustab happe tekkega glükoosi, galaktoosi, levuloosi, arabinoosi, ksüloosi, maltoosi, sorbiiti ja manniiti. Vastandina Pasteurella pseudotuberculosis'ele ei lõhusta Pasteurella pestis tavaliselt adoniiti ja rammoosi.

Katku mikrobioloogilisel kiirdiagnoosimisel kasutatakse ka faagi tiitri tõusu reaktsiooni.

Üheaegselt külvidega tuleb uuritava materjaliga nakatada katseloomi.

Bioloogiline uurimine.

Katku mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse peamiselt merisigu, nende puudumisel aga ka valgeid hiiri. Katseloomade nakatamisviis sõltub uuritavast materjalist. Kui tegemist on materjaliga, mis sisaldab peale Pasteurella pestis'e massiliselt ka teisi mikroobe (näiteks roe, roiskuvalt koolnult võetud materjal), nakatatakse üks katseloom subkutaanselt ja teine perkutaanselt; kui aga on tegemist materjaliga, mis teisi mikroobe ei sisalda (näiteks bubooni punktaat), nakatatakse üks katseloomadest subkutaanselt ja teine intraperitoneaalselt. Katseloomade nakatamine on eriti tähtis just massiliselt teisi mikroobe sisaldava uurimismaterjali korral, kuna siis haigusetekitaja isoleerimine on raskendatud ja vahel see isegi ebaõnnestub.

Perkutaanselt nakatatud merisead surevad tavaliselt 5.-7. päeval, subkutaanselt nakatatud katseloomad 4. - 6. ja intraperitoneaalselt nakatatud katseloomad 3. - 5. päeval. Merisead võivad ka ellu jääda. Sel juhul on soovitav surmata katseloomad 7. - 9. päeval, valmistada nende elundeist suspensioonid ja viimastega nakatada uued merisead. Samaaegselt külvatakse suspensioonid ka söötmeile haigusetekitaja isoleerimiseks.

Katku bioloogilist diagnoosimist võib kiirendada. Selleks kasutatakse nakatamiseks katseloomi, kelle loomulikku resistentsust on nõrgendatud eelneva röntgenikiiritusega või kortisooni manustamisega.

Merisea lahangul leiame katku puhul verevalumeid suurenenud regionaalsetes lümfisõlmedes; nekrootilisi koldeid põrnas, harvemini maksas; väärastuslikke muutusi parenhümatoosseis elundeis, eksudatsiooni. Intraperitoneaalselt nakatatud katseloomadel võivad puududa lümfisõlmede kahjustused ja nekrootilised kolded siseelundeis. Peritoneaalõõnes leidub neil venivat küllaltki läbipaistvat eksudaati, parenhümatoosseis elundeis - väärastuslikke muutusi.

Katseloomade elundeist, verest ja eksudaadist valmista-

tud preparaatides leidub suurel hulgal tüüpilisi gram-negatiivseid ovoidseid bipolaarseid mikroobe, külvidest aga õnnestub isoleerida Pasteurella pestis'e puhaskultuuri.

Seroloogiline uurimine.

Katku mikrobioloogilisel diagnoosimisel ei kasutata praktiliselt seroloogilisi reaktsioone, mis põhineksid spetsiifiliste antikehade sedastamisel haige vereseerumis. Diagnostilise väärtusega on termopretsipitatsioonireaktsioon, mis võimaldab sedastada Pasteurella pestis'e antigeeni uuritavas materjalis spetsiifiliste diagnostiliste seerumite abil. Seda reaktsiooni kasutatakse tavaliselt roiskuva materjali uurimisel.

Pasteurella pestis'e sedastamiseks uuritavas materjalis kasutatakse ka fluorestseerivaid antikehi.

T u l a r e e m i a m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Tularеemia tekitaja Pasteurella tularensis kuulub koos Pasteurella pestis'ega Genus Pasteurella'sse.

Pasteurella tularensis on gram-negatiivne, eosteta, liikumatu, kihnuta, väike polümorfne pulgake, mille vanades kultuurides on ülekaalus kokkoidsed vormid. Katseloomade elundeist valmistatud Romanovski-Giemsa järgi värvitud puutepreparaatides on Pasteurella tularensis'ele iseloomulik polümorfism, sageli esinev rakusisene paigutumine, suur mikroobide hulk ja nende asetumine kogumikena.

Tularеemiatekitaja värvub hästi karboolfuksiiniga ja gentsiaanavioletiga, kuid halvasti metüleensinisega.

Pasteurella tularensis ei kasva lihtsöötmeil, küll aga kasvab munasöötmeil, glükoostsüstiinagaril. Tularеemiatekitaja on obligaatne aeroob optimaalse kasvutemperatuuriga 37°C juures. Pasteurella tularensis lõhustab happe tekkega glükoo-

si, harvemini glütseriini, vahel levuloosi. See mikroob on küllaltki resistentne madalamate temperatuuride toimele, säilides näiteks glütseriinis - 14°C juures kahe aasta vältel. Vees säilib see mikroob üle kolme kuu.

Pasteurella tularensis't iseloomustab kõrge infektsioossus - tundlike katseloomade nakatamiseks piisab juba mõnest mikroobirakust.

Tavaliselt teostavad tulareemia mikrobioloogilist diagnoosimist ainult selleks kohandatud erilaboratooriumid, mis on kohustatud andma tulareemiaalaste uuringute esialgse vastuse 6 ööpäeva ja lõpliku vastuse 11 ööpäeva vältel.

Tulareemia mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse põhiliselt bioloogilisi ja seroloogilisi uurimismeetodeid. Suure praktilise tähtsusega on allergilised nahareaktsioonid tulariiniga.

Uuritav materjal.

Pasteurella tularensis'e isoleerimiseks haigelt uuritakse lümfisõlmede punktaati (esimese haiguskuu vältel), verd (kahe esimese haigusnädala vältel), silma mädajat eritist (esimese haigusnädala vältel), verd imevate putukate hammustuskohal tekkinud haavandite eritist (kuni 8. haiguspäevani). Seroloogilisteks reaktsioonideks võetakse verd alates 6. - 7. haiguspäevast.

Epidemioloogiliselt on suur tähtsus närijate (põldhiirte, koduhiirte, vesirottide, suslikute, hamstrite jt.) ja verd imevate putukate (sääskede, kiinide, puukide jt.), samuti vee ja toiduainete mikrobioloogilisel uurimisel. Nimelt on närijad Pasteurella tularensis'e reservuaariks looduses, inimese nakatumine aga toimub kas vahetu kontakti tulemusena haige loomaga või verd imevate putukate, reostunud vee, toiduainete ning mitmesuguste tarbeesemete, samuti haiguseteki-tajaid sisaldava tolmu kaudu. Vastandina katkule ei esine tulareemia korral nakatumist haigelt inimeselt.

Uuritava materjali konservandina võib kasutada 50%-list

neutraalset glütseriinilahust või glütseriini ja parafiini püdeljat segu. Otstarbekohane on tularеemia puhul uuritav materjal saata laboratooriumi hermeetiliselt suletud metallkastis. Tavaliselt asuvad tularеemia mikrobioloogilist diagnoosimist teostavad laboratooriumid endeemilistes rajoonides, tarbekorral aga vahetult nakkuskoldes.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobiliselt õnnestub sedastada Pasteurella tularensis't ainult närijate põrnast, luuüdist, maksast ja lümfisõlmedest valmistatud puutepreparaatides. Preparaadid fikseeritakse Nikiforovi lahuses või metüülalkoholis ja värvitakse 1,5 - 2 tunni vältel Romanovski-Giemsa järgi. Tularеemia puhul leiame suurel hulgal väikesi punakaid polimorfseid kogumikena asetunud mikroobirakke, mis sageli paigutuvad rakusiseselt. Koerakkude protoplasma on värvunud hele-, tuumad aga tumevioletselt.

Ainult tüüpiline mikroskoobiline leid ei võimalda siiski lõplikult diagnoosida tularеemiat.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Pasteurella tularensis'e isoleerimiseks kasutatakse enamasti McCoy ning Chapin'i tahket ja Sinai poolvedelat munasöödet (McCoy ning Chapin'i sööde: 60 osa munakollast + 40 osa füsioloogilist keedusoolalahust koaguleerida 1,5 tunni vältel 72°C juures; Sinai sööde: 40 osa munakollast + 60 osa füsioloogilist keedusoolalahust koaguleerimata). Külvid hoitakse termostaadis kolme nädala vältel 37°C juures. Söötme kuivamise vältimiseks suletakse katsutid parafiini või plastiliiniga.

Kasv ilmneb kõige sagedamini 2. - 6. päeval. Tahkel munasöötmel kasvab Pasteurella tularensis läikiva peeneteralise kattena, mis külgvalgustusel meenutab šagrääni.

Isoleeritud kultuuri samastamiseks kasutatakse Pasteu-

rella tularensis'e spetsiifilisi diagnostilisi aglutineerivaid seerumeid, arvestatakse mikroobirakkude morfoloogiat ning värvuvust, katseloomadel tingitud haigusprotsessi, kasvu liht- ning munasöötmeil jne.

Praktiliselt õnnestub ainult harukordadel isoleerida Pasteurella tularensis't uuritava materjali esmaskülvidest. Tavaliselt nakatatakse eelnevalt katseloomi ja juba nende organismist isoleeritakse haigusetekitaja puhaskultuur. Pasteurella tularensis'e isoleerimiseks kasutatakse ka kanaembrüote nakatamist.

Bioloogiline uurimine.

Tulareemia mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse merisigu ja valgeid hiiri. Katseloomi nakatatakse subkutaanselt ja intraperitoneaalselt, kuid võib kasutada ka kõiki teisi nakatamisviise. Kui uuritavas materjalis leidub Pasteurella tularensis, võtavad loomad kaalus maha, nende kehatemperatuur tõuseb, karvad lähevad turri ja nad surevad tavaliselt 10 päeva vältel. Vahel võivad katseloomad siiski ellu jääda, kusjuures neil isegi puuduvad igasugused haigusnähud. Sellistel juhtudel surmatakse katseloomad 10. - 20. päeval ja nende elundsuspensiooniga nakatatakse uued loomad. Tarbekorral võib sellist menetlust, nn. passaaži, korrata.

Tulareemiasse surnud katseloomade lahanguleid ei erine lahanguleiust katku puhul - on täheldatavad verevalumid nahaaluses sidekoes ja suurenenud lümfisõlmedes, nekrootilised kolded parenhümatoosseis elundeis (maksas, põrnas, kopsudes) jne.

Katseloomade põrnast, luuüdist, maksast, lümfisõlmedest ja verest valmistatakse preparaadid, värvitakse need Romanovski-Giemsa järgi ja uuritakse mikroskoobiliselt, samuti tehakse külvid haigusetekitaja isoleerimiseks. Tüüpiline mikroskoobiline leid võimaldab anda tulareemiaalastele uuringutele esialgse vastuse, lõplik vastus aga eeldab Pasteurella tularensis'e puhaskultuuri isoleerimist.

Seroloogiline uurimine.

Tulareemia mikrobioloogilisel diagnoosimisel on suure praktilise väärtusega seroloogilised reaktsioonid, mis põhinevad spetsiifiliste antikehade sedastamisel haige vereseerumis. Tavaliselt kasutatakse seejuures klassikalist aglutinatsioonireaktsiooni, samuti veretilga aglutinatsioonireaktsiooni. Teatud väärtusega on pretsipitatsioonireaktsioon, mis võimaldab sedastada Pasteurella tularensis'e antigeeni uuritavas materjalis diagnostiliste seerumite abil. Pasteurella tularensis'e sedastamiseks kasutatakse ka fluorestseerivaid antikehi.

Aglutinatsioonireaktsioon.

Tulareemia puhul täheldatakse positiivset aglutinatsioonireaktsiooni esimesel haigusnädalal 12,5%, teisel haigusnädalal 62,3%, kolmandal haigusnädalal 81% ja neljandal haigusnädalal 93,2% juhtudel (protsendid on toodud Sinai järgi). Reaktsioon püsib positiivsena aastakümneid, olles seega kasutatav ka tulareemia retrospektiivsel diagnoosimisel.

Uuritavast vereseerumist valmistatakse füsioloogilise keedusoolalahusega lahjendused 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 ja 1:1600. Iga lahjenduse hulgaks on 1 ml. Antigeenina tarvitatakse formaliiniga surmatud Pasteurella tularensis'e suspensiooni, nn. tulareemia diagnostikumi. Reaktsiooni hinnatakse pärast kahetunnilist seismist termostaadis 37°C juures. Reaktsiooni loetakse positiivseks, kui aglutinatsioon on täheldatav vähemalt seerumi lahjenduses 1:100.

Tuleb silmas pidada, et Pasteurella tularensis'el ja brutselloositekitajail on ühtivaid antigeenseid komponente, mistõttu brutselloosihaigete vereseerum lahjenduses 1:50 - 1:100 võib aglutineerida tulareemia diagnostikumi ja vastupidi.

Veretilga aglutinatsioonireaktsioon.

Seda reaktsiooni kasutatakse tularеemia seroloogilisel kiirdiagnoosimisel. Reaktsioon muutub positiivseks üheaegselt klassikalise aglutinatsioonireaktsiooniga.

Haige sõrmest võetakse Francki nõelaga esemeklaasile tilk verd, lisatakse sellele tilk destilleeritud vett ja peale erütrotsüütide hemolüseerumist tilk tularеemia diagnostikumi. Saadud tilga sisu segatakse korralikult teise esemeklaasi nurga või klaaspulgaga. Kui spetsiifiliste antikehade tiiter vereseerumis on 1:100 ja enam, ilmneb kohe peeneteraline aglutinatsioon, kui aga antikehade tiiter on alla 1:100, ilmneb aglutinatsioon 2 - 3 minuti pärast.

Allergilised nahareaktsioonid.

Tularеemia diagnoosimisel kasutatakse perkutaanset ja intrakutaanset allergilist nahareaktsiooni. Need reaktsioonid muutuvad positiivseks juba 3. - 6. haiguspäeval, püsides sellisteina aastaid. Allergeenina tarvitatakse nn. tulariini, surmatud Pasteurella tularensis'e suspensiooni. Tulariin perkutaanse reaktsiooni tarvis sisaldab 1 miljardi ja intrakutaanse reaktsiooni tarvis 100 miljonit mikroobirakku 1 ml.

Perkutaanse nahareaktsiooni teostamisel tilgutatakse üks tilk tulariini küünarvarre siseküljele ja skarifitseeritakse sel kohal nahk, intrakutaanse nahareaktsiooni korral aga süstitakse 0,1 ml tulariini intrakutaanselt. Kontrolliks on vastavas hulgas ja viisil manustatud steriilne füsioloogiline keedusoolalahus.

Positiivsed allergilised nahareaktsioonid väljenduvad punetuses ning turses, mis tekivad tulariini manustamiskohal 6 - 10 tunni vältel ja sageli lähevad 24 tunni vältel üle 3 - 4 päeva püsivaks infiltraadiks. Üksikjuhtudel võivad kaasuda kehatemperatuuri tõus ja regionaalsete lümfisõlmede valulikkus.

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

Brutselloosi tekitajaks on Ordo Eubacteriales'e Familia Brucellaceae Genus Brucella'sse kuuluvad Brucella melitensis, Brucella abortus ja Brucella suis.

Loomadel kulgeb brutselloos septitseemia ja unduleeriva palavikuga nakkushaigusena, mis tiinetel sageli iseloomustub nurisünnitusega. Inimesel võib brutselloosi haiguspilt olla väga erinev. Kõige tüüpilisemaks sümptoomiks on unduleeriv palavik.

Brucella melitensis tekitab brutselloosi peamiselt kitsedel ja lammastel, Brucella abortus veistel ja Brucella suis sigadel. Inimpatogeensuselt on esikohal Brucella melitensis, siis Brucella suis ja lõpuks Brucella abortus.

Brutsellid on gram-negatiivsed eosteta, liikumatud väikesed polimorfsed teravate otstega pulgakesed, mis sageli esinevad kokkoididena. Brutsellide kuju sõltub kultuuri vanusest, söötmest ja kasutatud värvimismeetodist. Elunditest valmistatud puutepreparaatides ja noortes kultuurides asetuvad nad ühe- või paarikaupa, harva ahelaina.

Brutsellid kasvavad lihtsöötmeil, paremini maksasöötmeil. Iseloomulik on nende aeglane kasv ja seda eriti just kultuuri isoleerimisel uuritavast materjalist. Nii ilmneb brutselloositekitajate laboratoorsete tüvede kasv 48 - 72 tunni pärast, esmakülvides aga vahel vaid 10 - 15 päeva pärast ja isegi hiljem. Optimaalseks kasvutemperatuuriks on 37°C.

Brutselloositekitajad võivad esineda nii S- kui ka R-vormidena.

Brucella melitensis, Brucella abortus ja Brucella suis pole eristatavad mikroskoobiliselt, põhiliste kultuuriliste omaduste poolest ja tavaliste diagnostiliste seerumite abil. Genus Brucella liikide eristamiseks tuleb uuritaval tüvel määrata rida täiendavaid omadusi. Praktiliselt on nende liikide eristamine suure epidemioloogilise väärtusega.

Brutselloosi mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatak-

se seroloogilisi, harvemini bioloogilisi uurimismeetodeid, samuti haigusetekitaja isoleerimist. Suure praktilise tähtsusega on allergiline nahareaktsioon brutselliiniga.

Uuritav materjal.

Brutsellide isoleerimiseks haigelt uuritakse esimestel haiguspäevadel verd ning sternaalpunktaati ja kolmandast haigusnädalast alates uriini. Uuritakse ka rooja, seljaajuvedelikku, põrna punktaati, röga, mäda jne.

Ägedas haigusperioodis õnnestub isoleerida Brucella melitensis't verest 65 - 90% ja Brucella abortus't 6 - 50% juhtudel. Üksikjuhtudel õnnestub isoleerida brutselle verest isegi 1 - 3 aastat peale haigestumist. Vahel võib brutselle sedastada veres igasuguste kliiniliste haigusnähtude ja haige subjektiivsete kaebuste puudumisel.

Uriinist isoleeritakse brutselle 9 - 14% juhtudel. Vahel õnnestub see aga alles palaviku langemisel või isegi haiguse paranemisjärgus.

Seroloogilisteks reaktsioonideks võetakse verd alates esimestest haiguspäevadest.

Epidemioloogiliselt on suure tähtsusega haigete loomade mikrobioloogiline uurimine - on ju loomad brutselloosi puhul nakkusallikaks. Uurimismaterjaliks on aborteerunud looted ja lootekestad, lootevedelik, platsenta, piim, veri, uriin, roe, mäda jne. Verd ja piima võetakse ka seroloogiliseks uurimiseks.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobilisi uurimismeetodeid kasutatakse tavaliselt ainult veterinaarbakterioloogias mäda, platsenta, lootevedeliku jne. uurimisel. Häid tulemusi annab seejuures Hanseni värvimismeetod.

Hanseni värvimismeetod.

1. Preparaat kuivatada õhus ja fikseerida leegil.
2. Värvida aluselise (0,04% KOH) metüleensinise lahusega 1 min.
3. Veega loputada.
4. Värvida 3%-lise safraniinivesilahusega 15 - 20 sek.
5. Veega loputada, kuivatada, uurida.

Brutsellid on sinised, teised mikroobid ja preparaadi foon punased.

Mikroskoobiline uurimine võimaldab anda ka veterinaarbakterioloogias vaid orienteeriva vastuse.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Brutsellide isoleerimiseks kasutatakse tavaliselt glükoospuljongit ja glükoosagarit, samuti maksapuljongit ja maksaagarit (maksasöötmeid valmistatakse lihavee asemel maksaveel). Teiste mikroobidega reostunud materjali (rooja, uriini, piima) uurimisel lisatakse tahkeile söötmeile gentsiaanavioletti 1:200 000.

Tahkeil söötmeil kasvavad brutsellide S-vormid väikeste ümmarguste kumerate siledate läikivate värvitute pesadena. R-vormide pesad on suuremad, opaaksemad, teralised. Vedelsöötmeis tingivad brutsellid söötmete mõõduka hägunemise ühes hallika sademega.

Brucella abortus'e isoleerimine õnnestub ainult süsihappegaasirikkas keskkonnas, Brucella melitensis ja Brucella suis kasvavad aga tavalistes aeroobsetes tingimustes. Seetõttu tuleb brutsellide isoleerimisel esmaskülve kasvatada paralleelselt nii tavalistes aeroobsetes tingimustes kui ka süsihappegaasirikkas keskkonnas. Brutselloositekitajate aeglase kasvu tõttu hoitakse esmaskülve termostaadis kuu aega, neid süstemaatiliselt kontrollides. Otstarbekohane on teha iga 5 - 7 päeva pärast vedelaist söötmeist külv tahkeile söötmeile.

Verekülvid tehakse vahetult haigevoodi juures, külvates

5 - 10 ml verd 100 ml glükoos- või maksapuljongisse.

Uriini uurimisel külvatakse tsentrifugeerimisel saadud sadet gentsiaanavioletti sisaldavaile tahkeile söötmeile.

Roojast valmistatakse suspensioon füsioloogilises keedusoolalahuses, filtritakse see läbi marlifiltri, lisatakse brutsellide aglutineerivat seerumit ja paigutatakse kaheks tunniks termostaati 37°C juures. Pärast seda külvatakse tsentrifugeerimisel saadud sadet gentsiaanavioletti sisaldavaile tahkeile söötmeile.

Isoleeritud brutsellide puhaskultuuri samastamisel uuritakse tüve morfoloogiat, kultuurilisi omadusi, fermentatiivset aktiivsust (brutsellid ei fermenteeri süsivesikuid ega moodusta indooli) ja antigeenset struktuuri. Edasi määratakse isoleeritud tüve liigiline kuuluvus.

Brutsellide liigi määramine.

Brutsellide üksikliikidele iseloomulikud tähtsamad omadused on toodud alljärgnevas tabelis.

Brutsellide liik	CO_2 vajadus esmaskülvidele	H_2S moodustamine	Kasv värvainetega söötmeil			Kasv muna-söötmeil	
			Aluseline fuksiin 1:25000	Tioniin 1:50000	Gentsiaanavioolett 1:100000	Malahhiit-rohelisega	Malahhiit-rohelisega
Brucella melitensis	-	-	+	+	+	+	+
Brucella abortus	+	±	+	-	+	-	-
Brucella suis	-	+	-	+	-	-	+

Tabelist nähtub, et Brucella melitensis kasvab esmaskülvides aeroobseis tingimusis, samuti toimub kasv aluselise fuksiini, tioniini ning gentsiaanavioleti juuresolekul (mui-

dugi värvainete antud kontsentratsioonide juures) ja nii malahiitroheliseega kui ka malahhiitroheliseta munasöötmeil. Väävelvesinikku Brucella melitensis ei moodusta.

Brucella abortus kasvab esmaskülvides vaid süsihappegaasirikkas keskkonnas. Brucella abortus ei kasva tioniini juuresolekul, samuti munasöötmeil ja produtseerib väävelvesinikku vähesel määral.

Brucella suis kasvab esmaskülvides aeroobseis tingimusis, kuid ei kasva aluselise fuksiini ja gentsiaanavioleti juuresolekul, samuti malahhiitroheliseega munasöötmeil. Brucella suis produtseerib väävelvesinikku.

Brucella melitensis'e, Brucella abortus'e ja Brucella suis'i eristamisel on tähtsaimaks kriteeriumiks uuritava kultuuri kasv värvainetega söötmeil.

Süsihappegaasirikas keskkond luuakse hermeetiliselt suletavas nõus (näiteks eksikaatoris), juhtides sinna süsihappegaasi balloonist läbi gasomeetri. Süsihappegaasi hulk peab moodustama 5 - 10% nõu mahust. Lihtsam on aga külvata uuritav materjal poolele söötme pinnale, teisele poolele aga Escherichia coli kultuuri ja siis Petri tass sulgeda plastiliiniga. Hermeetiliselt suletud Petri tassis tekib süsihappegaasirikas keskkond, sest Escherichia coli tarvitab seal leiduva hapniku ära.

Väävelvesiniku moodustumise määramiseks valmistatakse 48-tunnilisest agarkultuurist suspensioon steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses tihedusega 1 miljard mikroobirakku 1 ml. Üks aasatäis suspensiooni külvatakse längmaksaagarile. Katsutisse kinnitatakse vattkorgi abil küllastatud tinaatsetaadilahusega immutatud filterpabeririba. Külv paigutatakse termostaati 37°C juures. Tulemusi hinnatakse 2., 4. ja 6. päeval. Kui uuritav kultuur produtseerib väävelvesinikku, värvub filterpabeririba alumine ots mustjaspruuniks. Moodustuva väävelvesiniku hulka iseloomustab värvunud viiru laius. Brucella abortus'e kasvu puhul on viiru laius 6. päeval umbes 5 - 6 mm, Brucella suis'i kasvu puhul aga umbes 12 - 13 mm.

Värvainetega söötmete valmistamisel lisatakse vastavaid värvaineid tahkeile või vedelaile söötmeile. Iga värvainega söötmele külvatakse üks aasatäis uuritava kultuuri suspensiooni (suspensioon valmistatakse 48-tunnilisest agarkultuurist tihedusega 1 miljard mikroobirakku 1 ml). Tulemusi hinnatakse pärast 6-päevast külvide hoidmist termostaadis 37°C juures.

Brutsellide S- ja R-vormide eristamine.

Brutsellide S- ja R-vormide eristamiseks kasutatakse mitmesuguseid erisöötmeid (näiteks tetrasoolpurpurit sisaldav lihapeptoonagar) ja reaktsioone. Kõige lihtsam neist on aglutinatsioonireaktsioon trüpaflaviiniga.

Aglutinatsioonireaktsioon trüpaflaviiniga. Valmistatakse 1:500 trüpaflaviinilahus 0,9%-lises keedusoolalahuses. Esemeklaasil annavad selle lahusega brutsellide S-vormid negatiivse, R-vormid aga positiivse aglutinatsioonireaktsiooni.

Bioloogiline uurimine.

Brutselloosi mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse merisigu. Nakatamiseks on kõige sobivamad 350 - 400 g raskused katseloomad, kelle vereseerum ei tohi aglutineerida brutsellide kultuuri lahjenduses 1:5 ja enam.

Merisigu nakatatakse subkutaanselt, süstides neile 0,1 - 0,5 ml uuritavat materjali. Verega võib loomi nakatada ka intraperitoneaalselt (2 - 3 ml). Katseloomi jälgitakse kaks kuud, määrates neil iga 7 - 10 päeva pärast spetsiifiliste antikehade teket aglutinatsioonireaktsiooni abil. Kui aglutinatsioonireaktsioon muutub positiivseks, surmatakse loomad varem.

Lahangul võib suurenenud põrnas ja maksas leida miliaarseid koldeid, mis makroskoobiliselt meenutavad tuberkuloosseid kahjustusi. Lümfisõlmedest, põrnast, maksast, luuüdist, uriinist ja verest tehakse külvid brutsellide isoleerimiseks.

Merisigade puudumisel võib katseloomadena kasutada ka valgeid hiiri.

Seroloogiline uurimine.

Brutselloosi mikrobioloogilisel diagnoosimisel on suur praktiline väärtus seroloogilistel reaktsioonidel, mis põhinevad spetsiifiliste ja blokeerivate antikehade sedastamisel haige vereseerumis. Spetsiifiliste antikehade sedastamiseks kasutatakse aglutinatsioonireaktsioone, komplemendi sidumise reaktsiooni ja opsoniintesti, blokeerivaid antikehi sedastatakse aga Coombsi testi ja blockingtesti abil.

Blokeerivateks antikehadeks nimetatakse antikehi, millede toime vastandina teistele antikehadele ei ilmne füsioloogilises keedusoolalahuses. Blokeerivad antikehad ühinevad antigeeniga aktiivsemalt kui tavalised antikehad - neil on antigeeni suhtes suurem aviidsus. Olles ühinenud antigeeniga, takistavad blokeerivad antikehad antigeeni ühinemast tavaliste antikehadega - blokeerivad antigeeni. Selle tagajärjeks on, et blokeerivate antikehade leidumine uuritavas seerumis takistab tavaliste spetsiifiliste antikehade sedastamist aglutinatsioonireaktsiooni abil. Blokeerivate antikehade antigeeni blokeeriv toime kaob aga suuremates seerumilahjendustes.

Olgu mainitud, et blokeerivad antikehad ei teki mitte ainult brutselloosi puhul. Sellised antikehad tekivad organismis näiteks erütrotsüütides leiduvate Rhesus-süsteemi antigeenide toimel.

Blokeerivatele antikehadele on antud väga palju nimetusi: inkompleetsed ehk mittetäielikud antikehad, univalentsed antikehad, glutiniinid, aglutinoidid.

Aglutinatsioonireaktsioonid.

<u>Wrighti reaktsioon</u>. Brutsellcosi puhul nimetatakse klassikalist aglutinatsioonireaktsiooni katsutis Wrighti reaktsiooniks. Reaktsioon muutub positiivseks juba esimestel hai-

guspäevadel, püsides sellisena tavaliselt ühe aasta vältel. Vahel võib reaktsioon püsida positiivsena ka 2 - 4 aastat. Reaktsiooni diagnostiliseks tiitriks on seerumi lahjendus 1:200.

Wrighti reaktsioon võib olla negatiivne madalates ja positiivne kõrgetes seerumilahjendustes - see on nn. paradoksaalne reaktsioon ehk tsoonifenomen, mis sõltub blokeerivatest antikehadest. Brutselloosi diagnoosimisel on oluline ainult positiivne Wrighti reaktsioon, kuna negatiivne reaktsioon võib olla tingitud ka blokeerivatest antikehadest.

Pasteurella tularensis'el ja brutselloositekitajail on ühtivaid antigeenseid komponente, mistõttu brutselloosihaigete vereseerum lahjenduses 1:50 - 1:100 võib aglutineerida tulareemia diagnostikumi ja vastupidi.

Wrighti reaktsioonis on antigeeniks surmatud brutsellide suspensioon tihedusega 10 miljardit mikroobirakku 1 ml, nn. brutselloosi diagnostikum, mis eelnevalt lahjendatakse füsioloogilise keedusoolalahusega 1:10.

Uuritavast vereseerumist valmistatakse füsioloogilise keedusoolalahusega lahjendused 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 ja 1:800. Iga lahjenduse hulgaks on 0,5 ml. Lahjendustele lisatakse 0,5 ml diagnostikumi, mille tulemusena saadakse seerumi lahjendused 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 ning 1:1600 ja lõplik lahjenduste hulk 1 ml.

Kontrollkatsuteid on kaks: seerumi alglahjendus (1:25) seerumi kontrollina ja 0,5 ml diagnostikumi + 0,5 ml füsioloogilist keedusoolalahust antigeeni kontrollina.

Reaktsiooni hinnatakse pärast 20 - 24 tunnilist seismist termostaadis 37°C juures.

Huddlesoni reaktsioon. Seda reaktsiooni kasutatakse brutselloosi serdiagnostilisel kiirdiagnoosimisel. Reaktsioon muutub positiivseks üheaegselt Wrighti reaktsiooniga, kuid püsib sellisena kauemini. Huddlesoni reaktsioon on brutselloosi diagnoosimisel ainult orienteeriva väärtusega vähese tundlikkuse ja spetsiifilisuse tõttu.

Antigeenina kasutatakse lahjendamata diagnostikumi tihedusega 10 miljardit mikroobirakku 1 ml. Ka uuritavat vereseerumit ei lahjendata. Klaasplaadile (võib kasutada ka esemeklaase) pipeteeritakse 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01 ml ja 0,02 ml uuritavat seerumit. Esimesele neljale tilgale lisatakse 0,03 ml antigeeni, viimasele tilgale aga 0,03 ml füsioloogilist keedusoolalahust (seerumi kontroll). Antigeeni kontrolliks võetakse 0,03 ml antigeeni ja 0,03 ml füsioloogilist keedusoolalahust.

Tilkade sisu segatakse klaaspulgakesega, alates suuremast seerumilahjendusest. Klaasplaati (esemeklaase) soojendatakse ettevaatlikult leegil (vältida auru teket!) ja 5 minuti pärast hinnatakse reaktsiooni tulemusi. Reaktsiooni loetakse positiivseks, kui tilkades 0,02 ml ja 0,01 ml seerumiga on selgesti täheldatav aglutinatsioon.

Huddlesoni reaktsiooni puhul võib samuti esineda tsoonifenomen.

Aglutinatsioonireaktsioon piimavadakuga. Seda reaktsiooni kasutatakse veterinaarbakterioloogias. Kui reaktsioon on positiivne piimavadakuga lahjenduses 1:5, tohib piima tarvitada ainult keedetult või pastöriseeritult.

Komplemendi sidumise reaktsioon.

KSR on spetsiifiline ja väga tundlik. See reaktsioon muutub positiivseks hiljemini kui Wrighti reaktsioon, saavutades oma kõrgpunkti alles esimese haiguskuu lõpuks. KSR püsib aga kauemini positiivsena. Eriti laialdaselt kasutatakse KSR-i veterinaarbakterioloogias.

Opsoniintest.

Opsoniintest põhineb opsoniin-fagotsütaarindeksi määramisel. Opsoniintesti loetakse positiivseks, kui leukotsüüdid sisaldavad keskmiselt 21 - 40 mikroobirakku, ja tugevasti po-

sitiivseks, kui vastav arv on üle 40. See test muutub positiivseks 8. - 10. haiguspäeval.

Coombsi test.

Coombsi test põhineb sellel, et blokeerivad antikehad inimglobuliinina reageerivad küüliku antiinimglobuliin-seerumiga.

Kui Wrighti reaktsioon on negatiivne või esineb tsoonifenomen, tsentrifugeeritakse katsutite sisu 20 minuti vältel 3500 tiiru juures minutis. Saadud sademeid (antigeen) pestakse tsentrifugeerimisel kolm korda füsioloogilise keedusoolalahusega ja lisatakse neile 0,1 ml 1:100 lahjendatud antiinimglobiin-seerumit. Katsuteid loksutatakse korralikult, paigutatakse 18 tunniks termostaati 37°C juures ja hoitakse siis veel kaks tundi toatemperatuuri juures.

Positiivse Coombsi testi korral on katsutite põhjas näha kohevat sadet, negatiivne test väljendub aga ühtlase piirjoonega tiheda kettataolise sademena.

Blockingtest.

Antiinimglobiin-seerumi puudumisel võib blokeerivate antikehade sedastamiseks kasutada blockingtesti. Negatiivse Wrighti reaktsiooni või tsoonifenomeni puhul lisatakse katsutitesse 0,1 ml brutsellide diagnostilist aglutineerivat seerumit eelkatses määratud lahjenduses. Katsuteid loksutatakse korralikult, paigutatakse 18 tunniks termostaati 37°C juures ja hoitakse siis veel kaks tundi toatemperatuuri juures. Kui aglutinatsioonireaktsioon ka nüüd puudub, esinevad uuritavas vereseerumis blokeerivad antikehad, mis takistavad brutsellide ühinemist spetsiifiliste aglutinatsiooni põhjustavate antikehadega.

Tarviliku brutsellide diagnostilise aglutineeriva seerumi lahjenduse määramiseks valmistatakse füsioloogilise keedusoolalahusega seerumi lahjendused 1:20, 1:40, 1:80, 1:160,

1:320, 1:640 jne. kuni seerumi tiitrini. Iga lahjenduse hulgaks on 0,5 ml. Lahjendustele lisatakse 0,5 ml diagnostikumi, loksutatakse, paigutatakse 18 tunniks termostaati 37°C juures ja hoitakse siis veel üks tund toatemperatuuri juures. Kui näiteks lahjenduses 1:320 esineb tugev, lahjenduses 1:640 aga nõrgem aglutinatsioonireaktsioon, kasutatakse blockingtestis seerumit lahjenduses 1:60 (blockingtesti võetakse seerumit 10 korda väiksemas lahjenduses seetõttu, et 0,1 ml seerumit lisatakse 1 ml haige vereseerumi ja diagnostikumi segule Wrighti reaktsioonist).

Allergiline nahareaktsioon.

Brutselloosi diagnoosimisel kasutatakse intrakutaanset allergilist nahareaktsiooni brutselliiniga. Reaktsioon muutub positiivseks 8. - 10. haiguspäeval ja püsib sellisena aastaid, võimaldades diagnoosida brutselloosi ka retrospektiivselt.

Brutselliin on brutsellide kolmenädalase puljongkultuuri filtraat. Süstitakse 0,1 ml brutselliini intrakutaanselt käsivarre sisekülgele. Kontrolliks on vastavas hulgas ja viisil manustatud steriilne füsioloogiline keedusoolalahus. Reaktsiooni hinnatakse 24 ja 48 tunni pärast. Positiivsele reaktsioonile on iseloomulik turse, millele tavaliselt kaasub punetus.

Allergilist nahareaktsiooni kasutatakse ka brutselloosi diagnoosimisel loomadel.

T ö ö ü l e s a n d e d.

1. Demonstratsiooni korras uurida Pasteurella pestis'e preparaate.
2. Demonstratsiooni korras uurida Pasteurella tularensis'e preparaate.
3. Demonstratsiooni korras uurida brutsellide preparaate.
4. Demonstratsiooni korras tutvuda brutsellide kasvuga värvainetega söötmeil.

5. Teha Wrighti reaktsioon haige vereseerumiga, kellel kliiniliselt kahtlustatakse brutselloosi.
6. Teha Huddlesoni reaktsioon brutselloosihaige vereseerumiga.

V praktikum.

Teema: KÕHUTÜÜFUSE JA SALMONELLOOSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Wrighti reaktsiooni hindamine.

Reaktsiooni hinnatakse 24 tunni pärast peale katsutite termostaadis hoidmist 37°C juures. Tulemusi loetakse palja silmaga, hinnates positiivset reaktsiooni ühest kuni nelja plussini järgmiselt:

++++ vedelik täiesti selge, katsuti põhjas on tugev sade;
+++ vedelik õrnalt hägune, põhjas tugev sade;
++ vedelik hägune, põhjas väike sade;
+ vedelik tugevalt hägune, põhjas väga nõrk sade;
± kahtlane reaktsioon,
- regatiivne reaktsioon, suspensioon on ühtlaselt hägune ja katsuti põhjas sadet ei ole.

Olgu märgitud, et õigesti saab hinnata reaktsiooni tulemusi 20 - 24 tunni pärast, mitte aga hiljem, kuna pikemal seismisel tekib sade ka antigeeni kontrollsuspensioonis. Viimases homogeniseerub see aga ühtlaselt katsuti loksutamisel ega näita luubiga vaatlemisel teralisust.

Wrighti reaktsiooni hindamisel võetakse piiriks see seerumilahjendus, milles aglutinatsioonireaktsioon on toimunud vähemalt kahe plussi ulatuses.

Aglutinatsioonireaktsiooni puhul seerumilahjenduses 1:800 loetakse reaktsiooni tugevalt positiivseks; lahjenduses 1:200 - 1:400 - positiivseks, kuna lahjendustes 1:50 - 1:100 hinnatakse reaktsiooni kahtlaseks. Negatiivse või kahtlase reaktsiooni korral on soovitav Wrighti reaktsiooni korrata 7 - 10 päeva möödumisel.

Enterobacteriaceae sugukonda kuuluvate bakterite üldine iseloomustus.

Familia Enterobacteriaceae ühendab arvukaid bakteriliike, mis esinevad inimeste ja loomade soolekanalis. Need bakterid on kõik gram-negatiivsed eosteta lühikesed ümarate otstega pulgakesed, mistõttu neid morfoloogiliste omaduste põhjal üksteisest eristada ei saa. Osa neist on varustatud viburitega, kuna teine osa on püsivalt mitteliikuvad. Kõik kasvavad tavalistel söötmetel. Selle sugukonna üksikud bakteriliigid erinevad aga oma biokeemiliste omaduste ja antigeense struktuuri poolest.

Osa nimetatud sugukonda kuuluvaid baktereid, nagu Escherichia coli, Aerobacter aerogenes jt. esinevad saprofüütidena inimeste ja loomade soolekanalis. Teine osa on aga mitmesuguste soolenakkuste, nagu kõhutüüfuse, paratüüfuse A, B või C, toidumürgistuste, düsenteeria tekitajateks. Nimetatud soolenakkustel on terve rida ühiseid omadusi ja nimelt:

1. Nakatumine toimub mikroobide sattumisel organismi suu kaudu.

2. Bakterid paiknevad ja paljunevad haiges organismis peaasjalikult soolekanalis, mistõttu nad koos roojaga väliskeskkonda eritatakse.

3. Teatud protsent haigust läbipõdenud või isegi terveid isikuid võib roojaga eritada haigusetekitajaid baktereid, olles bakterikandjateks.

4. Haiguse levik toimub reostatud käte vahendusel, määrdunud esemete, toiduainete, vee ja kärbeste kaudu, sõltudes ot-

seselt kommunaal-sanitaaralastest tingimustest ning isikliku hügieeni tavadest.

Arvestades asjaolu, et Enterobacteriaceae sugukonda kuuluvad bakteriliigid morfoloogiliselt ei erine üksteisest ning et katseloomade nakatamine (bioloogiline meetod) on siin diagnoosiks mitterakendatav, toimub neist põhjustatud infektsioonide mikrobioloogiline diagnoosimine põhimiselt bakterioloogilise uurimisena, st. haigusetekitajate isoleerimise ja nende samastamise näol. Peale selle rakendatakse ka seroloogilist uurimismeetodit, mis seisneb spetsiifiliste antikehade määramises nakatunud organismi vereseerumis.

Soolenakkuste bakterioloogilisel diagnoosimisel on uurimismeetodi aluseks patogeensete bakterite biokeemiliste omaduste erinevuse arvestamine normaalse soolefloora esindajaist. Tüüpiline Escherichia coli fermenteerib 24 tunni jooksul laktoosi happe ja gaasi produktsiooniga, kuna patogeensed soolebakterid selliselt laktoosi ei lõhusta. Seepärast külvatakse uuritav roe kahtluse korral kõhutüüfuselę, paratüüfusele või düsenteeriale, laktoosi sisaldavale tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele. Söötmele lisandatud indikaatori värvuse erinevus võimaldab eristada laktoosi fermenteerinud Escherichia coli pesi seda mittefermenteerinud bakterite pesadest. Üksikpesadest isoleeritud bakterikultuuride edasine identifitseerimine toimub nende biokeemiliste omaduste alusel mitmesugustel erisöötmetel, eriti diferentsiaal-diagnostilistes vedelsöötmetes, nn. kirjus reas ja ka seroloogiliselt - aglutinatsioonireaktsiooni abil spetsiifiliste aglutineerivate seerumitega.

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

Salmonella typhi on kõhutüüfuse ja Salmonella paratyphi A, B ja C paratüüfuste A, B, C tekitajaiks. Kõhutüüfus ehk Typhus abdominalis ja kliiniliselt sellele sarnased paratüüfus A, B ja C on ägedad nakkushaigused, mis on iseloomustatud

muutustega peensoole lümfisüsteemis (Peyeri naastud, solitäärfolliikulid, mesenteriaalsed lümfisõlmed), organismi üldise kahjustusega patogeense mikroobi elutegevusproduktidest ja haiguse algperioodil esineva bakterieemiaga - bakterite leidumisega veres.

Mikrobioloogiliselt uuritakse: 1) haigeid, 2) rekonvalestsente bakterioloogilise tervistumise määramiseks, 3) haigetega kontaktis olnud isikuid, 4) toitlustettevõtete, lasteasutuste ja meditsiinitöötajaid bakterikandluse avastamiseks.

Uuritav materjal.

Haigelt võetakse uurimiseks verd, luuüdi punktaati, duodenaalmahla, rooja, uriini. Kahtluse korral bakterikandlusele uuritakse peamiselt rooja, peale selle ka duodenaalmahla ja uriini. Epidemioloogilisel näidustusel võetakse uurimiseks joogivett ja toiduaineid.

Mikrobioloogiline uurimine.

Uurimismeetodina rakendatakse:
1) haigusetekitajate isoleerimist külvides ja
2) seroloogilist uurimist.

Kõhutüüfuse ja paratüüfuse mikrobioloogiline diagnoosimine sõltub haiguse staadiumist.

Juba esimestel haiguspäevadel otsitakse tüüfusekahtlastel haigetel varase diagnoosi sihiga haigusetekitajaid verest või luuüdi punktaadist.

Nimetatud materjalides võib haigusetekitajaid leida esimesel haigusnädalal ligi 90% juhtudel. Kuid ka teisel või kolmandal nädalal võib palaviku püsimisel, samuti ka retsidiivide perioodil leida haigusetekitajaid verest, kuigi juba tunduvalt harvemini. Vere külve on soovitav teha korduvalt, mitte oodates eelmiste külvide tulemusi.

Paralleelselt verekülviga võib juba haiguse algperioodil uurida ka soolesisu - duodenaalmahla, mis võetud keetmisel

steriliseeritud duodenaalsondiga ja ka rooja, viimast küll eriti kõhulahtisuse esinemisel.

Peale 10. - 12. haiguspäeva, paratüüfuse puhul varem, võib leida haige nahapinnal rindkere ja kõhunaha piirkonnas roosakaspunase värvusega ja harvalt asetsevaid täpikesi - roseoole. Selline lööve kujutab endast organismi reaktsiooni naha lümfisoontes metastaatiliselt kogunenud bakteritele. Naha skarifikatsiooni teel saadud koevedeliku bakterioloogilisel uurimisel võib samuti isoleerida kõhutüüfuse - või paratüüfuste tekitajaid.

Haiguse kolmandast nädalast alates, mil soole lümfisüsteemis areneb koekärbus ja kärbunud massi eraldumine koos roojaga, annab rooja bakterioloogiline uurimine sagedamini positiivseid tulemusi. Samuti nagu rooja, uuritakse uriini haigusetekitajate suhtes.

Rooja ja uriini bakterioloogilist uurimist teostatakse ka paranemisperioodis, retrospektiivseks diagnoosiks ja ka tervetel isikutel bakterikandluse kindlakstegemiseks.

Seroloogiline uurimine.

Alates haiguse teisest nädalast kuni paranemiseni otsitakse haige vereseerumist spetsiifilisi antikehi, aglutiniine. Selleks tehakse haigelt võetud vereseerumiga vastavate antigeenide (diagnostikumide) rakendamisel aglutinatsioonireaktsioon Widali järgi.

Kõhutüüfushaige verekülv.

Haigelt võetakse verd kubitaalveenist. Täiskasvanult võetakse verd 10 - 15 ml, väikelastelt 1 - 2 ml. Külvi on soovitav teostada otse haigevoodi juures, mis tunduvalt tõstab positiivse leiu sagedust. Külvatakse vahekorras 1:5 kuni 1:10, s. o. ühe osa vere kohta peab olema 5 - 10 osa söödet.

Juhul, kui otse haigevoodi juures ei ole võimalik külvi teostada, siis kogutakse haigelt võetud veri klaasitükikeste-

ga varustatud kolbi. Viimase loksutamisel 5 - 10 minuti jooksul, nii et kork ei märguks, defibrineeritakse veri. Samuti võib verd koguda kolbi, segades seda 3,8%-lise Natrium citricum'i lahusega vahekorras 1:5. Nimetatud menetlused on vajalikud vere hüübimise vältimiseks, sest hüübes on mikroobide kiire paljunemine pidurdatud. Neil puhkudel, kus veri on kogutud siiski lihtsalt steriilsesse katsutisse ja saadetud laboratooriumi uurimiseks, toimitakse järgmiselt: eraldatakse hüübunud veres peale kogunenud vereseerum aglutinatsioonireaktsiooni teostamiseks, kuna hüüve purustatakse steriilse klaaskepikesega ja viiakse katsutisse loomasapiga.

Vere külviks kasutatakse kõhutüüfuse puhul peamiselt järgmisi söötmeid:

1) 10%-line sapipuljong kolvis 50 - 100 ml,
2) Rappoporti sööde kolvis 50 - 100 ml, milles on 10%-lisele sapipuljongile lisandatud 1% manniiti ja Andrade' indikaatorit. Kolvis on käärimistoruke, mille abil võib sedastada manniidi fermenteerimisel tekkinud võimaliku gaasi olemasolu;
3) steriilne loomasapp, koguses 5 - 10 ml mitmes katsutis, kuhu külvatakse uuritavat verd 1 - .2 ml igasse katsutisse.

Külvid asetatakse termostaati 37°C juures ja kasvu jälgitakse kuni 7 päeva. Kasvu ilmnemisel tuleb ümberkülvide teel tahketele söötmetele isoleerida mikroobi puhaskultuur ja see samastada biokeemiliste ja seroloogiliste omaduste põhjal. Siin on oluline kontrollida kultuuri ka Grami järgi värvitud preparaadis, sest mõnel puhul kasvavad söötmes vaid näiteks nahapinnalt pärinevad stafülokokid või sartsiinid.

Seega võtab patogeense mikroobi isoleerimine haige verest mitu päeva aega, kusjuures töökäik oleks üldjoontes järgmine:

1. päev: haige veri külvatakse a) sapipuljongisse või b) Rappoporti söötmesse või c) loomasappi. Külvid asetatakse termostaati 37°C kuni kasvu ilmnemiseni.

2. (või järgmine) päev: tehakse ümberkülv lihtlängagarile. Diagnoosi hõlbustamiseks võib ümberkülvi teha ka Russelli

söötmele (vt. allpool). Kui esimene külv on negatiivne, korratakse ümberkülve.

3. päev: uuritakse längagaril kasvanud kultuuri järgmiselt:

a) Grami järgi värvitud preparaadis mikroskoobi all, et kindlaks teha selles gram-negatiivsete bakterite olemasolu;

b) aglutinatsioonireaktsiooni abil Salmonella typhi, S. paratyphi A ja B seerumitega. Tüve positiivse aglutinatsiooni korral ühes nimetatud seerumis saab anda (arvestades ka muutusi näiteks Russelli või Rappoporti söötmes) esialgne vastus kultuuri kuuluvuse kohta;

c) tehakse ümberkülv väikesele kirjule reale, 0,5%-lisele püstagarsöötmele ja längagarile.

4. päev: toimub isoleeritud kultuuri lõplik samastamine. Määratakse kultuuri fermentatiivsed omadused ja liikuvus. Korratakse aglutinatsioonireaktsiooni. Vahel ei aglutineeru S. typhi värskelt isoleeritud tüved pindmise Vi-antigeeni sisalduse tõttu O-antiseerumites. Vajaduse korral tehakse siis aglutinatsioonireaktsioon S. typhi Vi-antiseerumiga.

Samuti nagu verd, uuritakse ka luuüdipunktaati tüüfuse- ja paratüüfusetekitajaile.

Rooja külv tüüfuse-paratüüfusetekitajate isoleerimiseks.

Salmonella perekonna mikroobide isoleerimisel uuritavast roojast kasutatakse mitmesuguseid valik- ja kombineeritud elektiiv- ning diferentsiaaldiagnostilisi söötmeid. Need sisaldavad mõningaid patogeensete bakterite kasvu soodustavaid aineid, nagu loomasappi, naatrium-tetrationaati või kaasnevat saprofüütide floorat pidurdavaid aineid, nagu kristallvioletti, briljantrohelist, malahhiitrohelist, sidrunhappe- või desoksühoolhappe sooli jne. Peab aga arvestama seda asjaolu, et viimati nimetatud ained söötmeile lisandatud kontsentratsioonides võivad osaliselt kahjustada ka mõningate tundlikumate patogeensete bakteriliikide kasvu. Seepärast on soovitav uu-

ritav roe külvata paralleelselt mitmesugustele söötmetele.

Võrreldes roojas leiduvate saprofüütide arvuga, on patogeensete bakterite arv selles alati palju väiksem, mis raskendab viimaste isoleerimist puhaskultuurina. Nimetatud põhjusel kasutatakse roojas leiduvate bakterite arvulise vahekorra muutmiseks patogeensete bakteriliikide kasuks mõnede ülalnimetatud ainete lisandusega vedelaid rikastussöötmeid. Sagedamini kasutatud rikastussöötmeks on Kauffmanni briljantrohelist ja tetrationaatnaatriumi sisaldav sapipuljong. Sellesse külvatakse ühes katsutis asuva 7 - 8 ml söötme kohta aasaga võtmisel silmaga nähtav tükike uuritavat rooja või mõni tilk tihedat roojasuspensiooni. Selline suur külvihulk on siin võimalik, arvestades nimetatud söötme küllaltki tugevat saprofüütide kasvu pidurdavat toimet 5 - 20 tunni jooksul. Peale Kauffmanni söötme kasutatakse veel teisi rikastussöötmeid näiteks hüpertoonilist magneesiumkloriidi lahust briljantrohelise lisandusega ja rida teisi.

Rikastussöötmest tehakse ümberkülv mitte varem kui 5 ja mitte hiljem kui 20 tunni möödumisel tahketele elektiiv- ja diferentsiaal-diagnostilistele söötmetele Petri tassides. Arvestades asjaolu, et osalt ka need sisaldavad mitmesuguseid saprofüütide kasvu pidurdavaid aineid, mis võivad aga mõjustada ka tundlikemate patogeensete liikide kasvu, tehakse külvid tavaliselt kahele või kolmele erinevale elektiiv-diferentsiaaldiagnostilisele söötmele. Külvides nimetatud söötmeile otsitakse 24 tundi hiljem laktoosi mittefermenteerinud pesi ja isoleeritakse ümberkülvi teel üksikpesast saadud puhaskultuur. Puhaskultuuri saamine õnnestub aga vaid siis, kui söötmeplaadil on kasvanud üksikult asetsevad, mitte aga laatunud pesad. Samuti takistab puhaskultuuri saamist Proteuse tüvede sageli roniv kasv tahketel söötmetel.

Elektiiv-diferentsiaaldiagnostiliste söötmetena kasutatakse praegu sagedamini alljärgnevaid söötmeid:

1. Endo sööde.
2. Drigalski sööde.
3. Levine' sööde.

4. Broomtümool-laktoosagar sööde. Sellele söötmele soovitatakse lisandada 2%-list metakroomkollase lahust (14 - 15 ml 1 liitri söötme kohta) Proteuse liikide roniva kasvu pidurdamiseks, s. o. Winkle sööde.
5. Ploskirjevi sööde.
6. Wilson-Blairi vismutsulfitagar sööde.

Laktoosnegatiivsest üksikpesast isoleeritud puhaskultuur samastatakse edasisel uurimisel biokeemiliste ja antigeensete omaduste alusel.

Üldiselt toimub rooja ja uriini uurimine kõhutüüfuse-paratüüfusetekitajaile alljärgneva skeemi järgi:

1. päev:

rooja külv Kauffmanni või mõnda teise rikastussöötmesse; sellest 5 - 20 tunni möödumisel ümberkülv näiteks
a) Levine' ja Wilson-Blairi söötmele või
b) broomtümool-laktoosagarile metakroomkollase lisandusega

rooja, uriini või uriinisademe külv otse tahketele söötmetele, nagu
a) Ploskirjevi ja Levine' söötmele või
b) Levine' ja Wilson-Blairi söötmele

2. või 3. päev:

Laktoosi mittefermenteerivate pesade kontroll Grami järgi värvitud preparaadis ja ümberkülv üksikpesast tahkele söötmele puhaskultuuri saamiseks. Selleks kasutatakse näiteks broomtümool-laktoosagarit või Russelli, Preussi või Kligleri söödet, harvemini tavalist längagarit.

3. või 4. päev:

Puhaskultuuri kontroll Grami järgi värvitud preparaadis, orienteeruv aglutinatsioonireaktsioon kõhutüüfuse-paratüüfusetekitajate seerumitega ja ümberkülv järgmistesse söötmetesse:
a) lihtpuljongisse või peptoonvette (indooli ja H_2S määramiseks),
b) glükoospuljongisse (Voges-Proskaueri testi ja metüülpunasetesti tegemiseks),

c) 0,5%-lisse püstagarisse
(mikroobi liikuvuse määramiseks),
d) väikesesse kirjusse ritta
(glükoos, maltoos, manniit, laktoos, sahharoos),
e) lihtlängagarile
(kultuuri puhtuse ja antigeense struktuuri täpsemaks kontrollimiseks).

4. või 5. päev:

Puhaskultuuri biokeemiliste omaduste hinnang. Kontrollitakse aglutinatsioonireaktsiooni ja vajaduse korral tehakse see katsutites tõusvate seerumilahjendustega. Viimane on vajalik neil juhtudel, kus isoleeritud tüvi aglutineerub mitme, näiteks S. paratyphi A ja B seerumitega - homoloogsed bakterid aglutineeruvad kuni seerumitiitrini. Vajaduse korral tehakse tüve täpsemaks samastamiseks aglutiniinide adsorptsioonitest Gastellani järgi.

Tuleb märkida, et ülalnimetatud üldine uurimisskeem võib mõnes osas varieeruda sõltuvalt laboratooriumi töökoormusest ja laborantide töökogemustest.

Massiliste uuringute teostamisel pannakse jooksvas laboratoorses töös erilist rõhku kiirmeetoditele. Nii näiteks võib juba teisel uurimispäeval laktoosnegatiivsete pesadega teha orienteeruv aglutinatsioonireaktsioon. Samast pesast võib teha ümberkülv lihtpuljongisse indooli määramiseks järgmisel päeval. Samast puljongkultuurist võib aga juba 5 - 6 tunni möödumisel teha ümberkülvid kirjusse ritta, längagarile jt. söötmetele. Sel teel saadakse tulemusi ühe päeva võrra kiiremini.

Sageli ei tehta jooksvas laboratoorses töös diferentsiaal-diagnostilistel söötmetel kasvanud laktoosnegatiivsete pesade ümberkülvi mitte teise diferentsiaaldiagnostilise söötme sektorisse Petri tassil, vaid külvatakse vastav materjal Russelli, Kligleri või Preussi söötmesse. Viimati nimetatud söötmed võimaldavad täpsemalt ja kiiremalt eristada kahtlasi kultuure laktoosi mittefermenteerivaist saprofüütidest, millest ainult esimesi uuritakse edasi seroloogiliselt.

Kligleri ja Russelli söötmed, sisaldades laktoosi ja glükoosi koos indikaatoriga ühes ja samas söötmes, asendavad osaliselt väikest kirjut rida, kiirendades seega isoleeritud kultuuri samastamist. Preussi sööde võimaldab aga kiirelt välja lülitada Proteuse liigid.

Tüüfuse-paratüüfusetekitaja isoleerimine vees.

Selleks kasutatakse ühte allpool esitatud meetodeist:

a) Suurem kogus uuritavat vett filtreeritakse läbi membraanfiltri, mis seejärel asetatakse Wilson-Blairi söötme pinnale. Nimetatud söötmel kasvavad kõhutüüfusetekitajad sügavmustade pesadena, piiratud metalse läikega tsoonist. Samasugused on S. paratyphi B pesad, kuna S. paratyphi A pesad on rohekat värvust. Üksikpesa isoleeritakse edasi nii, nagu eespool kirjeldatud.

b) Lisatakse 3 l uuritavale veele 10 ml 10%-list sodalahust ja 5 ml liquor ferri sesquichlorati't. Mõne tunni pärast valatakse pealmine vedelik ära, sade tsentrifugeeritakse ja külvatakse söötmeile. Edasi otsitakse söötmelt laktoosnegatiivseid pesi, mis isoleeritakse ja uuritakse, nagu eespool kirjeldatud.

c) Viimasel ajal kasutatakse ka faagi tiitri tõusu reaktsiooni nimetatud haigusetekitajate kindlakstegemiseks vees.

Söötmeid Salmonella perekonna mikroobide uurimiseks.

Osa kasutatavaid söötmeid (kirju rida, Endo, Levine', Drigalski, Smirnovi, broomtümool-laktoosagar sööde) on leidnud käsitlemist juba üldmikrobioloogia VII praktikumis.

Kauffmanni rikastussööde.

Võetakse 450 ml steriilset lihapeptoonpuljongit, kuhu lisandatakse 22,5 g pulveriseeritud kaltsiumkarbonaati. Siis

lisatakse 10 ml jood-joodkaaliumlahust (20 g joodi, 25 g joodkaaliumi 100 ml aq. dest.), seejärel 50 ml 50%-list steriilset naatriumtiosulfaadilahust, 5 ml 0,1%-list briljantrohelise lahust ja 25 ml steriilset härjasappi. Ainete lisandamisel nimetatud järjekorras tuleb söödet iga aine järel segada. Valada katsutitesse 7 - 8 ml söödet, sealjuures pidevalt loksutades selleks, et kriit ühtlaselt jaguneks katsutitesse. Steriliseerida voolava auru sterilisaatoris 40 min.

Ploskirjevi sööde.

Söödet toodetakse kuivsöötmena ja väljastatakse hermeetiliselt suletud pudelites. Sisaldab kuiva lihapeptoonagarit, sapihappesooli, sidrunhappenaatriumi, naatriumhüposulfitit, laktoosi, sek. naatriumfosfaati, briljantrohelist, kaltsineeritud soodat, joodi, keedusoola ja indikaatorina neutraalpunast.

Kohe enne kasutamist kaalutakse 6 - 7 g kuiva söödet 100 ml destilleeritud veele, segatakse hästi ja kuumutatakse keemiseni. Valatakse Petri tassidesse 10 - 12 ml ja lastakse hanguda 1 tund. Saprofüütide, eriti mitmesuguste kokkide ja osalt ka Escherícha coli kasv on nimetatud söötmes tugevasti pidurdatud. Viimane kasvab söötmel läbipaistmatute punaste pesadena. Salmonella ja Shigella perekonna mikroobid kasvavad sellel läbipaistvate värvitute pesadena. Mõned patogeensed liigid (näit. Shigella dysenteriae) kasvavad aga sellel söötmel halvasti. Ploskirjevi söötme korral võib kasutada jooksvas töös ka mittesteriilseid Petri tasse.

Wilson-Blairi sööde.

Valmistatakse samuti kuivsöötmena. Sisaldab lihapeptoonagarit, vismuttsitraati, glükoosi, Mohri soola, naatriumsulfitit, sek. naatriumfosfaati, briljantrohelist ja kaltsineeritud soodat. Kaalutakse 6 - 7 g kuiva söödet 100 ml destilleeritud veele, segatakse ja keedetakse 3 - 5 min. Jahutatakse kuni 50°C, loksutatakse segi ja valatakse välja Petri tassidesse. Tassid söötmega kuivatatakse termostaadis 1 tund.

Kõhutüüfuse-paratüüfusetekitajad (välja arvatud S. paratyphi A) redutseerivad naatriumsulfitit, millest vismutsoola-

de juuresolekul tekib musta värvusega vismutsulfiid. Pesad on mustad, piiratud metalse läikega tsoonist. S. paratyphi A pesad on väikesed, rohelised, kolibakterite pesad aga rohekaspruunid.

Kuivsöötmena toodetakse meil veel Endo, Levine ja väikese kirju rea pooltahkeid suhkrusöötmeid, kusjuures indikaatoriks on kirju rea söötmeis veesinise (Wasserblau) ja rosoolhappe segu.

Russelli sööde.

Lisatakse 100 ml vesivannis sulatatud 1%-lise lihapeptoonagarile 1 g laktoosi, 0,05 g glükoosi ja 1 ml Andrade indikaatorilahust, steriliseeritakse autoklaavis 112 - 115°C juures 20 min. ja lastakse katsutites längasendis hanguda nii, et katsuti põhjas oleks 3 cm kõrgune püstagarikiht ja selle kohal umbes sama kõrge längpind. Külv tehakse pistena agarisse ning siksakina längpinnale. Glükoosi fermenteerimisel muutub sööde alumises osas punaseks, kuna laktoosi fermenteerimisel värvub ka längpind. Gaasi esinemisel lõheneb agarsöötme kiht.

Preussi sööde.

Vesivannis sulatatud lihapeptoonagarile lisandatakse 1% karbamiidi ehk kusiainet ja 0,5% glükoosi. Indikaatorina lisatakse 0,04% broomtümoolsinise veesilahust, vahekorras 1 osa indikaatori lahusele 9 osa söödet. Valatakse katsutitesse, steriliseeritakse autoklaavis 112°C juures 15 min. ja lastakse hanguda längasendis. Sööde on rohelist värvust. Ureaasi produtseerivad mikroobid, nagu Proteusi perekond, Pseudomonas aeruginosa, Aerobacter aerogenes jt. muudavad leelise reaktsiooni tõttu söötme sellel kasvades siniseks. Salmonella, Shigella perekonna mikroobid, mitte lõhustades karbamiidi, küll aga fermenteerides glükoosi, muudavad söötme kollaseks. Värvuse muutus on nähtav söötmes juba 8 - 10 tunni vanuses kultuuris, Proteuse liikide puhul aga veelgi varem.

Kligleri sööde - (Baderi ning Hotzi modifikatsioonis).

Lisatakse 1 l vesivannis sulatatud ja hästi selitatud 2%-lisele lihapeptoonagarile 10 g laktoosi, 1 g glükoosi ja 10

ml igast järgmisest lahusest: 2%-line raudsulfaadilahus; 0,8%-line naatriumtiosulfaadilahus ja 4%-line naatriumsulfitilahus. Siis lisatakse 24 ml 0,1%-list fenoolpunase lahust (lahustatud 1 osas soojas alkoholis, millele lisandatud seejärel 9 osa soojendatud aq. dest.) ja 2 g karbamiidi. Valatakse katsutitesse 4 - 5 ml ja steriliseeritakse autoklaavis 105°C juures 15 min. Enne kasutamist sulatatakse vesivannis ja lastakse hanguda längasendis nii, et katsuti põhjas oleks 3 cm kõrgune püstagarikiht ja selle kohal samakõrgune längpind. Laktoosi fermenteerijad mikroobid muudavad söötme längpinna kollaseks, laktoosnegatiivsed aga punaseks. Glükoosifermenteerijad muudavad püstagari osa kollaseks, kui aga fermenteerivad kusiainet, siis punaseks. Gaas ilmneb agarisamba lõhenemises, H_2S produktsioon aga mustas värvuses pistekanali suunas.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Hinnata Wrighti reaktsiooni tulemusi.
2. Teostada kõhutüüfusekahtlase haige vere külv 10%-lisse sapipuljongisse.
3. Teha Kauffmanni rikastussöötmest ümberkülv diferentsiaaldiagnostilisele söötmele Petri tassis.
4. Kontrolltöö.

VI praktikum.

Teema: KÕHUTÜÜFUSE JA SALMONELLOOSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Kõhutüüfushaige verekülv (järg).

Eelmisel korral sapipuljongisse tehtud verekülv on muutnud söötme kergelt häguseks. Mikroobi isoleerimiseks tehakse sapipuljongist ümberkülv tahkele söötmele. Kuna nõuetekohase külvitehnika rakendamisel kasvab verekülvis ainult üks, bakterieemiat põhjustanud mikroobiliik, siis võib ümberkülvi teha tavalisele längagarile. Juhul, kui ümberkülv teostatakse steriilse pipeti abil, peab olema äärmiselt ettevaatlik selles, et infitseeritud vedelik ei satuks lauale, kätele ja mujale.

Kõhutüüfushaige roojakülv (järg).

Diferentsiaal-diagnostilisel söötmel Petri tassis otsitakse laktoosi mittefermenteerinud mikroobipesi. Juhul, kui söötmena kasutati broomtümool-laktoosagarit, siis on laktoosi fermenteerinud bakterite (Escherichia coli, Aerobacter aerogenes) pesad kollased, teised aga sinised. Patogeensete liikide isoleerimiseks otsitakse söötmel eraldi seisvad laktoos-negatiivsed pesad, millest tehakse kontrollpreparaat Grami järgi ning seejärel ümberkülv broomtümoollaktoos-agari

sektoritele, längagarile (või Russelli, Preussi, Kligleri söötmele).

Külvid asetatakse taas termostaati 24 tunniks 37°C juures.

W i d a l i r e a k t s i o o n .

Kõhutüüfus-paratüüfushaige vereseerumis tekivad organismi immuniseerimise väljendusena spetsiifilised aglutiniinid, mida saab Widali reaktsiooniga kindlaks teha juba alates teisest haigusnädalast. Vastavalt Salmonella perekonna mikroobide antigeensetele omadustele tekivad vereseerumis O-, H- ja Vi-aglutiniinid. Vi-aglutiniinid on veres madalas tiitris ega ole haiguse diagnoosimisel praktilise tähtsusega, küll aga tervete bakterikandjate avastamisel.

O- ja H- aglutiniinide tiiter tõuseb teisest haigusnädalast alates pidevalt kuni paranemisperioodi alguseni. Algul ilmuvad O-aglutiniinid, vähe hiljem aga H-aglutiniinid.

Tuleb silmas pidada, et ka tervetel isikutel, keda vaktsineeriti kõhutüüfuse vastu, tekivad vereseerumis spetsiifilised aglutiniinid, mis püsivad 3 - 6 kuud peale vaktsineerimist. Organismi retikulo-endoteliaalse süsteemi spetsiifilise sensibiliseerumise tõttu võib vaktsineeritu ka hiljem reageerida isegi mittespetsiifilistele ärritustele spetsiifiliste aglutiniinide tiitri tõusuga (anamnestiline reaktsioon). Samasugust reaktsiooni mehhanismi võib täheldada varem kõhutüüfust või paratüüfust läbipõdenuil. Vaktsineerituil on tegemist peamiselt H-aglutiniinide moodustumisega, mis on tingitud arvatavasti parenteraalsel teel organismi viidud ja termilise töötlemise tõttu mõjustatud O-antigeeni vähemast immuniseerivast toimest. Siiski tekivad, kuigi vähemal määral, ka O-aglutiniinid ja vastupidi - haigetel ka H-aglutiniinid. Seepärast on Widali reaktsiooni õigeks hindamiseks suure tähtsusega reaktsiooni korduv teostamine 5 - 7 päevaste vaheaegadega ja sealjuures täheldatav aglutinatsioonitiitri pidev tõus, hiljem aga tiitri püsimine kõrgetel väärtustel.

Vahel esineb, kuigi harva, kõhutüüfushaigel püsivalt negatiivne Widali reaktsioon.

Widali reaktsiooni teostamiseks võetakse:

1) uuritava haige vereseerum, milles otsitakse aglutiniine;
2) Salmonella typhi ja tavaliselt ka Salmonella paratyphi A ja B, O- ning H-antigeenid;
3) füsioloogiline keedusoolalahus lahjenduste tegemiseks.

Antigeenidena kasutatakse alkoholiga või kuumutamise teel surmatud bakterite suspensioone (O-antigeen) ja formaliniga töödeldud suspensioone füsioloogilises keedusoolalahuses (H-antigeen).

Tavaliselt tehakse tõusvad seerumilahjendused 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ja 1:400, mida valatakse katsuteisse 0,5 või 1 ml. Kontrolliks valatakse ühte katsutisse seerumilahjenduse asemel samas koguses füsioloogilist keedusoolalahust. Siis lisandatakse kõikidesse katsutitesse antigeenilahjendust - 2 - 3 tilka või 0,5 ml, s. o. sõltuvalt antigeeni suspensiooni tihedusest. Selliseid seerumilahjendustega katsutite ridu võetakse niipalju, kuipalju on kasutusel antigeene. Tavaliselt tehakse Widali reaktsiooni samaaegselt S. typhi, S. paratyphi A ja S. paratyphi B vastavate H- ja O-antigeenidega, seega kokku 6-s katsutite reas. Kui laboratooriumis ei ole aga käepärast S. typhi eraldi H- ja O-antigeene, siis kasutatakse sama mikroobi antigeeni suspensiooniga paralleelselt veel S. moscow tüve. Viimasel on S. typhi-ga ühine O-antigeen. Seetõttu kinnitab uuritava seerumi aglutinatsiooni tõus S. moscow antigeenile kõhutüüfuse, mitte aga paratüüfuste diagnoosi.

Statiivid katsutitega asetatakse termostaati 37°C juurde. Peale 2 tunni möödumist võetakse H-antigeenilisandusega katsutid termostaadist välja, loetakse esialgsed tulemused ja jäetakse toatemperatuuri juurde seisma. Katsutid O-antigeenilisandusega hoitakse termostaadis 20 tundi, s. o. järgmise päevani. Järgmisel päeval hinnatakse Widali reaktsiooni tulemusi.

Widali reaktsiooni loetakse positiivseks siis, kui on toimunud aglutinatsioon seerumilahjenduses 1: 200 ja üle selle.

Toidu toksikoinfektsioonide diagnoos.

Nimetatud patoloogiliste protsesside puhul on tegemist väga mitmesuguste mikroobiliikide poolt põhjustatud toidumürgistustega. Haigete loomade, lindude ja kalade liha, piim, munad või juba nende töötlemisel infitseeritud saadused sisaldavad massiliselt mikroobe ja nende poolt produtseeritud toksiine, mis söömisel kutsuvad välja väga ägeda gastroenteriidi.

Sagedasemad toidumürgistuste põhjustajad on mitmesugused Salmonella perekonna mikroobid: Salmonella typhimurium, S. enteritidis, S. choleraesuis, S. newport, S. anatum ja teised. Esineb ka segainfektsioone mitmest Salmonella tüübist.

Peale nimetatud bakterite perekonna on toidumürgistuste põhjustajaiks ka teised mikroobid, nagu Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Shigella sonnei, Pseudomonas aeruginosa jt.

Väga raske toidumürgistuse põhjustajaks on anaeroobne Clostridium botulinum (vt. XI praktikum).

Toidumürgistus võib esineda massilise haigestumisena või üksikjuhtudena sõltuvalt sellest, kui palju inimesi tarvitas toiduks infitseeritud toiduaineid. Peale mõni tund kuni mõni päev kestnud inkubatsiooniperioodi arenevad haigusnähud iivelduse, peavalu, kõhuvalu ja oksendamisega, millele hiljem järgneb kõhulahtisus vedel-vesise rooja eritusega.

Uurimismaterjal ja selle võtmine.

Uurimismaterjaliks on haigestunud isikute roe, oksemassid või maoloputusvedelik, veri ja uriin. Bakterioloogiliselt

tuleb uurida kõiki toiduaineid või nende jäätmeid, mis võisid olla toksikoinfektsiooni põhjustajaiks, samuti köögitöötajate käsi, kööginõusid, nuge, köögilaudu jne.

Haigestunutelt kogutakse uuritavat materjali, nagu rooja, oksemasse ja maoloputusvedelikku steriilsetesse klaasidesse, purkidesse, kolbidesse koguses 50 - 100 ml selleks, et saaks teha ühtlasi ka keemilist analüüsi.

Tahke konsistentsiga toiduproduktidest, nagu liha, kala jne. võetakse uurimiseks materjali pinnalt ja sisemusest. Steriilse noaga eraldatakse tükikesi mitmest erinevast kohast, võimalikult ühes toruluudega, kokku 400 - 500 g. Soolaliha võetakse vastavast tünnist erinevatest kihtidest. Samuti võetakse eraldi uurimisele soolvett. Linnuliha ja mune võetakse tervetena. Konserve tuleb võtta vähemalt 1 - 2 karpi. Sageli võivad riknenud konservidel põhi ja kaas olla välja kummunud, näidates gaasiliste laguproduktide kogunemist sisemuses.

Vedelaid produkte kogutakse peale hoolikat segamist steriilse lusikaga 100 - 200 ml koguses. Haigestunute poolt kasutatud toiduainete jäätmed võetakse uurimisele samas nõus, milles nad on säilinud, pakkides kõik steriilsesse paberisse. Kasutatud toidunõudelt ja laudadelt võetakse kaabet steriilse vatitampooniga või steriliseeritud skalpelliga ning asetatakse need katsutitesse.

Kogu uurimismaterjal tuleb võimalikult kiiresti saata laboratoorseks uurimiseks, kusjuures iga objekt olgu eraldi pakitud, pitseeritud, nummerdatud ja kogu komplekt varustatud üksikasjalise saatekirjaga. Selles peab olema märgitud peale saadetud materjalide loetelu ja päritolu ka vastavale toidumürgistusele iseloomulikud kliinilis-epidemioloogilised lühiandmed. Need on vajalikud vastava laboratoorse uurimismeetodi valikuks.

Laboratooriumis tuleb materjal uurimiseks ette valmistada. Haige roe ja oksemassid emulgeeritakse steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses, kusjuures külviks võetakse, peale emulsiooni seismist, pindmist vedelikku.

Maoloputusvedelikku tsentrifugeeritakse ja saadud sade

külvatakse söötmeile.

Vedelad ja poolvedelad toiduained külvatakse kohe, ilma erilise eelneva töötlemiseta.

Tahke konsistentsiga toiduained peenendatakse ja hõõrutakse uhmris kvartsliivaga või klaasitükikestega ja emulgeeritakse füsioloogilises keedusoolalahuses. Peale tahkete osiste sadenemist kasutatakse külvimaterjalina pealmist, selginenud vedelikku.

Konservidel uuritakse kõigepealt nende hermeetilisust. Selleks asetatakse nad mingis nõus 6 - 7 minutiks vee alla, kusjuures vesi peab olema kuumutatud kuni keemiseni. Õhumullide ilmumine mingis karbi servas näitab hermeetilisuse puudumist.

Siis avatakse uuritavad konservid erilise steriliseeritud puuriga, mille abil tehakse karbi kaane sisse (viimane on samuti alkoholiga ja leegil kuumutamisega steriliseeritud) 1 - 1,5 cm läbimõõduga ava. Vastava ava kaudu võetakse steriilse 0,8 cm läbimõõduga klaastoruga 5 - 6 g konservisisu uurimiseks nii aeroobsetele kui ka anaeroobsetele mikroobidele.

Uurimismeetodid.

Uurimismeetodina kasutatakse mikroskoobilist uurimist, haigusetekitaja isoleerimist külvides mitmesugustele söötmetele, seroloogilist meetodit ja bioloogilist meetodit toksiinide kindlakstegemiseks.

1. Mikroskoobiliselt võib uurida lihakeha ja vorstide lõikepindadelt võetud puutepreparaate või näiteks hakklihast tehtud preparaate, mis värvitud metüleensinisega ja Grami meetodil. Kui mikroskoobis 200-kordse suurendusega uurimisel on näha vaateväljas enam kui 50 - 100 mikroobi, siis on vastavad produktid sanitaarselt kahtlased. Siiski on selline uurimine vaid orienteeruva iseloomuga ega võimalda diagnoosi püstitada.

2. Haigusetekitaja isoleerimine. Külvi meetod sõltub

oluliselt oletatavast, toidumürgistuse põhjustanud mikroobiliigist. Kui on kahtlus Staphylococcus aureus'ele, siis tehakse külvid veriagarile ja lihapeptoonpuljongisse ja uuritakse toksilist toimet katseloomadel (vaata I praktikum). Proteus vulgaris ja Escherichia coli kasvavad hästi tavalistel söötmetel aeroobselt, kuna botulismi kahtluse korral tehakse külvid anaeroobsetes tingimustes ühes vastava bioloogilise testiga (vt. XI praktikum).

Kõige sagedamini on toidumürgistuste puhul siiski tegemist Salmonella perekonna mikroobidega. Neil puhkudel teostub bakterioloogiline uurimine samadel söötmetel ja samadel meetoditel, nagu kirjeldatud kõhutüüfuse-paratüüfusetekitajate uurimisel. Tuleb ainult märkida, et verest õnnestub haigusetekitajat palju harvemini isoleerida kui kõhutüüfuse puhul, sest haiguskulg on väga kiire ja bakterieemia lühiaegne. Roojas ja oksemassides leidub aga tekitajaid suhteliselt sageli. Puhaskultuurina isoleeritud mikroob samastatakse biokeemiliste ja antigeensete omaduste põhjal. Salmonella perekonna mikroobid, peale mõne üksiku erandi, fermenteerivad glükoosi, maltoosi, manniiti happe ja gaasi produktsiooniga, ei koaguleeri piima, ei anna indooli ega veelda želatiini. Kõik on varustatud peritrihiaalsete viburitega ja on seega liikuvad, välja arvatud Salmonella pullorum ja Salmonella gallinarum, mis on mitteliikuvad ilma viburiteta Salmonella tüübid. Siiski ei võimalda biokeemilised omadused täpselt eristada Genus Salmonella mikroobe laktoosi mittefermenteerivaist Escherichia coli variantidest, samuti mitte eraldada samas perekonnas üht liiki teisest. Salmonella perekonna mikroobide laboratoorne samastamine baseerub põhimõtteliselt nende antigeense struktuuri erinevustele.

Salmonella perekonna mikroobid jaotatakse oma rakukeha pindmise O- ehk somaatilise antigeeni põhjal rühmadesse, mida tähistatakse ladina suurte tähtedega A, B, C, D, E jne. Iga rühm on iseloomustatud teatud O-antigeeni komponentidega, mis on iseloomulikud sellele rühmale. Igas rühmas leiduvad mikroobid jagunevad omakorda tüüpidesse oma vibur - ehk H- anti-

geeni põhjal. Viburantigeen võib esineda kahes faasis, spetsiifilises ehk esimeses ja mittespetsiifilises ehk teises faasis. Seepärast saab identifitseerida täpselt Salmonella perekonna mikroobe vaid nende täieliku antigeense koostise alusel, toetudes seejuures ka biokeemilistele omadustele. Arvestades asjaolu, et Salmonella tüüpide arv on väga suur, ulatudes sadandetesse, võib mikroobi samastamine olla väga aeganõudev ja tülikas. Seroloogilise uurimise lihtsustamiseks kasutatakse seepärast isoleeritud mikroobi samastamiseks algul polüvalentset seerumit, mis sisaldab peaaegu kõiki O-aglutiniine Salmonella erinevate tüüpide O-antigeenidele. Sel teel tehakse algul kindlaks mikroobi kuuluvus üldse Salmonella perekonda. Siis määratakse tüve kuuluvus ühte või teise rühma vastavaid O-antigeeni komponente sisaldavate seerumite abil. Lõpuks kasutatakse H-antigeeni komponentidele vastavaid seerumeid või üksikute Salmonella tüüpide täisseerumeid, s. o. selliseid, mis sisaldavad aglutiniine ühe tüübi kõigile O- ja H-antigeenidele.

Orienteerumiseks on esitatud mõnede tähtsamate ja sagedamini isoleeritavate Salmonella tüüpide antigeenne koostis Kauffmann-White'i skeemi põhjal.

Genus Salmonella mõnede
tüüpide antigeenne koostis Kauffmann-White'i skeemis.

Tüüp	O-antigeen	H-antigeen	
		1.faas	2.faas
	A rühm		
S. paratyphi A	1, 2, 12	a	-
	B rühm		
S. paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1,2
S. typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1,2
S. heidelberg	1, 4, 5, 12	r	1,2
S. derby	1, 4, 12	f, g	-
S. essen	4, 12	g, m	-

Tüüp	O-antigeen	H-antigeen	
		1.faas	2.faas
	C rühm		
S, paratyphi C	6, 7, Vi	c	1,5
S. choleraesuis	6, 7	c	1,5
S. typhisuis	6, 7	c	1,5
S. newport	6, 8	e, h	1,2
	D rühm		
S. typhi	9, 12, Vi	d	-
S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
S. moscow	9, 12	g, q	-
	E rühm		
S. anatum	3, 10	e, h	1,6

Tabelist ilmneb, et igas rühmas on O-antigeeni teatud komponent vastavale rühmale iseloomulik, näiteks faktor 2 A rühmas, 4 - B rühmas, 6 - C rühmas, 9 - D rühmas ja 3 - E rühmas. Kui samas rühmas on tüübid O-antigeeni poolest sarnased, siis toimub diferentsimine H-spetsiifilise faasi alusel. Kui aga O- ja H-komponendid samas rühmas on mõlemad sarnased, nagu näiteks C rühmas (S. choleraesuis, S. typhisuis), siis rakendatakse täiendavalt biokeemilisi reaktsioone. Antud juhul erinevad nimetatud S. choleraesuis ja S. typhisuis arabinoosi, trehhaloosi fermentatsiooni ja H_2S produktsiooni poolest.

Sagedasemateks toksiko-infektsioonide põhjustajateks on Salmonella typhimurium, S. heidelberg, S. choleraesuis, S. newport ja S. enteritidis, millede antigeenne koostis on tabelis esitatud.

3. Seroloogiline uurimine.

Real juhtudel on võimalik sedastada haigestunute vereseerumis spetsiifilisi aglutiniine 2. ja 3. nädalal, s. o. siis, kui haiged on juba paranenud. Mõnel juhul on selline retrospektiivne diagnoos siiski vajalik. Metoodika on samasu-

gune nagu kõhutüüfuse Widali reaktsiooni teostamisel. Antigeenidena tuleb aga kasutada mitmesuguste Salmonella tüüpide suspensioone. Kui aga varem õnnestus tekitajat-isoleerida uuritavast materjalist, siis on antigeeni valik lihtne.

4. Bioloogiline uurimine.

Toksiko-infektsiooni puhul uuritakse haigestunute poolt ülejäänud toidujäätmeid veel selliselt, et söödetakse nad valgetele hiirtele. Mitmed Salmonella tüübid, nagu S. choleraesuis, typhisuis, typhimurium on valgetele hiirtele patogeensed, kusjuures S. typhimurium'i puhul saab sel teel kindlaks määrata ka ainuüksi toksiini olemasolu.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Teostada sapipuljongist ümberkülv längagarile mikroobi isoleerimiseks tüüfushaige verest.
2. Tüüfushaige roojakülvist diferentsiaal-diagnostilisel söötmel Petri tassis valida eraldi seisev laktoosnegatiivne pesa, millest teha kontrollpreparaat Grami järgi.
3. Grami järgi värvitud kontrollpreparaadi põhjal uuritud pesast teha ümberkülv broomtümool-laktoosagarsöötme sektorile (või Russelli söötmesse).
4. Teostada Widali reaktsioon S. typhi H- ja O-antigeenidega erinevates seerumilahjendustes.
5. Tutvuda uurimismaterjali võtmise meetodiga toidumürgistuste puhul. Teostada külvid vastavast materjalist Kauffmanni rikastussöötmesse ja diferentsiaal-diagnostilisele söötmele Petri tassis.

VII praktikum.

Teema: SALMONELLOOSIDE, DÜSENTEERIA JA KOOLERA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Kõhutüüfushaige verekülvi uurimine (järg).

Eelmisel korral längagarile tehtud külvis võib näha kasvu laatunud, ilma pigmendita pesade kogumina söötmepinnal. Kultuurist tehtud Grami järgi värvitud preparaadis võib näha mikroskoobilisel uurimisel gram-negatiivseid ümarate otstega ja korrapäratu asetusega baktereid. Kui uurida sama kultuuri külvitulemusi väikesel kirjul real, siis võib täheldada selles glükoosi, maltoosi ja manniidi fermentatsiooni ainult happe produktsiooniga, kuna 0,5%-lise agarsöötme pistekülv näitab mikroobi liikumist - pistejoon pole enam nähtav ja kasv ilmneb häguse pilvena agaris. Et vastavad omadused vihjavad Salmonella typhi esinemisele, siis tehakse seroloogiline uurimine Salmonella typhi aglutineeriva seerumiga.

Juhul, kui väikeses kirjus reas oleks toimunud glükoosi, maltoosi ja manniidi fermentatsioon happe ja ka gaasi produktsiooniga, siis tuleb isoleeritud kultuuri seroloogiliselt uurida Salmonella paratyphi B aglutineeriva seerumiga (arvestades asjaolu, et kliiniliselt ei ole kõhutüüfus paratüüfustest eristatav ning meil esineb sagedamini paratüüfus B).

Aglutinatsioon teostatakse esemeklaasil. Puhta esemeklaasi ühele otsale asetatakse üks tilk S. typhi aglutineerivat seerumit ja teisele otsale üks tilk füsioloogilist kee-

dusoolalahust. Kultuurist võetakse aasaga vähe materjali ja emulgeeritakse algul füsioloogilise lahuse tilgas, siis seerumitilgas. Esemeklaasi ettevaatlikul edasi-tagasi kallutamisel, nii et tilgad mitte laiali ei jookseks ega sõrmi märgaks (Nakkusoht!), tekib positiivsel juhul seerumitilgas aglutinatsioon paljale silmale selgesti nähtava teralisusena. Füsioloogilise lahuse tilgas jääb suspensioon aga ühtlaselt häguseks.

Saadud tulemused võimaldavad haige verekülvist isoleeritud bakterikultuuri identifitseerida Salmonella typhi'na.

K õ h u t ü ü f u s h a i g e r o o j a k ü l v i u u r i m i n e (järg).

Esimesel korral tehti külvid broomtümool-laktoosagarsöötme sektoritele, kus on kasvanud laktoosi mittefermenteerinud klaasjad S. typhi või S. paratyphi kahtlased pesad. Neist võetud materjalist tehakse preparaat ja värvitakse Grami järgi.

Preparaadi mikroskoobilisel uurimisel on näha gram-negatiivseid baktereid.

Edasi teostatakse isoleeritud kultuuri biokeemiliste omaduste uurimine mitmesugustel söötmetel ja ümberkülv längagarile antigeensete omaduste uurimiseks.

Külv tehakse järgnevatele söötmetele:

Väike kirju rida: glükoos
maltoos
manniit
laktoos
sahharoos
lihtpuljong
glükoospuljong
0,5%-line püstagar
nitraatpuljong
piimsööde
želatiinsööde
längagarsööde.

Kohe peale külvi tegemist lihtpuljongisse asetatakse korgi vahelt söötme kohale filterpaberi riba, mis on eelnevalt immutatud Plumbum aceticum'i lahuses. Paberi värvumine mustaks näitab järgmisel päeval H_2S produktsiooni.

Enterobacteriaceae sugukonna mitmesuguste bakteriliikide omadused väiksel kirjul real.

Sooleinfektsioonide bakterioloogilisel uurimisel on eriti oluline haigelt isoleeritud bakterikultuuride biokeemiliste omaduste määramine. See võimaldab roojakülvides esinevate mitmesuguste bakteriliikide diferentsimist, mida omakorda täpsustatakse veel seroloogilise uurimisega mitmesuguste aglutineerivate seerumite abil.

Sagedamini määratakse orienteeruvalt biokeemilised omadused väiksel kirjul real, millele vajaduse korral lisandatakse veel teisi diferentsiaal-diagnostilisi ja erisöötmeid.

Roojakülvides sagedamini leiduvate bakteriliikide biokeemilised omadused on esitatud alljärgnevas tabelis:

Enterobacteriaceae sugukonna esindajate biokeemilised omadused.

	Glükoos	Maltoos	Manniit	Laktoos	Sahharoos	Indool	Metüülpunase test	Voges-Proskaueri test	H_2S produktsioon	Želatiini veeldus	Liikuvus
Salm. typhi	h	h	h	–	–	–	+	–	+	–	+
Salm. paratyphi B	hg	hg	hg	–	–	–	+	–	+	–	+
Escherichia coli	hg	hg	hg	hg	hg±	+	+	–	–	–	+
Aerobacter aerogenes	hg	hg	hg	hg	hg	–	–	+	–	–	–
Proteus vulgaris	hg	hg	–	–	hg	+	+	–	+	+	+
Proteus morganii	hg	–	–	–	–	+	+	–	±	–	+

Märkide seletus: h - fermentatsioon happe produktsiooniga,
hg- fermentatsioon happe ja gaasi produktsiooniga,
+ - positiivne reaktsioon,
- - negatiivne reaktsioon,
± - varieeruv reaktsioon.

W i d a l i r e a k t s i o o n i h i n d a m i n e .

Eelmisel korral teostatud Widali reaktsiooni tulemusi kontrollitakse aglutinoskoobi all, võrreldes alati reaktsiooni igas seerumilahjenduses vastava antigeeni kontrollsuspensiooniga. Katsutite ettevaatlikul liigutamisel aglutinoskoobi all on näha, et kui kontrollkatsutis suspendeerub põhja sadenenud antigeen ühtlaselt homogeensena, siis positiivse aglutinatsioonireaktsiooni korral seerumilahjendustega katsuteis on vedelik ebaühtlane. Aglutinatsioon H-antigeeniga on suurehelbeline, mis vedeliku tugevamal loksutamisel tingib helvete lagunemise vähemateks agregaatideks. Seerumilahjendustes O-antigeeni lisandusega on aga positiivse reaktsiooni korral näha peeneteralist sadet, mis vedeliku loksutamisel püsib ühtlasena. Helvete ja terakeste vahel on vedelik, võrreldes antigeeni kontrollsuspensiooniga, tunduvalt läbipaistvam.

Widali reaktsiooni hindamisel peab arvestama anamnestilise reaktsiooni võimalust. Samuti võib tekitada raskusi hindamisel nn. kaasaglutinatsiooni esinemine. See on nähtus, kus uuritav seerum aglutineerib mitte ainult homoloogset, haigust põhjustanud mikroobi, vaid ka bioloogiliselt lähedasi - heteroloogseid bakteriliike. Nii näiteks võib kõhutüüfushaige seerum, peale Salmonella typhi aglutineerida ka S. paratyphi A, B. paratyphi B ja S. enteritidis mikroobe. Neil on kõigil ühine üks O-antigeeni komponente, mis tähistatakse arvuga 12 Kauffmanni tabelis (vt. Genus Salmonella tüüpide antigeense koostise tabel VI praktikumis). Neil puhkudel tuleb jälgida,

millise antigeeniga on aglutinatsioonireaktsioon kõige kõrgemas tiitris positiivne. Samuti vihjab homoloogsele bakteriliigile, s. o. haigusetekitajale, vähe hiljem (Widali reaktsiooni teistkordsel teostamisel) lisanduv kõrgemas tiitris H-aglutinatsioon. Kuid neil juhtudel, kus mitu erinevat antigeeni aglutineeruvad samas seerumis ühesuguse tiitrini, tuleb homoloogse antigeeni selgitamiseks rakendada Gastellani aglutiniinide adsorptsioonitesti.

Widali reaktsiooni õigeks hindamiseks on oluline aglutiniinide tiitri tõusu dünaamiline jälgimine korduvates, 5 - 7 päevaste vaheaegadega teostatud uuringutes.

Illustratsiooniks esitatakse siinjuures Widali reaktsiooni tulemused, kus rakendati, nagu tavaliselt, Salmonella typhi (Ty), S. paratyphi A (PA), S. paratyphi B (PB) H- ja O-antigeene.

Juht nr. 1.

Aglutinatsioonireaktsiooni tulemused 14-ndal haiguspäeval.

Aglutinatsioon on positiivne järgmistes seerumilahjendustes:

TyH - 1:400
TyO - 1:800
PAH - 1:200
PAO - 1:200
PBH - 1:400
PBO - 1:400

Antud juht vihjab kõhutüüfusele, mida kinnitab aglutinatsioon 1:800 Ty-O-antigeeniga.

Juht nr. 2.

Widali reaktsiooni tulemused teisel haigusnädalal.

TyH - 1:800
TyO - 1:200
PAH - 1:100
PAO - 1:100
PBH - 1:400
PBO - 1:200

Vastav isik oli 6 kuud tagasi vaktsineeritud kõhutüüfuse ja paratüüfuse vastu. Kuna korduval Widali reaktsiooni teostamisel aglutinatsioonitiiter ei tõusnud, (kuigi TyH - 1:800) vihjavad tulemused anamnestilisele reaktsioonile.

Juht nr. 3.

Widali reaktsioon 12-ndal haiguspäeval. Isik on varem ka vaktsineeritud sooleinfektsioonide vastu.

TyH - 1:400
TyO - 1:400
PAH - 1:100
PAO - 1:100
PBH - 1:200
PBO - 1:50

Kõhutüüfusele vihjab kõrges tiitris aglutinatsioon TyH- ja O-antigeeniga.

Juht nr. 4.

Widali reaktsioon 13-ndal haiguspäeval. Isik ei ole varem vaktsineeritud.

TyH - 0
TyO - 0
PAH - 1:400
PAO - 1:400
PBH - 1:50
PBO - 0

Reaktsiooni tulemused vihjavad paratüüfus A-le.

Juht nr. 5.

Widali reaktsiooni tulemused 10-ndal haiguspäeval.
Isik on varem vaktsineeritud sooleinfektsiooni vastu.

TyH - 1:200	Widali reaktsioon korratud 6 päeva järel	TyH - 1:100
TyO - 1:100		TyO - 1:100
PAH - 1:100		PAH - 1:100
PAO - 1:50		PAO - 1:50
PBH - 1:400		PBH - 1:800
PBO - 1:200		PBO - 1:400

Tiitri tõus PB antigeenidele vihjab paratüüfus B-le.

Olgu märgitud, et Widali reaktsioon on siiski vaid abistavaks menetluseks kõhutüüfuse-paratüüfuse diagnoosimisel, kuna suunavaks on eelkõige kliiniline pilt, epidemioloogilised andmed ja bakterioloogiline leid.

Toidu toksiko-infektsioonide uurimine (järg).

Eelmisel korral teostus uuritava materjali külv tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele ja samuti rikastussöötmele.

Broomtümool-laktoosagaril võib leida peaaegu puhaskultuurina laktoosi mittefermenteerivaid siniseid pesi. Edasiseks uurimiseks tehakse:

1. Bbroomtümool-laktoosagarilt valitud üksikust laktoosnegatiivsest pesast preparaat esemeklaasile, mida värvitakse Grami järgi.
2. Peale ülalmainitud praparaadi kontrollimist mikroskoobis samast pesast võetud materjali ümberkülv lihtlängagarile.
3. Kauffmanni rikastussöötmest ümberkülv tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele.

Külvid asetatakse kasvama termostaati 37°C juurde.

Düsenteeria diagnoos.

Bakteriaalne düsenteeria on äge sooleinfektsioon, mis kulgeb palaviku, kõhuvalu, organismi intoksikatsiooni ja jämesoole limaskesta põletiku nähtudega. Tüüpilisemaks sümptoomiks peale palaviku, pea- ja kõhuvalu on düsenteeria puhul kõhulahtisus limase-verise ja ka mäda sisaldava vedela rooja eritamisega. Sageli esineb kergeid haigusvorme, mis kulgevad vaid mööduka kõhulahtisusega. Düsenteeriabakterid lokaliseeruvad jämesooles, põhjustades haavandite, erosioonide ja teiste põletikuliste muutuste teket limaskestal. Erinevalt kõhutüüfusest ja paratüüfusest ei esine düsenteeria

puhul bakterieemiat.

Düsenteeriabakterid on gram-negatiivsed ümarate otstega lühikesed pulgakesed, morfoloogiliselt sarnased teistele soolebakteritele, kuid erinevad Salmonella perekonna bakteritest viburite puudumisega. Kõik düsenteeriabakterid on mitteliikuvad.

Enterobacteriaceae sugukonnas moodustavad düsenteeriabakterid omaette perekonna - Genus Shigella. Mainitud perekond sisaldab terve rea erinevaid liike ja tüüpe, kuid on nende arvu ja antigeense struktuuri poolest vähem kompleksne kui Salmonella perekond.

Biokeemiliste omaduste põhjal võib düsenteeriabaktereid jaotada nelja rühma, kusjuures mõnes, näiteks Bacterium dysenteriae Flexneri ehk Shigella flexneri rühmas eristatakse antigeense koostise põhjal terve rida serotüüpe. Alljärgnevas tabelis on esitatud nõukogude ja rahvusvaheline düsenteeriabakterite klassifikatsiooniskeem, mis omavahel mõnevõrra erinevad.

Rahvusvahelises klassifikatsiooniskeemis asuvad Shigella flexneri B rühmana ja Shigella boydii C rühmana omaette, kuna nõukogude skeemis on nad koondatud ühe liigi - Bacterium dysenteriae Flexneri alla. Seevastu on aga kaks esimest nõukogude skeemis esitatud liiki: Grigorjev-Shiga ja Stutzer-Schmitz, koondatud rahvusvahelises skeemis A rühma, milles eristatakse rida serotüüpe.

Biokeemiliselt on düsenteeriabakterid erineva aktiivsusega. Osa liike fermenteerib manniiti, osa aga mitte. Ainult Shigella sonnei fermenteerib ka laktoosi ja sahharoosi, kuid aeglaselt, alles mitme nädala jooksul. Kõik düsenteeriabakterid produtseerivad suhkrute fermenteerimisel vaid hapet ja ainult Newcastle alaliik võib glükoosi lõhustamisel anda ka gaasi, kuigi mitte alati. Indooli produktsioon on mõnedel liikidel negatiivne, mõnedel positiivne või varieeruv.

Düsenteeriabakterite klassifikatsiooni skeem.

Nõukogude			Rahvusvaheline	Biokeemilised omadused väikses kirjus reas ja indooli moodustumine					
Liik	Alaliik	Tüüp	Rühm	glükoos	maltoos	manniit	laktoos	sahharoos	indool
Bact. dysenteriae Grigorjev-Shiga	-	-	A Shigella dysenteriae serotüübid 1-8	h	-	-	-	-	-
Bact. dysenteriae Stutzer-Schmitz	-	-		h	-	-	-	-	±
Bact. dysenteriae Flexner	Flexner	a b c d e f	Shigella B flexneri serotüübid 1a-6	h	h±	h	-	-	±
	Newcastle			h või hg	-	h±	-	-	-
	Boyd. Nov-Gorodskaja	I II III IV V VI VII	C Shigella boydii serotüübid 1 - 11	h	-	h	-	-	±
Bact. dysenteriae Sonne	-	-	D Shigella sonnei	h	h	h	h aeglaselt fermrnteerit.	h	-

Märkus: ± näitab varieeruvat reaktsiooni erinevatel tüüpidel.

Düsenteeria mikrobioloogiline uurimine.

Uurimismaterjaliks düsenteeria puhul on põhiliselt roe, mida võetakse ägeda ja kroonilise düsenteeria haigelt või bakterikandjalt.

Vereseerumit uuritakse teisest haigusnädalast alates spetsiifiliste aglutiniinide suhtes.

Uurimismaterjali mikroskoobiline uurimine ei anna midagi, vaid kohe teostatakse külve mitmesugustele söötmetele.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Düsenteeriahaige vedel roe on haigusetekitajaid sisaldav ja seega nakkusohtlik juba alates esimestest haiguspäevadest. Uurimistulemused on seda tulemusrikkamad, mida varasemal haigusperioodil rooja uuritakse ning mida värskem on uuritav materjal. Kauemat aega (mitu tundi ja enam) seisnud roojas ei ole düsenteeriabakterid selles esinevate saprofüütide, bakteriofaagi ja teiste tegurite toimele kuigi vastupidavad. Paremaid tulemusi annab seepärast värske rooja külvamine otse haigevoodi juures mitmesugustele erisöötmetele. Üheks meetodiks on uurimismaterjali võtmine rektoskopeerimisel otse jämesoole põletikulisest piirkonnast selleks vastava steriilse vatitampooniga. Juhul, kui tuleb uurimismaterjali saata laboratoorseks uurimiseks kaugemale, segatakse roe mingi konserveeriva vedelikuga, mis pikendab selles düsenteeriabakterite eluvõimet. Sagedamini kasutatavaks konservandiks on segu, mis koosneb 3 osast glütseriinist ja 7 osast 0,6%-lisest keedusoolalahusest. Düsenteeria bakteriofaagi toime inaktiviseerimiseks lisandatakse sellele formaliini vahekorras 1:10 000.

Väga oluline on õige materjali valik külvi teostamisel. Düsenteeriabaktereid võib eriti leida haige roojas esinevates limaniitides ja mädatükikestes. Külvinõelaga võetakse roojast nimetatud elemente ja loputatakse need steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses, mis valatud Petri tassi või kat-

sutisse. Sel teel vabastatakse külvimaterjal osaliselt lima- ja mädatükikeste pinnal asuvatest saprofüütidest. Peale säärast manipulatsiooni asetatakse pestud külvimaterjal tahkele söötmele Petri tassis ja hõõrutakse laiali steriliseeritud Drigalski kepikesega. Massiliste uurimiste teostamisel toimub külv ka lihtsustatud korras: asetatakse aasaga lima- või mädatükike Petri tassi kaane siseküljele, hõõrutakse see materjal seal ühe koha peal vähemateks fragmentideks steriilse Drigalski kepikesega ja tehakse sama kepikesega külv sama tassi põhjal asuvale söötmele laialihõõrumisel tavalises korras. Kui söötmeid on enam, võib ühe Drigalski kepikesega teha külve veel teisele või ka kolmandale söötmele. Siis saame kolmel tassil kasvu kordkorralt hõredama pesade asetusega söötmeil.

Külve tehakse elektiiv-diferentsiaal-diagnostilistele söötmetele, mis mitte üksi ei võimalda laktoosi mitte fermenteerivaid mikroobe eristada laktoosi fermenteerivaist, vaid pidurdavad tunduvalt mitmesuguste saprofüütide, kokkide, kolibakterite jt. kasvu. Selliste söötmetena on tuntud Levine, Drigalski, Winkle, eriti aga Ploskirjevi sööde. Kuna aga Shigella dysenteriae kasvab halvasti või peaaegu üldse mitte Ploskirjevi söötmel, küll aga teised düsenteeriabakterid, siis on soovitav roe külvata paralleelselt mitmele erinevale söötmele. Uurimise käik on üldiselt sarnane bakterioloogilisele uurimisele tüüfuse-paratüüfusetekitajate suhtes ja kulgeks alljärgneva skeemi kohaselt:

1. päev:

Rooja külv Levine' ja Ploskirjevi söötmele (või mõnele teisele ülalnimetatud söötmele).

2. päev:

Laktoos-negatiivsete pesade kontroll Grami järgi värvitud preparaadis ja seejärel üksikpesast võetud materjali ümberkülv längagarile (või kui vastavad söötmed olemas - Preussi või Kligleri söötmele - Genus Proteusi mikroobide eliminеerimiseks, mis produtseerivad ureaasi). Juhul, kui üksikpesast jatkub veel materjali külviks, tehakse ümberkülvid väiksele kirjule reale (või Russelli söötmele) ja 0,5%-lisele püstagarile.

3. või 4. päev:

Kontrollitakse külvi puhtust Grami järgi värvitud preparaadis. Uuritakse biokeemilisi omadusi (väike kirju rida, Russelli sööde jt.) ja vaadatakse, kas mikroob on liikuv või mitteliikuv (0,5%-line püstagar). Sõltuvalt biokeemilistest omadustest (manniit fermenteeritud või mitte) valitakse aglutineerivad seerumid seroloogiliseks uurimiseks. Kui kahtlus Shigella flexneri'le, siis kasutatakse algul polüvalentset seerumit liigi määramiseks, seejärel aga juba üksikuid tüübiseerumeid.

Juhul, kui haige roojakülvist leitakse gram-negatiivne mitteliikuv, ureaasi ja želatinaasi mitte produtseeriv ja H_2S mitteandev bakteriliik, mis fermenteerib tabelis esitatud kujul suhkruid (ainult happe produktsiooniga) ja aglutineerub teatud düsenteeriaseerumiga, võib nimetatud omaduste põhjal samastada see düsenteeriabakterina.

Düsenteeria seroloogiline diagnoos.

Aglutinatsioonireaktsioonil haige vereseerumiga (düsenteeria Widali reaktsioon) ei ole eriti ägeda düsenteeria puhul kuigi suurt praktilist tähtsust. Aglutiniinid tekivad vereseerumis alles teise haigusnädala alguseks ning kaugeltki mitte kõigil haigeil. Kroonilise düsenteeria puhul, mil haigusprotsess on pikaldane ja retsidiveeruv, võib aglutinatsioonireaktsioon olla suurema tähtsusega. Peab aga arvestama spetsiifiliste aglutiniinide tõusu ka düsenteeria vastu vaktsineeritutel esimestel kuudel peale kaitsesüstimisi. Diagnostilise tiitrina tuleb arvestada positiivset aglutinatsiooni seerumilahjenduses 1:200 ja üle selle. Antigeenina tuleb rakendada antud rajoonis sagedamini esinevate düsenteeriabakterite 0,3%-lise formaliiniga töödeldud või elususpensioone. Sagedamini kasutatakse Shigella flexneri a, c, d tüüpide, Newcastle ja Shigella sonnei antigeene.

K o o l e r a m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Koolera ehk Cholera asiatica on äge raskekujuline sooleinfektsioon, mille tekitajaks on elavalt liikuv ühe viburiga varustatud vibrioon - Vibrio comma. Analoogiliselt teistele soolenakkustele toimub nakatumine suu kaudu, nakatatud joogiveega, toiduga või mustade käte vahendusel. Haigusetekitajad lokaliseeruvad peensooles, kus vibrioonide massilisel paljunemisel ja hävimisel vabanenud endotoksiinid kahjustavad soole limaskesta ja kogu organismi, põhjustades raskeid häireid organismi vee ja soolade ainevahetuses. Koolerat iseloomustab äge kõhulahtisus väga sagedase ja rohke vesise roo- ja eritamisega ja piinav oksendamine, millest sugeneb suur koevedeliku ja elektrolüütide kadu. Kergemad haigusjuhud kulgevad sarnaselt toidu toksiko-infektsioonidele. Kuna koolera on äärmiselt nakkav ja raskekujuline haigus, loetakse teda eriti ohtlikuks nakkushaiguseks nagu katku ja rõugeid, millede leviku tõkestamiseks on kehtestatud ranged riiklikud normid sanitaar-seadusandluse näol, samuti ka rahvusvaheline sanitaarkonventsioon.

Koolerat saab diagnoosida ainult bakterioloogilise leiu alusel. Seejuures peab vastavas laboratooriumis rakendama äärmisi ettevaatusabinõusid nakkuse leviku tõkestamiseks ümbrusesse.

Uuritav materjal koolera puhul.

1. Haige vedel, riisitummi meenutav roe ja oksemassid.
2. Koolnulahangul võetud peensoole ja sapipõie sisu.
3. Joogivesi, toiduained.

Olgu märgitud, et koolera puhul ei ole vere uurimine näidustatud ei tekitajaile ega ka spetsiifilistele aglutiniinidele, sest bakterieemiat koolera puhul ei esine. Aglütiniinid tekivad vereseerumis aga alles 7. - 16. haiguspäeval ja ainult osal haigetest.

Uurimismeetodid.

Koolera mikrobioloogilisel diagnoosimisel rakendatakse:
1. Mikroskoobilist uurimist.
2. Külve, eriti teatud kiirmeetodite kasutamisega.

1. Mikroskoobiline uurimine.

Laboratooriumis uuritakse kõigepealt haige rooja limatombukestest tehtud preparaati (Grami järgi värvitult) mikroskoobis ja otsitakse gram-negatiivseid komakujulisi vibrioone. Koolera puhul võib neid leida massiliselt igas vaateväljas. Orienteeruvat mikroskoobilise uurimise tulemust tuleb aga kinnitada bakterioloogilise leiuga.

2. Haigusetekitaja isoleerimine.

Uuritav materjal külvatakse kolbi või katsutisse 1%-lise peptoonveega, mille pH on 8,4 - 9. Leelise reaktsiooniga peptoonvesi on sobivaks rikastussöötmeks koolera vibrioonidele, milles viimased paljunevad juba 6 - 10 tunni jooksul aeroobsetes tingimustes 37°C juures. Peale 6 - 10 tunnilist kultiveerimist võib peptoonvee pinnalt Pasteuri pipetiga võetud materjalis täheldada mikroskoobilisel uurimisel rippuvtilga meetodil elavalt liikuvaid vibrioone. Puhaskultuuri saamiseks tehakse ümberkülv peptoonveest leelise reaktsiooniga liha-peptoonagarile või Dieudonné söötmele. Peale ümberkülvi teostamist tehakse peptoonvee kultuuriga nitroso-indool ehk koolerapunase reaktsioon. Lisades kultuurile peptoonvees mõned tilgad kontsentreeritud väävelhapet, omandab vedelik positiivsel juhul punase värvuse. Ehrlich-Pringsheimi reaktiivi lisandamine kultuurile annab samasuguse reaktsiooni. Nimetatud reaktsioonid on positiivsed kõigi mikroobidega, mis produtseerivad indooli ja redutseerivad nitraate nitriitideks.

Tahkel söötmel (leelisene agar või Dieudonné sööde) otsitakse järgmisel päeval väikesi läbipaistvaid ilma pigmen-

dita vibriooni pesi. Neist tehakse kontrollpreparaat Grami järgi, ümberkülv leelisese reaktsiooniga längagarile, kirju rea süsivesikutele ja orienteeruv aglutinatsioonireaktsioon esemeklaasil kooleratekitaja aglutineeriva seerumiga.

Kolmandal päeval määratakse isoleeritud puhaskultuuri biokeemilised omadused, liikuvus ja aglutinatsioonireaktsioon seerumilahjendustes spetsiifilise O-antiseerumiga. Vibrio comma'l on spetsiifiliseks antigeeniks somaatiline O-antigeen, kuna viburantigeen on patogeensetel ja mittepatogeensetel vibrioonidel ühine.

Vibrio comma fermenteerib glükoosi, maltoosi, manniiti ja sahharoosi ainult happe produktsiooniga ja annab želatiinsöötmes iseloomuliku naelakujulise veeldumise.

Diagnoosi kindlustab samuti kultuuri lüseerumine spetsiifilise polüvalentse koolera bakteriofaagi toimel.

Kiirmeetod koolera diagnoosimiseks.

Silmas pidades koolera bakterioloogilise diagnoosi epidemioloogilist tähtsust, kasutatakse mitmesuguseid kiirmeetodeid, millest tuntum on välja töötatud prof. Z. V. Jermoljeva poolt. Selleks tehakse uuritava rooja külv kolme vedelsöötmesse:

1) peptoonvette,
2) peptoonvette, millele lisandatud kooleratekitaja aglutineerivat O-antiseerumit;
3) peptoonvette, millele lisandatud 0,1% lahustuvat tärklist.

Lisaks tehakse veel külv leelisese reaktsiooniga lihapeptoonagarile.

Juba 6 tunni möödumisel uuritakse vibrioonide kasvu katsutites peptoonveega. Esimesest katsutist võetud materjalis võib rippuvtilgameetodil näha mikroobi all elavat vibrioonide liikumist.

Katsutis koolera aglutineeriva seerumi lisandusega on näha aglutineerunud vibrioonide helbeid vedeliku põhja langemas.

Kolmandasse katsutisse lisandatakse mõni tilk Lugoli lahust. Kooleravibrioonide esinemisel kultuuris ei teki sel puhul tüüpilist sinist värvusreaktsiooni, sest kooleratekitajad hüdrolüüsivad kiiresti tärklist. Tahkel söötmel võib aga leida tüüpilisi pesi edasiseks ümberkülviks ja uurimiseks.

Seega saab nimetatud meetodil, morfoloogiliste biokeemiliste ja seroloogiliste omaduste komplekssel uurimisel samastada Vibrio comma juba 6 tunniga.

Issajev-Pfeifferi fenomeen.

Vahel raskendab koolera mikrobioloogilist diagnoosi asjaolu, et värskelt isoleeritud Vibrio comma tüved aglutineeruvad halvasti või koguni üldse mitte spetsiifilises aglutineerivas seerumis. Neil puhkudel samastatakse isoleeritud mikroob bakteriolüüsi katses Issajev-Pfeifferi järgi.

Uuritavate vibrioonide kultuursuspensiooni süstitakse kõhuõõnde kahele meriseale, neist ühele loomale üheskoos koolera bakteriolüütilise seerumiga, kuna teisele - normaalseerumiga. Umbes 20, 40 ja 60 minuti möödumisel võetakse korduvalt süstlaga punktsiooni teel eksudaati mõlema looma kõhukoopast ja uuritakse mikroskoobiliselt rippuvtilgameetodil. Selle merisea eksudaadis, kes sai vibrioone üheskoos spetsiifilise antiseerumiga, muutuvad vibrioonid liikumatuks, deformeeruvad ja lagunevad lõpuks täielikult. Normaalseerumi lisandamine kontroll-looma eksudaadis ei ole pidurdanud vibrioonide massilist paljunemist, millest loom lõpuks hukkub. Bakteriolüüsiks on teatavasti vajalik komplemendi juuresolek, kuid see tegur on automaatselt olemas eluslooma peritoneaaleksudaadis.

Kooleravibrioonide uurimine vees.

Steriilsesse kolbi võetakse 900 ml uuritavat vett ja lisandatakse sellele 100 ml 10%-list peptoonvett pH-ga 8,4-9,0. Kolb asetatakse termostaati 37°C juurde 8 - 12 tunniks.

Edasine uurimine toimub nagu rooja uurimisel.

Vibrioonide avastamiseks kasutatakse ka membraanfiltreid, samuti faagi tiitri tõusu reaktsiooni.

Söötmed koolera bakterioloogilisel uurimisel.

Peptoonvesi.

Lahustatakse 1 l kuumas destilleeritud vees 100 g peptooni, 100 g keedusoola, 1 g kaaliumnitraati ja 20 g kristalset naatriumkarbonaati. Seejärel filtreeritakse lahus läbi paberi ja steriliseeritakse. Kasutamiseks võetakse 1 osa nimetatud põhisöödet 9 osa destilleeritud vee peale, segatakse ja steriliseeritakse autoklaavis 120°C juures 15 min.

Dieudonné sööde.

Defibrineeritud oina- või veiseveri segatakse võrdses koguses normaalse kaaliumhüdroksüüdilahusega ja segu steriliseeritakse autoklaavis 120°C temperatuuris 20 min. jooksul. Segatakse 3 osa kirjeldatud viisil saadud vere leelisalbuminaati 7 osa vesivannis sulatatud 3%-lise lihapeptoonagariga ja valatakse välja Petri tassidesse.

Enne külve tuleb tasse söötmetega hoida poolavatuna termostaadis 37° juures 24 tunni jooksul liigse ammoniaagi eemaldamiseks, mis võib kasvu takistada.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Uurida verekülvis isoleeritud mikroobi mikroskoobiliselt Grami järgi värvitud preparaadis ja tutvuda ta sahharolüütiliste omadustega väikses kirjus reas; samuti uurida liikuvust 0,5%-lises püstagaris.
2. Teha verekülvist isoleeritud mikroobiga aglutinatsioonireaktsioon esemeklaasil S. typhi aglutineeriva seerumiga. Hinnata tulemusi.
3. Jatkata tüüfushaige roojakülvi uurimist: teha diferentsiaal-diagnostilise söötme sektoris isoleeritud puhaskultuurist preparaat Grami järgi. Sel teel kontrollitud puhaskultuurist teha ümberkülvid mitmesugustele söötmetele:

väiksesse kirjusse ritta, lihtpuljongisse, glükoospuljongisse, nitraatpuljongisse, längagarile, 0,5%-lisse püstagarisse, piima- ja želatiinsöötmesse.

4. Tutvuda Enterobacteriaceae sugukonna tähtsamate esindajate sahharolüütiliste omadustega.
5. Hinnata Widali reaktsiooni eelmise praktikumi tulemuste ja esitatud näidete varal.
6. Jatkata toidu toksiko-infektsiooni bakterioloogilist uurimist:

   Uurida Grami järgi värvitud preparaadis laktoosi mittefermenteerinud pesi tahkelt diferentsiaal-diagnostiliselt söötmelt. Sel teel kontrollitud pesast teha ümberkülv lihtlängagarile.

   Kauffmanni rikastussöötmest teha ümberkülv tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele.
7. Teostada düsenteeriahaige rooja külv Levine ja Ploskirjevi söötmetele.
8. Tutvuda Vibrio comma morfoloogiliste, kultuuriliste ja biokeemiliste omadustega.

VIII praktikum.

Teema: SALMONELLOOSIDE JA DÜSENTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Kõhutüüfushaige roojakülvi uurimine (järg).

Eelmisel korral külvati haige roojakülvist isoleeritud puhaskultuur mitmesugustele söötmetele biokeemiliste omaduste määramiseks.

Külvi tulemusi uuritakse kõigepealt väikses kirjus reas. Seejärel vaadeldakse H_2S produktsiooni filterpaberi värvuse muutuse põhjal, tehakse indooli, metüülpunase ja Voges-Proskaueri reaktsioonid ning Griessi test denitrifikatsiooni sedastamiseks. Vaadeldakse kasvu piimsöötmes ja želatiinis ning uuritakse liikuvuse esinemist 0,5%-lises püstagarsöötmes. Kõik vastavad andmed protokollitakse ja võrreldakse eelmises praktikumis esitatud tabeli andmetega Enterobacteriaceae sugukonna tähtsamate liikide biokeemiliste omaduste kohta. Täheldatud omaduste kompleks on aluseks edasistes seroloogilistes uurimistes. Kui need on iseloomulikud kõhutüüfusetekitajaile, siis tehakse aglutinatsioonireaktsioon kõigepealt S. typhi aglutineeriva seerumiga. Kui aga biokeemilised omadused vihjavad paratüüfusetekitajaile (suhkrud fermenteeritud happe ja gaasi produktsiooniga), siis kasutatakse aglutinatsioonireaktsiooniks S. paratyphi B ja A seerumeid või teisi Salmonella tüüpide seerumeid.

Kõigi nimetatud omaduste kompleksne uurimine võimaldab samastada isoleeritud mikroobi.

Toidu toksiko-infektsiooni mikrobioloogiline diagnoos (järg).

Eelmisel korral külvati toidumürgistuse puhul võetud materjal (haige eritised) rikastussöötmest tahkele diferentsiaal-diagnostilisele söötmele ja teine sama materjal (kahtlastest toiduproduktidest) edasi diferentsiaal-diagnostiliselt söötmelt längagarile.

Nagu eelmisel korral, nii võib ka nüüd leida diferentsiaal-diagnostilisel söötmel Petri tassis peaaegu ainult laktoos-negatiivseid pesi.

Eraldi seisvast laktoos-negatiivsest pesast, samuti ka längagarile külvatud kultuurist tehakse kontrollpreparaat esemeklaasil, mida värvitakse Grami järgi. Samadest materjalidest tehtud külvid väiksele kirjule reale ja 0,5%-lisele püstagarile näitavad Salmonella perekonna mikroobile iseloomulikke omadusi. Lõplik samastamine toimub seroloogiliselt, aglutinatsioonireaktsiooni abil esemeklaasil.

Polüvalentse seerumi abil tehakse kõigepealt kindlaks uuritava tüve kuuluvus Salmonella mikroobide perekonda. Seejärel toimub tüübiseerumite abil tüve täpne samastamine.

Esmajärjekorras kasutatakse seerumitest S. enteritidis (Gärtneri), S. typhimurium (Breslau) ja S. choleraesuis aglutineerivaid seerumeid, sest kõige sagedamini on toidumürgistuste tekitajateks just nimetatud mikroobid.

Toidu toksiko-infektsiooni tekitajaks võib lugeda seda mikroobi, mida leitakse nii haigestunud isikute eritistest kui ka riknenud toiduainetest ja millel esinevad hemoloogsed aglutiniinid paranevate isikute vereseerumis.

Düsenteeria bakterioloogiline diagnoos (järg).

Eelmisel korral Levine ja Ploskirjevi söötmeile tehtud külvides on kasvanud peaaegu ainult laktoosi mittefermentee-

rinud klaasjad ilma pigmendita pesad.

Sellisest eraldi seisvast pesast võetakse materjali preparaadi valmistamiseks. Viimane värvitakse Grami meetodil. Kui preparaadi mikroskoobilisel uurimisel on näha, et tegemist on gram-negatiivsete pulgakestega, võetakse samast pesast materjali ja külvatakse väiksele kirjule reale, längagarile ja 0,5%-lisele püstagarile.

Külvid asetatakse 24 tunniks termostaati 37°C juurde.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Jatkata tüüfushaige roojakülvi uurimist, hinnata kirjus reas toimunud muutused, määrata sahharolüütilised ja proteolüütilised omadused tüvel, liikuvuse olemasolu ja morfoloogilised omadused Grami järgi värvitud preparaadis. Vastavalt biokeemilistele omadustele valida aglutineeriv seerum aglutinatsioonireaktsiooniks esemeklaasil.
2. Jatkata toidu toksiko-infektsiooni bakterioloogilist uurimist.
   Uurida isoleeritud kultuuri morfoloogilisi omadusi Grami järgi värvitud preparaadis, tutvuda selle biokeemiliste omadustega ja teha aglutinatsioonireaktsioon esemeklaasil sagedamini esinevate Salmonella tüübi seerumitega.
3. Jatkata düsenteeria bakterioloogilist diagnoosi.
   Uurida mikrobioloogiliselt Grami järgi värvitud preparaadis mikroobe laktoos-negatiivsest pesast, tahkel diferentsiaal-diagnostilisel söötmel.
   Teha kontrollitud pesast võetud materjali ümberkülv längagarile, 0,5%-lisele püstagarile ja väiksele kirjule reale.

IX praktikum.

Teema: DÜSENTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Eelmisel korral külvati düsenteeriakahtlase haige roojakülvist eraldatud uuritav mikroob mitmesugustele söötmetele.

Kultuurist längagarilt tehakse preparaat, mis värvitakse Grami järgi ja uuritakse mikroskoobis.

Protokollitakse tüve biokeemilised omadused, tehakse kindlaks liikuvuse puudumine 0,5%-lises püstagaris.

Vastavalt isoleeritud tüve biokeemilistele omadustele proovitakse tüve aglutineeruvust ühes või teises düsenteeriatekitajate spetsiifilises aglutineerivas seerumis. Kaunis sageli isoleeritakse düsenteeriahaigelt või bakterikandjatelt atüüpilisi tüvesid, mille samastamine nõuab nende põhjalikumat uurimist ja on seotud suurema ajakuluga.

Iseseisev töö sooleinfektsioonide mikrobioloogilise diagnoosi alalt.

Töö ülesanded.

1. Jatkata düsenteeria bakterioloogilist uurimist. Uurida kultuuri morfoloogilisi omadusi Grami järgi värvitud preparaadis, hinnata biokeemilisi omadusi ja teha aglutinatsioonireaktsioon arvatava düsenteeriabakteri liigiseerumiga.
2. Iseseisev töö.

X praktikum.

Teema: SIBERI KATKU JA GENUS HAEMOPHILUS'E NING GENUS KLEBSIELLA MIKROOBIDE PÕHJUSTATUD INFEKTSIOONIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Siberi katku diagnoos.

Anthrax ehk siberi katk on peaasjalikult rohusööjate loomade, nagu veiste, lammaste, vähemal määral hobuste, sigade, kitsede raskekujuline nakkushaigus. Haigete loomade kaudu võivad nakatuda inimesed. Sõltuvalt nakatumisviisist võib haigus inimesel kulgeda naha-, kopsu-, või soolevormina. Ühe või teise haigusvormi puhul on uurimismaterjali võtmine mikrobioloogiliseks diagnoosiks erinev.

Uurimismaterjal.

1. Nahavormi puhul, kus infitseeritud naha pinnal areneb must- ja koorikuga kaetud paise, võetakse uurimiseks kärbunud koe tükikesi ja paiset piiravate villikeste sisaldist.
2. Kopsuvormi puhul on uuritavaks materjaliks hemorraagiline röga.
3. Soolevormi puhul, mil areneb raskekujuline enteriit, kuulub uurimisele verd sisaldav vedel roe.
4. Peale selle uuritakse verd ülalnimetatud kolme vormi puhul siis, kui protsessi generaliseerumisest on leida haigusetekitajaid veres.
5. Mikrobioloogiliselt uuritakse veel surnud loomade siseelundeid ja objekte, mis võivad olla nakatatud, nagu nahk, vill, harjased jne.

Uurimismeetodid.

Siberi katku diagnoosimisel rakendatakse mikrobioloogilist uurimist, haigusetekitaja isoleerimist, bioloogilist ja seroloogilist uurimismeetodit.

1. Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast materjalist tehakse preparaadid esemeklaasil, millest üht preparaati värvitakse Grami järgi, teist aga Löfleri metüleensinisega 3 - 5 min. Gram-positiivsete, järsult lõigatud otstega jämedate pulgakeste leid, mis nakatatud organismis on piiratud kihnuga, lubab kahtlustada Anthrax'i. Bacillus anthracis asub preparaadis üksikult või lühemate ahelatena. Kindlasti on vaja aga isoleerida mikroobi puhaskultuur ja määrata selle patogeensed omadused.

2. Haigusetekitaja isoleerimine.

Uuritava materjali külvid tehakse lihapeptoonagarile ja lihapeptoonpuljongisse, sest Bacillus anthracis kasvab hästi lihtsöötmetel. Tavalistes tingimustes moodustab siberi katku batsill tahkel söötmel karedaid lainja servaga ja lokitaolise struktuuriga lamedaid pesi, kuna aga CO_2 rikkas atmosfääris annab siledaid pesi. Puljongis on näha vatitaolist sadet katsuti põhjas, kusjuures pinnalt jääb sööde selgeks. Külvidest tehtud mikroskoobilises preparaadis on näha gram-positiivsete pulgakeste katkematuid ahelaid. Raku sees on näha Grami järgi värvimisel värvusetuks jäänud ovaalset ja subterminaalse asetusega eost.

Eoseid võib siberi katku batsillil leida kultuuris või surnud looma organismis, mitte aga elavas (haige) organismis.

Juhul, kui uuritav materjal, näiteks haige roe, nahakoe tükid, surnud looma elundid jm. on tugevalt reostunud kõrvalflooraga, tehakse sellest algul külv puljongisse. Peale kasvatamist 24 tundi 37°C juures kuumutatakse puljongkultuuri

vesivannis 80°C juures 15 - 20 minutit eosteta kõrvalfloora surmamiseks. Siis tehakse samast puljongist ümberkülv lihapeptoonagarile Petri tassis. Viimasest saab 24 tunni pärast isoleerida üksikpesa puhaskultuuri saamiseks ja täpsemaks samastamiseks.

Bacillus Anthracis fermenteerib glükoosi, maltoosi, sahharoosi happe produktsiooniga. Iseloomulik on mikroobi kasv želatiinsöötmes puujuuretaolise koonusena ja aeglase veeldamisega pinnalt.

3. Bioloogiline uurimine.

Mitmed maapinnas, nahapinnal ja soolekanalis leiduvad mittepatogeensed batsillid (Bacillus anthracoides, Bacillus ramosus jt.) on morfoloogiliselt ja kultuuriliselt sarnased Basillus anthracis'ele. Seepärast on Anthrax'i kahtluse korral vajalik määrata uuritavas materjalis oleva mikroobi patogeensus katseloomadele. Valged hiired, merisead ja küülikud on kõik väga vastuvõtlikud Bacillus anthracis'e nakkusele, surres septitseemia tagajärjel 2 - 4 päeva jooksul.

Tavaliselt nakatatakse uuritava materjaliga või sellest isoleeritud kultuuriga valged hiired süstimisel naha alla. Peale looma surma võib lahkamisel leida kõigist siseelundeist ja ka südameverest tehtud preparaatides kihnuga piiratud siberikatkubatsille. Südamevere külvis lihapeptoonagarile või puljongisse kasvab Bacillus anthracis puhaskultuurina.

4. Ascoli termopretsipitatsioonireaktsioon.

Vahel on sellises uuritavas materjalis, nagu nahad, harjased, loomade roiskuvad korjused jne. siberi katku tekitajaid niivõrd vähe, et bakterioloogiline uurimine on tulemusteta. Neil puhkudel rakendatakse seroloogilise meetodina väga tundlikku pretsipitatsioonireaktsiooni Ascoli järgi. Nakatunud organismis kujutab vastav pretsipitinogeen endast spetsiifilist termostabiilset batsilli kihnu polüpeptiidi. Selle kind-

lakstegemiseks toimitakse järgmiselt: uuritav materjal peenustatakse ja asetatakse katsutisse; antigeen ekstraheeritakse paariminutilisel keetmisel 5 - 10 ml-s füsioloogilises keedusoolalahuses. Ekstrakt filtritakse läbi paberfiltri. Saadud vesiselget pretsipitinogeeni kihitatakse Pasteuri pipetiga peenes katsutis olevale mittelahjendatud või ainult 1:2-4 lahjendatud Anthrax'i pretsipiteerivale seerumile. Vedelike kokkupuutepinnal tekib positiivsel juhul valge pretsipitatsioonirõngas.

Genus Klebsiella mikroobide põhjustatud infektsioonide diagnoos.

Siia perekonda kuuluvad mikroobid on eosteta gram-negatiivsed mitteliikuvad bakterid ja moodustavad limakihnu nii nakatunud organismis kui ka kasvamisel kunstlikel söötmeil. Kasvades kõik lihtsöötmetel, annavad nad lihapeptoonagaril limaseid laatuvaid pesi. Klebsiella perekonda kuuluvad bakteriliigid põhjustavad spetsiifilisi patoloogilisi protsesse peamiselt ülemiste hingamisteede piirkonnas.

1. Klebsiella pneumoniae - tekitab kopsupõletikku, milline vorm esineb aga tunduvalt harvemini kui püogeensete kokkide põhjustatud kopsupõletik. Peale selle võib tekitada keskkõrvapõletikke, ajukelmepõletikku, septitseemiat ja enteriite.

2. Klebsiella ozaenae - põhjustab spetiifilist atroofilist riniiti (Ozaena). Sel puhul areneb kroonilise kuluga difuusne nina limaskesta ja ka luu atroofia, mis põhjustab sekundaarinfektsioonist väga ebameeldiva lõhna eritumist haige ümbruses.

3. Klebsiella rhinoscleromatis - selle mikroobi põhjustatud haigusprotsess - Rhinoscleroma on iseloomustatud kroonilise kuluga põletikulise granuloomi arenemisega nina ja neelu limanaha piirkonnas.

Uurimismaterjal.

Haigete röga, ülemiste hingamisteede eritised, koevedelik, harvemini mäda või veri.

Uurimismeetod.

Rakendatakse mikroskoobilist uurimist, haigusetekitaja isoleerimist ja vahel ka seroloogilist ning bioloogilist uurimismeetodit.

Mikroskoobilisel uurimisel (Grami järgi ja metüleensinisega värvitud preparaatides) sunnib gram-negatiivsete ja kihnuga ümbritsetud bakterite leid kahtlustama Klebsiella perekonna mikroobide olemasolu uuritavas materjalis.

Külvid tehakse lihtsöötmetele - lihapeptoonpuljongisse ja lihapeptoonagarile. Tahkel söötmel on näha limaseid laatunud pesi.

Kultuuride edasiseks diferentsimiseks arvestatakse biokeemilisi omadusi ja patogeensust valgetele hiirtele. Seroloogiline samastamine ja tüübi määramine eeldab spetsiifiliste tüübiseerumite olemasolu ja toimub somaatilise, O-antigeeni ja kihnu ehk K-antigeeni määramise alusel. Kasutatakse ka kihnude pundumise testi, nii nagu seda rakendatakse pneumokokkide tüüpide määramisel.

Klebsiella perekonna mikroobe võib eristada alljärgnevas tabelis esitatud omaduste põhjal.

Genus Klebsiella mikroobide omadused.

	glükoos	maltoos	manniit	laktoos	sahharoos	indool	Voges-Proskauer reakts.	tsitraat-test	liikuvus	patogeensus valgetele hiirtele
K.pneumoniae	hg	hg	hg	hg	hg	-	+	+	-	+
K.ozaenae	h	h	h	hx	h±	-	-	±	-	-
K.rhinosclero-matis	h	h	h	-	h	-	-	-	-	-

Seletus: ± varieeruv reaktsioon või fermentatsioon,
x - aeglane fermentatsioon,
Osa K. pneumoniae tüvesid ei anna suhkrute fermenteerimisel gaasi.

Rinoskleroomi diagnoosimisel kasutatakse edukalt komplemendi sidumise reaktsiooni haige vereseerumiga, kusjuures antigeeniks on Klebsiella rhinoscleromatis'e surmatud ja lahjendatud kultuursuspensioon. Reaktsioon on spetsiifiline ja enam kui 90% juhtudel positiivne.

Genus Haemophilus'e mikroobide nakkuste diagnoos.

Brucellaceae sugukonda kuuluv Genus Haemophilus haarab terve rea eosteta gram-negatiivseid väga väikesi pulgakesi, mis oma kasvuks vajavad nõndanimetatud X- ja V-kasvufaktoreid. Nimetatud kasvufaktoritest on termostabiilne X-faktor identne verevärvniku hemiiniga, kuna termolabiilne V-faktor, mis esineb punalibledes, koemahlades ja taimemahlades, on samane kodehüdraas I-ga. Vajadus X- ja V-faktoritele on Haemophilus perekonna mikroobidel erinev. Näiteks vajab H. influenzae kasvuks mõlemat faktorit, H. parainfluenzae aga ainult V-faktorit, kuna seevastu H. ducreyi aga omakorda ainult X-faktorit.

Läkaköha tekitaja mikroob, varasema nimetusega Haemophilus pertussis, erineb ehtsaist Genus Haemophilus mikroobidest selles, et hilisemates külvipassaažides ei vaja enam X- ja V-faktoreid. Nimetatud põhjusel on uuemas kirjanduses vastav haigusetekitaja mikroob eraldatud Bordetella perekonda (teadlase J. Bordet' järgi, kes ühes O. Gengou'ga kirjeldas mikroobi läkaköhahaigete rögapreparaatides 1900. a. ja kultiveeris esimesena 1906. aastal).

Haemophilus influenzae.

Mikroob esineb sageli ülemiste hingamisteede eritistes gripi puhul ühes mitmesuguste püogeensete kokkide ja Klebsiella pneumoniae'ga.

Kuid H. influenzae võib olla ka primaarseks põletikkude, nagu bronhiitide, otiitide, pleuriitide, sinusiitide ja isegi meningiitide tekitajaks.

Uurimismaterjal.

Haigelt kogutud nina-neelulima, röga, mäda, veri või meningiidi puhul liquor cerebrospinalis.

Mikroskoobiline uurimine.

Grami või 1:10 lahj. Ziehli karboolfuksiiniga värvitud preparaatides on näha väikesi kokitaolisi otstes intensiivsemalt värvunud pulgakesi, mis kohati annavad lühikesi ahelaid. Preparaat uuritavast materjalist siiski midagi täpsemalt ütelda ei võimalda.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Külve tuleb teha võimalikult kohe peale materjali kogumist selleks, et vältida väliskeskkonnas vähe resistentsete mikroobide hävimist.

Külvatakse värske vere lisandusega lihapeptoonagarile. Kõrvalfloora pidurdamiseks segatakse söötmele enne väljavalamist Petri tassi 1 - 2 toimeühikut penitsilliini, kuna H. influenzae on ise kaunis resistentne penitsilliinile. Eriti hästi kasvab mikroob nn. šokolaadagaril, milles 5 - 10% küülikuverd lisandatakse vesivannis sulatatud lihapeptoonagarile 80 - 90°C juures. Aeroobseis tingimusis kasvavad tahkel söötmel õrnad kastetilgasarnased pesad ilma hemolüütilise vööndita ümber pesade.

Isoleeritud puhaskultuur diferentsitakse kultuuriliste, biokeemiliste ja teiste omaduste põhjal Bordetella pertussis'est (vt. B. pertussis).

H. influenzae produtseerib glükoosi fermenteerimisel ainult hapet, annab indooli, redutseerib nitraate ja produtseerib ureaasi.

Haemophilus ducreyi.

H. ducreyi on suguhaiguse Ulcus molle ehk pehme šankeri tekitajaks. Genitaalelunditel ja selle ümbruses võib leida haigusetekitajaid mädase põhjaga ja valulikkude haavandite eritisest. Preparaadid värvitakse Grami järgi ja metüleensinisega. Mikroskoobilisel uurimisel on näha lühikesi gram-negatiivseid pulgakesi, mis asetsevad 4 - 8 kaupa ahelas või paralleelsete ahelatena mädarakkude vahel. Haiguse algperioodil asetsevad mikroobid ekstra-, hiljem aga intratsellulaarselt.

Bakterioloogiliseks uurimiseks kultiveeritakse külve aeroobseis tingimusis 37°C juures 3%-lises lihapeptoonagaris 30% küüliku- või inimvere lisandusega, kuhu on lisandatud veel 0,1% tsüstiini. Kasv ilmneb väikeste hallvalgete läikivate pesadena.

H. ducreyi on biokeemiliselt inertne ega fermenteeri suhkruid.

Bordetella pertussis.

Bordetella pertussis on väga nakkava ja raske laste nakkushaiguse - Pertussis'e ehk läkaköha tekitajaks, mis levib haigeilt tervetele peamiselt piisknakkusena.

Uurimismaterjal ja selle võtmine.

Selleks on haige röga ja neelulima. Hõlpsam on seda koguda kõhaplaadile. Köha tekkimisel asetatakse haigele 8-10 cm kaugusele suust avatud Petri tassi põhi sellel asuva söötmega ja lastakse haigel köhida söötmepinnale 4 - 10 korda. Siis asetatakse tass suletuna termostaati 37°C juurde.

Diagnoosimiseks kasutatakse bakterioloogilist, seroloogilist ja bioloogilist meetodit, kuna algmaterjali mikroskoobiline uurimine ei võimalda midagi kindlat öelda.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Parimaks söötmeks kõhaplaadi kasutamisel on Bordet-Gengou' kartul-glütseriinveriagar, millele on lisandatud 1 - 2 toimeühikut penitsilliini kõrvalfloora kasvu pidurdamiseks.

Kasv areneb 3 - 4 päeva möödumisel väikeste ümarate opaaksete pärlmutriläikega pesadena. Pesad on piiratud õrna hemolüütilise vööndiga. Peale üksikpesa kontrollimist Grami järgi värvitud preparaadis isoleeritakse puhaskultuur ja samastatakse kultuuriliste (pesakuju) biokeemiliste (ei fermenteeri suhkruid, ei anna indooli ega redutseeri nitraate), seroloogiliste (aglutinatsioonireaktsioon spetsiifilise seerumiga) ja toksiliste (nahatest küülikutel) omaduste alusel.

Seroloogiline uurimine.

Haiguse 2. - 3. nädalast alates on enam kui 70% juhtudel võimalik sedastada haigete vereseerumis aglutiniine ja komplementi siduvaid antikehi, kasutades antigeenina B. pertussis S-vormi suspensioone.

Bioloogiline uurimine.

Eriti Haemophilus influenzae ja Bordetella pertussis'e eristamiseks kasutatakse nahatesti küülikutel. Süstides küülikule karvadest vabastatud nahasse intrakutaanselt 0,2 ml bakterite suspensiooni, tekib 24 tunni möödumisel Bordetella pertussis'e puhul kohalik nahanekroos, H. influenzae puhul aga ainult erüteem ja infiltraat.

Bordet-Gengou' sööde läkaköhatekitaja isoleerimiseks.

Lisatakse 100 g pestud ja peeneks lõigatud kartulitükikesi 200 ml-le 4%-lisele glütseriinveele. Segu steriliseeritakse autoklaavis 10 min. jooksul 115°C juures, seejärel filtreeritakse. Segatakse 50 ml nimetatud segule 150 ml 0,6%-list keedusoolalahust ja 5 g agar-agarit, sulatatakse Kochi

aparaadis, valatakse katsutitesse ja steriliseeritakse. Enne kasutamist sulatatakse sööde vesivannis, jahutatakse siis 50°C temperatuurini ja lisatakse võrdses koguses defibrineeritud inimese- või küülikuverd. Kõrvalfloora pidurdamiseks lisandatakse söötmele üks toimeühik penitsilliini.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Lõpetada iseseisev töö.
2. Värvida Grami järgi ja Löffleri metüleensinisega preparaadid Bacillus anthracis't sisaldava materjaliga nakatatud valgete hiirte kõhukoopa eksudaadist. Mikroskoobilisel uurimisel otsida neis siberikatku tekitajaid batsille.
3. Uurida preparaati Bacillus anthracis'e puhaskultuurist. Tutvuda sama mikroobi kasvuomadustega tahkeil ja vedelsöötmeis.
4. Jälgida Ascoli termopretsipitatsioonireaktsiooni teostamist.
5. Uurida Klebsiella pneumoniae kasvuomadusi tahkeis ja vedelsöötmeis.
6. Värvida Löffleri metüleensinisega preparaat Klebsiella pneumoniae'ga nakatatud valge hiire kõhukoopa eksudaadist ja pöörata mikroskoobilisel uurimisel tähelepanu bakterirakku ümbritseva kihnu olemasolule.
7. Tutvuda Bordetella pertussis'e mikroskoobilise preparaadiga, mis on tehtud nimetatud mikroobi puhaskultuurist.

XI praktikum.

Teema: GAASGANGREENI, TEETANUSE JA BOTULISMI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Gaasgangreeni mikrobioloogiline diagnoos.

Gaasgangreeni e. anaeroobset haavainfektsiooni põhjustavad G. Clostridium'isse kuuluvad mikroobid. Nendest tähtsamad on: Clostridium perfringens, Clostridium novyi, Clostridium septicum, Clostridium histolyticum.

Gaasgangreeni tekitajad on gram-positiivsed ümmarguste otstega pulgakujulised mikroobid, mis moodustavad tsentraalselt või subterminaalselt asetatud eoseid. Mikroobid liiguvad aktiivselt peritrihhaalsete viburitega. Ainsana Cl. perfringens on liikumatu ja organismis moodustab kihnu. Gaasgangreeni tekitajad on obligaatsed anaeroobid. Nii organismis kui söötmetel kasvades moodustavad nad tugevatoimelisi eksotoksiine.

Uuritav materjal.

1. Haigelt võetav materjal:
koetükikesed vigastatud kohast, eriti nekrotiseerunud koeosad, haavaeritis.

2. Kirurgiline- ja sidematerjal:
vatt, marli, tampoonid jne.

3. Ravimid ja bakteriaalsed preparaadid.

Mikroskoobiline uurimine.

Materjalist valmistatakse 2 preparaati, mis värvitakse metüleensinisega ja Grami meetodi järgi. Kui materjalis esinevad gaasgangreeni tekitajad, on preparaadis näha pulgakujulisi mikroobe subterminaalselt või tsentraalselt asetatud eostega. Mikroskoobilise meetodiga ei ole võimalik öelda, milline liik esineb materjalis. Kui aga metüleensinisega värvitud preparaadis on näha kihnuga mikroobe, võib oletada Cl.perfringens'i esinemist materjalis.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Gaasgangreeni tekitajad kasvavad süsivesikuid või natiivseid valke sisaldavatel söötmetel anaeroobsetes tingimustes. Enne külvamist kuumutatakse materjal 80°C juures 20 min. jooksul teiste, eosteta mikroobide hävitamiseks.

Kogu anaeroobse mikrofloora määramine uuritavas materjalis võtab aega mitu nädalat. Selletõttu kasutatakse sageli kiirmeetodit, mille puhul määratakse just Cl. perfringens kui kõige sagedasem gaasgangreeni tekitaja (44 - 90%). Uuringutulemused saab siis juba 24 - 48 t. jooksul.

Uuritavat materjali külvatakse vedelsöötmetesse Pasteur'i pipetiga ettevaatlikult, et õhku ei satuks söötmesse. Tahketesse söötmetesse teostatakse pistekülv katsuti põhjani. Samaaegselt külvatakse materjali 4 söötmesse:

1. Kitt-Tarozzi sööde.
2. Piimsööde (värske rasvavaba piim steriliseeritakse Kochi aparaadis 3 päeva 30 min.).
3. Wilson-Blairi sööde.
   (100 ml lihapeptoon-agarile lisatakse 2 g glükoosi, 10 ml 20%-list Na_2SO_3 ja 1 ml 8%-list $FeCl_3$. Sööde valatakse katsutitesse (8 - 10 ml, steriliseeritakse 120°C juures 30 min. jooksul).

Kui materjalis esineb Cl. perfringens, siis 1 - 3 t. jooksul muutub Wilson-Blairi sööde mustaks väävli- ja rauaühendite reduktsiooni tõttu ja puruneb tingituna gaasi eral-

dumisest. Piimasöötmes toimub 6 t. jooksul piima kalgendumine suurte tükkidena koos gaasi eraldumisega. Kitt-Tarozzi söötmes kasvab Cl. perfringens 24 - 48 t. jooksul ühtlaselt häguselt, söötmes tekib suurel hulgal gaasi. Veriagarplaadil kasvavad mikroobid ümmarguste hallikate või rohekate selge hemolüüsi tsooniga pesadena, sööde muutub šokolaadivärviliseks.

Kui preparaadis on näha gram-positiivseid kihnuga pulgakujulisi mikroobe ja söötmetes toimuvad ülaltoodud muutused, võib materjalis oletada Cl. perfringens'i esinemist.

Anaeroobide samastamiseks tuleb veriagarplaadilt erinevatest pesadest isoleerida puhaskultuurid ja määrata nende kultuurilised ja biokeemilised omadused.

Cl. perfringens fermenteerib süsivesikutest glükoosi, maltoosi, laktoosi, sahharoosi paari päeva jooksul. Mikroob veeldab želatiini, kalgendab piima 6 - 10 t. jooksul hulgalise gaasi eraldumisega.

Cl. novyi fermenteerib glükoosi ja maltoosi, veeldab želatiini, põhjustab veriagaril hemolüüsi ja kalgendab piima 12 - 24 t. jooksul.

Cl. septicum fermenteerib glükoosi, maltoosi, laktoosi, veeldab želatiini, põhjustab veriagaril hemolüüsi, kuid piima kalgendab aeglasemalt kui teised liigid.

Cl. histolyticum ei fermenteeri süsivesikuid, veeldab želatiini, hemolüüsi ei põhjusta, piima peptoniseerib.

Isoleeritud haigusetekitaja samastatakse aglutinatsioonireaktsiooni abil või seroprotektsioonitestiga.

48 t. vanune puljongkultuur tsentrifuugitakse. Sademest valmistatakse suspensioon füsioloogilise keedusoolalahusega, mis on antigeeniks. Aglutinatsioon spetsiifilise seerumiga toimub 37° C juures 24 t. või 40°C juures 2 - 3 t. jooksul.

Seroprotektsiooni testi puhul süstitakse valgetele hiirtele naha alla 0,5 ml 24 t. vanust puljongkultuuri (võib olla ka Kitt-Tarozzi sööde), mis eelnevalt on segatud 0,2 ml teatud anaeroobi antitoksilise seerumiga. Elama jääb ainult see katseloom, kellele on süstitud mikroobi eksotoksiinile vasta-

Clostridium'i perekonda kuuluvate mikroobide omadused.

Mikroobi nimetus	Muutused piimsöötmes	Želatiini veeldamine	Hemolüüs	Süsivesikute fermentatsioon					Liikuvus
				glükoos	maltoos	maniit	laktoos	sahharoos	
Clostridium perfringens	kiire kalgendus	veeldab 24 t. jooksul	+	+	+	-	+	+	-
Clostridium novyi	kiire kalgendus	veeldab	+	+	±	-	-	-	+
Clostridium septicum	aeglane kalgendus	veeldab	+	+	+	-	+	-	+
Clostridium histolyticum	peptonisatsioon	veeldab	-	-	-	-	-	-	+
Clostridium tetani	mittetäielik peptonisatsioon	veeldab	±	-	-	-	-	-	+
Clostridium botulinum	täielik peptonisatsioon 1 - 2 p. jooksul	veeldab	+	+	+	-	-	-	+

vat antitoksilist seerumit. Teised loomad surevad mõne päeva jooksul.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomaks on merisiga või valge hiir. Loomale süstitakse lihasesse 24 t. vanust puljongkultuuri 0,5 - 1 ml. Patoloogilised nähud tekivad 12 - 24 t. jooksul. Loomi jälgitakse 2 - 3 öö-päeva kestel.

Cl. perfringens'i ja Cl. septicum'i esinemisel süstekohal ja selle ümbruses muutub nahk märjaks ja omandab violetse värvuse. Palpatsioonil krudiseb nahaalune kude, mis on tingitud gaasi tekkest. Lihased on algul määrdunud hallika värvusega, hiljem tekib müolüüs. Katseloom sureb sepsisesse. Siseelundeist ja verest tehtud külvid on positiivsed.

Cl. novyi esinemisel tekib kudedes želatinoosne ödeem. Nahk on kollakaspunase värvusega ja krudiseb palpatsioonil. Lihased on tugevasti hüpereemilised lillakaspunase värvusega ja sisaldavad sültja konsistentsiga eksudaati. Lahangul esinevad mikroobid kõigis siseelundeis ja veres.

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

Teetanuse e. kangestuskramptõve tekitajaks on Clostridium tetani.

Teetanus on tüüpiline haavainfektsioon, kuna tekitajad satuvad organismi ainult vigastatud naha haavade, kriimustuste jne. kaudu. Teetanusetekitajad ja nende eosed esinevad normaalselt loomade seedetraktis ja satuvad sealt roojaga maapinda. Nahavigastuste kokkupuutumisel mullaga, tolmuga jne. satuvadki mikroobid ja nende eosed organismi.

Teetanusetekitajad on pulgakujulised ümarate otstega mikroobid, moodustavad ümmargusi või veidi ovaalseid terminaalselt asetatud eoseid. Eosega mikroob meenutab kujult tennisreketit või trummipulka. Cl. tetani on aktiivselt liikuv

peritrihhaalsete viburite abil. Nii organismis kui ka kunstlikel söötmetel moodustavad mikroobid tugevatoimelist eksotoksiini.

Uuritav materjal.

1. Haigelt võetav materjal: koetükikesed vigastatud kohast, haavaeritis, mäda, võõrkehad haavas.
2. Kirurgiline ja sidematerjal: vatt, marli, õmblussiid jne.
3. Ravimid ja bakteriaalsed preparaadid.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobilise meetodiga on Cl. tetani't raske avastada, kuna uuritavas materjalis on haigusetekitajaid vähe.

Materjalist valmistatakse äigepreparaat ja värvitakse Grami meetodi järgi. Teetanusetekitajate esinemise korral materjalis on näha preparaadis gram-positiivseid terminaalsete eostega mikroobe.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Bakterioloogilist meetodit kasutatakse kõrvuti bioloogilise meetodiga. Ka see uuring osutub sageli negatiivseks haigusetekitajate vähesuse tõttu uuritavas materjalis.

Cl. tetani kasvatamiseks kasutatakse süsivesikuid ja natiivseid valke sisaldavaid söötmeid. Kuna teetanusetekitajad on obligaatsed anaeroobid, siis kasvavad nad ainult anaeroobsetes tingimustes. Hapniku eemaldamiseks keedetakse vedelsöötmeid vesivannis 10 - 20 min. jooksul enne külvi teostamist, kuna kultuurid Petri tassides asetatakse anaerostaati (vt. üldosa IX praktikum).

Kultuuri isoleerimiseks kuumutatakse uuritavat materjali teiste, eosteta mikroobide hävitamiseks 80°C juures 20 min. jooksul ja külvatakse võimalikult suures koguses Pasteuri pipetiga suhkrupuljongisse või Kitt-Tarozzi söötmesse (maksapuljong). Võib kuumutada ka juba külvatud söötmeid. Cl. tetani kasvab 37°C juures aeglaselt - 2-4 päeva jooksul. Sööde

muutub veidi häguseks, gaasi eraldub nõrgalt. Puhaskultuuri isoleerimiseks teostatakse ümberkülv vedelsöötmest glükoosveriagarplaadile, kus teetanusetekitajad kasvavad kahesuguselt: kas hallikate ebakorrapärase äärisega hemolüüsi tsooniga ümbritsetud pesadena või siledate läbipaistvate hemolüüsi tsoonita pesadena.

Isoleeritud puhaskultuuril määratakse biokeemilised omadused. Cl. tetani süsivesikuid ei fermenteeri, želatiini veeldab 4 - 5 päeva jooksul, produtseerib indooli.

Järgnevalt teostatakse kultuuri samastamiseks aglutinatsioonireaktsioon. 48 t. vanune puljongkultuur tsentrifuugitakse. Saadud sademest valmistatakse füsioloogilise keedusoolalahusega suspensioon, mis on antigeeniks. Mikroobide aglutinatsioon spetsiifilise seerumiga peab toimuma 2-3 t. jooksul 40°C juures. Kultuuri võib samastada ka bioloogilise meetodiga.

Bioloogiline uurimine.

Teetanuse diagnoosimiseks kasutatakse esmajoones bioloogilist meetodit. Katseloomaks on valge hiir või merisiga. Uuritavat materjali või 4 - 12 päeva vanust puljongkultuuri filtraati süstitakse 0,3 - 0,5 ml katseloomale naha alla. Loomi jälgitakse 4 - 5 päeva jooksul. Tavaliselt 1 - 2 p. pärast ilmuvad teetanusele iseloomulikud nähud: süstimiskohalähedaste lihaste ja saba rigiidsus. Katseloom sureb üldise lihaste spasmiga, tagajäsemed välja sirutatud.

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

Botulism on toidu toksikoinfektsioon, mille tekitajaks on Clostridium botulinum. See on jäme pulgakujuline mikroob, mis moodustab subterminaalselt asetatud eose. Mikroobid liiguvad peritrihhaalsete viburitega, on obligaatsed anaeroobid ning moodustavad väga tugevatoimelist eksotoksiini.

Uuritav materjal.

1. Toiduained: kala, liha, konservid, juurvili jne.
2. Haigelt võetav materjal: veri, oksemassid, uriin, roe.
3. Sektsioonil võetav materjal: maosisu, peen- ja jämesoole osad koos sisuga, veri, pea- ja seljaaju.

Liha saadetakse uurimiseks laboratooriumisse suurte tükkidena, mitte vähem kui 500 g, et oleks võimalik võtta uurimiseks steriilseid tükke materjali sügavamatest osadest. Kala saadetakse uurimiseks tervena, konservid aga avamata pakendeina.

Materjalist valmistatakse suspensioon steriilse füsioloogilise keedusoolalahusega ja tsentrifuugitakse. Vedelikus määratakse eksotoksiin, sademest teostatakse mikrobioloogiline uurimine mikroobide suhtes. Veri saadetakse laboratooriumisse tsitraatverena või defibrineeritud verena ja määratakse eksotoksiin. Haige oksemassidest valmistatakse suspensioon steriilse füsioloogilise keedusoolalahusega, neutraliseeritakse, tsentrifuugitakse ja vedelikus määratakse eksotoksiin. Sadet uuritakse haigusetekitajate sedastamiseks. Ka roojas määratakse haigusetekitajad.

Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast materjalist valmistatakse preparaat ja värvitakse Grami meetodi järgi. Botulismitekitajad on gram-positiivsed jämedad pulgakujulised ümarate otstega mikroobid, asetatud üksikult, paarikaupa või lühikestes ahelates. Mikroobid moodustavad subterminaalselt asetatud suuri eoseid, eosega mikroob meenutab kujult tennisereketit.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Materjali kuumutatakse 80°C juures 20 min. jooksul ja külvatakse siis Pasteuri pipetiga Kitt-Tarozzi söötmesse ettevaatlikult, et õhk ei satuks söötmesse. Söödet võetakse kolbi suures koguses - 40-50 ml. Kasvu jälgitakse 25 - 30°C juures 8 - 14 päeva jooksul. Kohe, kui sööde muutub häguseks

ja eraldub gaasi, tehakse preparaat ja ümberkülv glükoos-veriagarplaadile Cl. botulinum'i puhaskultuuri isoleerimiseks. Söötmeid tuleb hoida rangelt anaeroobsetes tingimustes.

Cl. botulinum võib kasvada veriagaril kahesuguselt, kas teralise pinna ja servadest sügavate sisselõigetega hallide pesadena või tihedate siledaservaliste kerataolise pinnaga hemolüüsi tsooniga pesadena.

Isoleeritud puhaskultuuril määratakse biokeemiline aktiivsus. Cl. botulinum fermenteerib süsivesikutest glükoosi ja maltoosi. Proteolüütiliste omaduste poolest on see aktiivne mikroob: veeldab želatiini, tekitab veriagaril hemolüüsi, peptoniseerib piima, produtseerib H_2S, NH_3, indooli ei moodusta.

Kultuur samastatakse lõplikult tüübispetsiifilise seerumiga aglutinatsioonireaktsiooni abil või bioloogilise meetodiga nagu teiste anaeroobide puhul.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomadeks on valged hiired. Hiiri näljutatakse 24 t. jooksul, siis segatakse leib uuritava materjaliga ja söödetakse loomadele. Tavaliselt surevad loomad 2 - 3 ööpäeva kestel tüüpiliste nähtudega: esineb tagajäsemete paralüüs ja kehatüveliiaste täielik lõtvumine.

Bioloogilist meetodit kasutatakse veel eksotoksiini määramiseks. Uuritavat vedelikku (kultuuri filtraat, veri, oksemasside filtraat jne.) süstitakse meriseale 1 ml või valgele hiirele 0,5 ml naha alla või kõhuõõnde. Kontrolliks süstitakse teisele loomale sama vedelikku, mis aga eelnevalt on keedetud 100°C juures 30 min. jooksul. Kui katseloom sureb 2 - 3 ööpäeva jooksul, kontroll-loom jääb aga ellu, siis järgnevalt määratakse tekitaja tüüp. Selleks süstitakse 3 meriseale või hiirele uuritava vedeliku ja antitoksilise seerumi segu. Esimesele meriseale süstitakse 1 ml uuritavat materjali+500 Aü Cl. botulinum'i A tüübi antitoksilist seerumit (hiirele 2 korda väiksemas koguses), teisele uuritavat materjali + 500

AÜ B tüübi antitoksilist seerumit. Kolmandale süstitakse ainult materjali. Loomi jälgitakse 10 päeva jooksul. Elama jääb ainult see loom, kellele on süstitud eksotoksiinile vastava tüübi antitoksilist seerumit.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Anaeroobidega infitseeritud haava materjalist valmistada preparaat ja värvida Grami meetodi järgi.
2. Samast materjalist teha külv veriagarplaadi sektorisse.
3. Teostada mulla külv Kitt-Tarozzi söötmesse.
4. Clostridium tetani kultuurist valmistatud preparaat värvida Grami meetodi järgi.
5. Clostridium botulinum'i preparaadi demonstratsioon.

XII p r a k t i k u m .

T e e m a : DIFTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

M u l l a s t t e h t u d k ü l v K i t t - T a r o z z i s ö ö t m e s (järg).

Anaeroobsetes tingimustes kasvavad kultuuris mitmesugused maapinnas esinevad anaeroobsed batsillid, mis kuuluvad Genus Clostridium'isse. Mullas võivad esineda mitmesugused patogeensed liigid, nagu Clostridium tetani ja Clostridium perfringens. Erilist tähelepanu ülalmainitud kultuurist tehtud preparaadi mikroskoobilisel uurimisel tuleb pöörata just Clostridium tetani leidmisele. Sel puhul on näha preparaadis saledad pulgakesed terminaalsete eostega, mis meenutavad oma

kujult tenniseretekteid. Nad värvuvad gram-positiivselt, kuid vanad vormid võivad kergesti alkoholi toimel dekoloreeruda, näides sel juhul gram-negatiivsetena.

Haavaeritisest tehtud külv veriagarplaadil (järg).

Anaeroobsetes tingimustes kasvatatud kultuuris patoloogilisest materjalist, mis saadud gaasgangreenihaigelt, võib kõige sagedamini leida Clostridium perfringens'it. See on gram-positiivne batsill, milles eosed on asetunud subterminaalselt.

Difteeria mikrobioloogiline diagnoos.

Corynebacterium diphteriae, gram-positiivne mitte liikuv eosteta pulgake on difteeria - diphtheria tekitajaks, mille puhul esineb äge fibrinoosne põletikuline protsess koos koe nekroosiga nakkuse väravas. Kõige sagedamini esineb kurgudifteeria, mida iseloomustab pseudomembranoossete valgete kattude teke kurgumandlitel. Need katud võivad levida kurgunibule, pehmele suulaele ja isegi kõrisse raskematel haigusjuhtudel. Corynebacterium diphtheriae, esinedes ja paljunedes nakkuse väravas, produtseerib tugevatoimelist eksotoksiini, mis levib kogu organismis, põhjustades mitmesuguse raskusega intoksikatsiooni, kusjuures esmajoones kahjustuvad südamelihas ja neerupealised. Peale selle võib Corynebacterium diphtheriae esile kutsuda haavadifteeriat, silmasidekesta ja teiste limaskestade põletikku.

Corynebacterium diphtheriae' esinemise suhtes tuleb uurida: 1) haigeid, 2) haigetega kontaktis olnud isikuid, 3) rekonvalestsente bakterioloogilise tervistumise määramiseks, 4) mitmesuguseid terveid isikuid bakterikandluse määramiseks.

Praktikas on difteeria diagnoosimiseks kõige olulisem haigusetekitaja isoleerimine.

Uuritav materjal.

Uuritava materjalina Corynebacterium diphtheriae isoleerimiseks võetakse steriilse vatt-tampooniga nina- ja kurgulima, katte kurgust, haavamäda, kõrvamäda, silmalima, röga jne.

Kui uuritav materjal saadetakse kaugemal asuvasse laboratooriumi, siis enne materjali võtmist immutatakse steriilsed vatt-tampoonid steriilses 15% glütseriini sisaldavas füsioloogilises keedusoolalahuses.

Ninast võetakse uuritav materjal steriilse vatt-tampooniga, nii et vasaku käe pöidlaga hoitakse ninaots veidi ülespoole, tampoon viiakse sisse ninaõõnde ja surutakse piki ninavaheseina ettevaatlikult meatus nasi communis't pidi kuni epipharynx'ini (tampoon läheb ninaõõnde 8 - 12 cm ulatuses). Välispidiselt vaadatuna juhitakse tampooni suunas ninaavast kõrvanibuni.

Kurgust võetakse uuritav materjal, nii et patsient täiesti avatud suuga on valguseallika poole, keel surutakse suuõõne põhja steriilse metallspaatliga ja kurgulima võetakse tampooniga ühtlaselt tugeva pideva tõmbega kummaltki kurgumandlilt või kurgukaarelt.

Nina- ja kurgulima tampoonid asetatakse steriilsesse katsutisse tagasi, nii et kurgust võetud materjal on sügavamal ja ninast võetud materjal veidi kõrgemal katsutis.

Katte kurgumandlitelt võetakse steriilse pintsetiga ja asetatakse katsutisse.

Haavapinnalt ja silma sidekestalt võetakse uuritav materjal samuti steriilse tampooniga.

Röga kogutakse steriilsesse nõusse.

Mikroskoobiline uurimine.

Ainult haigelt võetud uuritavast materjalist tehakse äigepreparaadid, kusjuures materjal hõõrutakse tampooniga steriilsele esemeklaasile. Õhus kuivanud, leegil fikseeritud äigepreparaadid värvitakse Neisser-Ginsi meetodi järgi.

Sellistes algmaterjalist valmistatud preparaatides leidub vähesel hulgal Corynebacterium diphtheriae't lühikeste saledate pulgakestena, mille rakuotstes esinevad Babes-Ernsti kehakesed. Mikroobid on preparaadis asetatud kas üksikult või paarikaupa, sageli nurga all üksteise suhtes. Algmaterjalist valmistatud preparaadis on raske vahet teha tõelise difteeriatekitaja ja Corynebacterium pseudodiphtheriticum'i vahel, sest mõlemad on seal kujult teineteisest vähe erinevad lühikesed pulgakesed, milles sageli teralisust esineb vähe. Selletõttu võib mikroskoobilise uurimise alusel anda ainult esialgse orienteeriva vastuse.

Mikroskoobilisel uurimisel võib ägedatel haigusjuhtudel leida algmaterjalist valmistatud äigepreparaatides difteeriatekitajaid umbes 50% juhtudel.

Eriti kurgulimast valmistatud äigepreparaatide mikroskoobilisel uurimisel tuleb tähelepanu osutada ka muule mikrofloorale, nagu stafülokokkidele, streptokokkidele, spiroheetidele - Borrelia vincentii, Fusobacterium fusiforme jne. esinemisele, mis võivad olla kurgupõletiku tekitajaiks. Mikroskoobilisel uurimisel tuleb eristada veel Corynebacterium diphtheriae't Genus Leptothrix'isse kuuluvast mikroorganismist, mis võib esineda kas niitjate moodustistena või lõigustunult lühikesteks pulgakesteks, milles esinevad samuti volutiinterad. Erinevusena on siin volutiinterad tunduvalt suurema läbimõõduga mikroobirakust, kuna Corynebacterium diphtheriae's Babes-Ernsti kehakesed on enamvähem sama läbimõõduga nagu mikroobirakk.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Uuritavast algmaterjalist tehakse külvid Löffleri koaguleeritud seerumisöötmele, hõõrudes tampooniga materjali ettevaatlikult längasendis olevale söötmepinnale ja uuritakse 6-8 t. ja 18 t. kasvuaja järel. Kultuurist valmistatud äigepreparaadid värvitakse Neisser-Ginsi meetodi järgi (vt. üldosa III praktikum).

Sellises preparaadis on Corynebacterium diphtheriae oma

tüüpilise kujuga - sirgete või kergelt kõverdunud saledate pulgakestena. Mikroobid on asetatud üksteise suhtes teatud nurga all, nii et moodustavad L- ja V- tähe kujusid. Preparaadi uurimisel tuleb Corynebacterium diphtheriae't eristada võimalikust Corynebacterium pseudodiphtheriticum'ist, mis esineb saprofüüdina normaalselt nina- ja kurgulimaskestadel. Corynebacterium pseudodiphtheriticum on , võrreldes tõelise difteeriatekitajaga, lühem ja jämedam pulgake, millel harvem esineb rakus volutiinterakesi. Need suhteliselt lühikesed ja jämedad mikroobirakud on asetatud paralleelselt üksteisele nagu aiatulbad, kusjuures sageli ühele paralleelsele rivile võib olla asetatud risti teine samasugune. Corynebacterium pseudodiphtheriticum kasvab puljongsöötmes pulbritaolise sademena katsuti põhjas ja on inaktiivne süsivesikute suhtes.

Löffleri söötmel kasvanud kultuurist valmistatud preparaadi järgi võib anda ainult esialgse vastuse. Lõpliku vastuse võib anda alles peale Corynebacterium diphtheriae puhaskultuuri isoleerimist ja samastamist. Sageli võib leida atüüpilisi difteeriatekitajaid, mida ainult morfoloogiliste tunnuste alusel on raske kindlaks teha. Peale selle esinevad mittepatogeensed korünebakterid nii nahal kui ka limaskestal, mis on sarnased morfoloogiliste omaduste poolest tõelisele difteeriatekitajale. Nendest asjaoludest tingitult on vajalik isoleerida Corynebacterium diphtheriae puhaskultuur ja samastada mikroob biokeemiliste omaduste ja toksilisuse määramisega.

Puhaskultuuri isoleerimiseks tehakse kohe, paralleelselt külviga Löffleri söötmele, külv Löffleri söötmeplaadile või kaaliumtelluriit-veriagarplaadile.

Kaaliumtelluriit-veriagarplaadil kasvab C. diphtheriae ümarate mustade siledate pesadena või tumehalli südamikuga karedate pesadena. Difteroidid kasvavad enam kumerate niiskete hallikate pesadena, kusjuures pesa keskosa on pruunikas. Stafülokokid kasvavad suurte hallide läikivate musta keskosaga pesadena.

Tüüpilisest pesast tehakse külv Löffleri längasendis söötmele ja kontrollitakse isoleeritud kultuuri morfoloogi-

lisi omadusi Neisser-Ginsi järgi värvitud äigepreparaadis.

Biokeemilised omadused isoleeritud puhaskultuuril määratakse Hissi seerumisöötmes, milles vastava süsivesiku fermentatsioonil omandab indikaator punase värvuse ja happelises keskkonnas toimub seerumikoagulatsioon.

Põhilised omadused Genus Corynebacteriumi liikidel.

	Glükoos	Maltoos	Sahharoos	Urea lõhustamine	Tärklis	Glükogeen	Toksilisus
Corynebacterium diphtheriae	h	h(±)	-	-	h(±)	h(±)	±
C. hoagii	h	-	h	-	-	-	-
C. xerosis	h	h	h	-	-	-	-
C. pyogenes	h	h	h	-	-	-	-
C. pseudodiphtheriticum	-	-	-	+	-	-	-

h - fermentatsioon happe eraldamisega,

h(±) - fermentatsioon happe eraldamisega võib olla või puududa,

\+ - positiivne,

± - võib olla või puududa,

\- - negatiivne.

Toksilisuse määramine.

Corynebacterium diphtheriae' kultuuri toksilisust määratakse 1) bioloogilise meetodiga meriseal Römeri järgi või 2) tahkel seerumagarplaadil in vitro.

1. Toksilisuse määramiseks Römeri järgi võetakse 300 - 400 g raskune merisiga, kellel külgedelt epileeritakse karvad. Uuritavast materjalist isoleeritud 20 - 24-tunnil vanusest puhaskultuurist valmistatakse suspensioon füsioloogilises keedu-

soolalahuses tihedusega 500 miljonit mikroobirakku 1 ml optilise standardi järgi. Vastavat kultuurisuspensiooni süstitakse meriseale 0,2 ml naha sisse; 4 t. pärast süstitakse meriseale naha alla 100 AÜ difteeria antitoksilist seerumit. Tulemusi hinnatakse 3. - 4. päeval, toksilise kultuuri puhul tekib nekroos süstimise kohal.

2. Toksilisust seerumagarplaadil määratakse järgmiselt:
a) Petri tassile valatakse 10 ml sulatatud ja 50°C jahutatud söödet, millele varem lisatud 20% hobuse normaalset seerumit. Enne söötme tahkumist asetatakse Petri tassi keskossa söötmesse 1,5 x 6 cm steriilne filterpabeririba, mis varem immutatud füsioloogilise keedusoolalahusega lahjendatud difteeria antitoksilise seerumiga 500 AÜ/ 1 ml. Filterpaberi riba immutamiseks on vaja 0,2 - 0,3 ml vastavat seerumilahjendust. Peale tahkumist kuivatatakse söödet 30 minutit 37°C juures. Külvid uuritavast puhaskultuurist tehakse külviaasa abil 0,5 cm kaugusele filterpaberi ribast. Peale 37°C juures kasvatamist kontrollitakse tulemusi iga päev kuni 5. päevani. Kui toksiini produktsioon esineb, on söötmes pretsipitaadivöönd. Kontrolliks tehakse samale plaadile, ühes uuritavate tüvedega, eksotoksiini produtseeriva testtüve külv.
b) Toksilisust võib määrata nii, et kuivalt seerumagarplaadilt lõigatakse välja keskosas umbes 1 cm laiune söötmeriba steriilse lantsetiga. Nüüd tehakse mõlemale poole renni risti uuritavast kultuurist ja toksilisest tüvest PW-8 paralleelsed joonkülvid 1½ - 2 cm vahedega. Renni valatakse 5 - 6 tilka füsioloogilises keedusoolalahuses lahjendatud difteeria antitoksilist seerumit, 1000 AÜ/1 ml. Petri tass asetatakse termostaati 37°C juurde põhjaga allapoole ja tulemusi hinnatakse kuni 5. päevani. Toksilised tüved produtseerivad kasvu kestel eksotoksiini, mis difundeerub söötmesse ja ühineb antitoksilise seerumiga. Toksiin-antitoksiini ühinemisel tekib poolkuukujuline pretsipitaat söötmes.

Tüüpide määramine.

Corynebacterium diphtheriae't võib kultuuriliste ja biokeemiliste omaduste järgi liigitada 3 tüüpi:

1. Typus gravis kasvab kaaliumtelluriit-veriagarplaadil tumehallide karikakrakujuliste pesadena. Mikroobirakkudes on vähe volutiinteri. Vedelsöötmes kasvab selle tüübi kultuur kelmena pinnal ja teralise sademena söötme põhjas.

2. Typus mitis kasvab kumerate siledate läikivate mustade pesadena kaaliumtelluriit-veriagarplaadil. Ta rakkudes leidub alati volutiinteri. Vedelsöötmes kasvab ühtlaselt häguselt.

3. Typus intermedius kasvab väikeste lamedate ebakorrapäraste äärtega hallide pesadena, mille keskosa on must kaaliumtelluriit-veriagarplaadil. Vedelsöötmes kasvab teralise sademena.

Tüüpide omadused.

	Dekstriin	Tärklis	Glükogeen	Hemolüüs	Toksiin
Corynebacterium diphtheriae:					
Typus gravis	h	h	h	-(±)	±
Typus mitis	h±	-	-	+	±
Typus intermedius	h±	-	-	-	±

h - fermentatsioon happe eraldamisega,

h± - fermentatsioon happe eraldamisega võib olla või puududa,

\+ - positiivne,

\- - negatiivne,

± - võib olla nii positiivne kui ka negatiivne.

Difteeria diagnoosimise kiirmeetodid.

1. Folger soovitab kiirdiagnoosiks immutada steriilne vatt-tampoon seerumis ja siis leegi kohal koaguleerida. Sellise tampooniga võetakse uuritav materjal ja asetatakse tampoon steriilses katsutis termostaati 2 - 6 t. Siis tehakse tampooniga äigepreparaadid ja värvitakse Neisser-Ginsi meetodi järgi.

2. Roufogalis asetab tampooni uuritava materjaliga steriilsesse lootevette katsutis. Pärast 6 t. termostaadis hoidmist valmistatakse eespool kirjeldatud viisil preparaadid.

3. Sordelli ning Manzullo järgi peitsitakse kurgus esinevad katud kaaliumtelluriitpuljongiga. Difteeriatekitaja esinemisel muutuvad katud hallika kuni mustaks. Kuid samasuguse muutuse võivad põhjustada ka stafülokokid, mis redutseerivad kaaliumtelluriidi metalseks telluuriks.

Söötmed difteeriatekitaja isoleerimiseks ja uurimiseks.

Löffleri seerumsööde.

Löffleri seerumsöötme valmistamiseks võetakse 3 osa looma vereseerumit (hobuse, vasika või lambaseerumit) ja 1 osa 1%-list glükooslihapeptoonpuljongit. Segu valatakse 3 - 4 ml katsutisse ja lastakse koaguleeruda längasendis Kochi koagulaatoris 80° - 90°C juures 1 - 1½ t. ja 24 t. pärast korratakse kuumutamist sama aja kestel. Löffleri söötmeplaadid valmistatakse, nii et sama seerumi ja puljongi segu valatakse 10 - 15 ml Petri tassi ja lastakse samal viisil sööde koaguleeruda.

Kaaliumtelluriit-veriagar.

Kaaliumtelluriit-veriagari valmistamiseks võetakse sulatatud ja 50°C temperatuurini jahutatud 2,5 - 3%-line lihapeptoonagar (pH 7,8), sellele lisatakse juurde 10% normaalset hobuse- või härja vereseerumit ja 1 ml 2%-list kaaliumtelluriidilahust. Sööde valatakse Petri tassi ja lastakse tahkuda.

Hissi seerumsööde.

Hissi seerumsööde koosneb 20% steriilsest vereseerumist ja 80% destilleeritud veest, millele lisatakse juurde 0,1 - 0,5% vastavat süsivesikut, alkoholi või glükosiidi. Söötme pH on 7,4 - 7,6 ja indikaatorina on Andrade'i indikaator.

Seerumagarsööde tüve toksilisuse määramiseks.

Seerumagarsöötme valmistamiseks võetakse 2,5 - 3%-line lihapeptoonagar Martini puljongis pH 7,4 - 7,6. Sulatatud ja 50°C jahutatud agarile lisatakse juurde 20% steriilset normaalset hobuse või küüliku vereseerumit ja 0,3 ml 1%-list tsüstiinilahust. Segatakse ja valatakse Petri tassile 10 - 12 ml. Suletud söötmeplaate kuivatatakse 2 - 3 t. termostaadis.

Sööde tüve toksilisuse määramiseks.

Valmistatakse agarsööde 1 l destilleeritud vees, lahustatakse 30 g agar-agarit 30-40 minuti kestel autoklaavis keetmisel; pH reguleeritakse 8,0 - 8,2. Sellele lisatakse juurde võrdses koguses 0,3% maltoosi sisaldavat Martini puljongit, siis steriliseeritakse 30 min. 100°C juures. Söötme reaktsioon peab olema pH 7,8. Söötmele lisatakse 20% normaalset hobuse vereseerumit.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Kitt-Tarozzi söötmel kasvanud mullakülvi kultuurist valmistada äigepreparaat, värvida Grami meetodi järgi ja uurida.
2. Veriagarplaadilt haavaeritise kultuurist valmistada äigepreparaat, värvida Grami meetodi järgi ja uurida.
3. Võtta vastastikku nina- ja kurgulima ja teha külvid Löffleri seerumsöötmele.
4. Valmispreparaat Corynebacterium diphtheriae' kultuurist värvida Neisser-Ginsi meetodi järgi ja uurida.
5. Valmispreparaat Corynebacterium pseudodiphtheriticum'i kultuurist värvida Neisser-Ginsi järgi ja uurida.

6. Tutvuda demonstratsiooni korras Corynebacterium diphtheriae' kasvuga kaaliumtelluriit-veriagarplaadil.
7. Tutvuda demonstratsiooni korras Corynebacterium diphtheriae' toksilisuse määramisega in vitro.

XIII praktikum.

Teema: TUBERKULOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Külvide uurimine Löffleri söötmel (järg).

Tervete isikute nina-, kurgulimast Löffleri söötmele tehtud külvist ja kasvanud kultuurist valmistatud äigepreparaadi mikroskoobilisel uurimisel võib kõigepealt leida mitmesuguseid normaalse nina- ja kurgulima mikrofloorasse kuuluvaid mikroobe, nagu stafülokokke, streptokokke, pulgasarnaseid batsille ja baktereid. Viimaste hulgas võivad esineda tüüpilise asetusega Corynebacterium pseudodiphtheriticum ja juhuslikult pärmseened ja mitmesugused niitjad seened. Bakterikandluse puhul võib esineda ka Corynebacterium diphtheriae.

Tuberkuloosi mikrobioloogiline diagnoos.

Mycobacterium tuberculosis, happekindel eosteta mitteliikuv pulgake, on tuberkuloositekitaja. Tuberkuloosne nakkus võib lokaliseeruda organismis kõikjal. Tuberkuloosist võivad nakatuda kopsud, neerud, lülisammas, liigesed, ajukelmed jne. Tuberkuloosse nakkuse diagnoosimiseks kasutatakse mirkoskoo-

bilisi, bioloogilisi uurimismeetodeid, allergilist nahatesti ja haigusetekitaja isoleerimist külvides.

Uuritav materjal.

Patoloogilise materjali valik sõltub tuberkuloosse nakkuse lokalisatsioonist organismis. Kõige sagedamini esineb kopsutuberkuloos, siis vastavalt sagedamaks uurimismaterjaliks on röga, mis võib sisaldada suhteliselt palju tekitajaid. Röga kogutakse vastavasse steriilsesse purki. Kopsutuberkuloosi puhul võib olla uuritavaks materjaliks maoloputusvedelik (eriti lastel) ja bronhiloputusvedelik. Vähe tuberkuloositekitajaid sisaldavad uuritavad materjalid on: liikvor, mis saadakse lumbaalpunktsiooni teel, liigesepunktaadid, mis saadakse liigeseõõnte punkteerimisel, pleuraeksudaat - pleura õõne punkteerimisel. Uuritavaks materjaliks tuberkuloosi suhtes on veel neerude kateeter-uriin, mis saadakse ureetrite kateteriseerimisel. Peale selle võivad uuritavaks materjaliks olla veel põieuriin, roe, lümfisõlmed jne.

Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast patoloogilisest materjalist äigepreparaadi valmistamine on kõige lihtsamaks mikroskoobiliseks uurimismeetodiks. Selleks võetakse rögast või mädast 2 nõela abil materjalitükike ja äigepreparaadid valmistatakse kahe esemeklaasi vahel materjali ühtlaselt laialihõõrumise teel. Äigepreparaadid värvitakse Ziehl-Neelseni järgi (vt. üldosa II praktikum).

Ziehl-Neelseni järgi värvitud preparaadis võib leida happe- ja alkoholikindlaid sirgeid või kergelt kõverdunud saledaid punaseks värvunud kepikesi, mis sageli teralisuse tõttu värvuvad ebaühtlaselt. Mõnikord võib tüüpiliste saledate kepikeste kõrval leida lühemaid pulgakesi ja harva ka okslikke vorme. Kui materjalis esineb rohkesti tekitajaid, võivad nad olla asetatud väikeste kimpudena.

Niisugusel mikroskoobilisel uurimisel võib leida tuber-

kuloositekitajaid algmaterjalist valmistatud preparaatides, kui neid esineb seal rohkesti, vähemalt 100 000 mikroobi 1ml.

Kuid sageli esineb Mycobacterium tuberculosis't uuritavas materjalis vähe, nagu liigese- ja seroosõõntepunktaatides, lookvoris, neerukateeteruriinis jne., siis tuleb preparaatide valmistamise eel kasutada erilisi tihendamismeetodeid.

1. Lihtsamaks tihendamismeetodiks on küllaltki vedela konsistentsiga materjalide tsentrifuugimine 3000 - 5000 t/min. 30 min. või isegi 3000 t/min. 30 min. kestel. Tsentrifuugimisel saadud sademest valmistatakse äigepreparaadid steriilse külviaasa abil esemeklaasile. Nii võib sadestada Mycobacterium tuberculosis't liikvoris, punktaatides, uriinis jne.

2. Viskoossete uurimismaterjalide puhul kasutatakse homogeniseerimist ehk uuritava materjali veeldamist mitmel viisil.

a) Röga, mäda, roe jne. homogeniseeritakse antiformiiniga. Lisatakse juurde ühele osale uuritavale materjalile 2 osa 50%-list antiformiinilahust (antiformiinis on 5,6% naatriumhüpokloritit ja 7,5% NaOH ~~KH~~) ja segu hoitakse 30 min. 37°C juures. Siis lisatakse juurde võrdne kogus destilleeritud vett või alkoholi ja tsentrifuugitakse 30 - 60 min. 3000 t/min. Saadud sademest valmistatakse äigepreparaadid.

b) Homogeniseerimiseks kasutatakse fermente, nagu pankreatiini ja härjasappi. Selle järel tsentrifuugitakse materjal.

c) Uuritava materjali homogeniseerimist võib teostada hüaluronidaasi abil. Siin lisatakse 3 ml rögale 20 toimeühikut destilleeritud vees lahustatud hüaluronidaasi juurde. Segu loksutatakse, hoitakse 24 t. 37°C juures ja lisatakse siis 2 ml ammoniaagi-alkoholi segu, 10 min. pärast loksutatakse 3 korda ja selle järel tsentrifuugitakse.

3. Tuberkuloositekitajate tihendamiseks kasutatakse ka membraanfiltreid nitrotselluloosist. Nii vedela konsistentsiga kui ka homogeniseeritud materjale võib filtrida ja hiljem filter uurida mikroskoobiliselt värvitult Ziehl-Neelseni järgi.

4. Ka kasutatakse tuberkuloositekitajate tihendamiseks

kataforeesimeetodit. Sel juhul juhitakse kas läbi neutraalse vedela algmaterjali (või homogeniseeritud) soolalahuse elektrivool. Mycobacterium tuberculosis kui elektropositiivne mikroob kuhjub katoodile ja 15 min. kataforeesi järele tehakse katoodtorust rikastatud materjalist äigepreparaadid.

5. Mycobacterium tuberculosis'e tihendamiseks uuritavas materjalis võib kasutada flotatsioonimeetodit. Sel puhul lisatakse uuritavale algmaterjalile juurde võrdses koguses 0,5-1%-list NaOH ja segu loksutatakse 5 - 10 min. kuni täieliku homogeniseerumiseni. Selle järele soojendatakse segu vesivannis 30 min. 55°C juures ja lisatakse juurde destilleeritud vett olenevalt algmaterjali kogusest ja 0,1 - 1 ml ksülooli (bensooli, toluooli). Segu loksutatakse tugevasti 10 - 15 min., nii et see muutub värvuselt piimjaks. Sellisel loksutamisel tekib ksülooli pisitilgaline emulsioon vees, kusjuures loksutamisel adsorbeeruvad tuberkuloositekitajad ksülooli pisitilgakeste pinnale. 10 - 20-minutilise seismise järel tekib katsutis vedeliku pinnale valge kooretaoline kiht (ksülooli pisitilkade kiht). Ettevaatlikult võetakse Pasteuri pipetiga seda kihti ja asetatakse esemeklaasile 1 tilk, kui see kuivanud, siis kihitatakse samale kohale jällegi 1 tilk, nii võib kihitada 3-4 korda. Kuivanud preparaat tehakse rasvavabaks mõne korra eetri pealevalamise teel. Siis fikseeritakse preparaat leegil ja värvitakse Ziehl-Neelseni meetodi järgi.

Mycobacterium tuberculosis'e avastamiseks äigepreparaadis on soovitav peale Ziehl-Neelseni meetodi kasutada uurimist fluorestsents-mikroskoobis. Selleks võib preparaate värvida Richardsi ning Milleri meetodi järgi.

Richardsi ning Milleri meetod:

A värvilahus.		B värvilahus.	
Auramiin	0,01 g	Etüülalkohol (70%)	100 ml
Fenooli	3 ml	Konts. HCl	0,5 ml
Destilleeritud vett	97 ml.	NACl	0,5 g.

1. Kuivanud preparaadile valatakse A värvilahus ja toimitakse 2 - 3 min.

2. Preparaat loputatakse kaevuveega.

3. Preparaadile valatakse B lahus ja toimitakse 3 - 5 min.

4. Preparaat lastakse kuivada ja uuritakse fluorestsentsmikroobis, kasutades 8 mm objektiivi ja 20 x okulaari, sinist filtrit ja okulaaril täiendavat kollast filtrit. Preparaadis on happekindlad kepikesed särav-kollased, fluorestseerivad tumedal taustal.

Selle meetodi rakendamisel suhteliselt nõrga suurendusega ja suures vaateväljas on materjalis vähesed tuberkuloositekitajad kergemini leitavad.

Tuberkuliintest.

Varajase tuberkuloosse nakkuse diagnoosimiseks kasutatakse allergilist nahatesti - tuberkuliintesti. Seda teostatakse kas Kochi alttuberkuliiniga või puhastatud proteiinderivaadi (PPD) manustamisega.

Kochi alttuberkuliini valmistamiseks võetakse 6 - 8 nädala vanune Mycobacterium tuberculosis'e kultuur glütseriinpuljongis. Seda kultuuri kuumutatakse 100°C juures 30 min. ja siis kontsentreeritakse 70°C juures kuni 1/10 algmahuni. Selliselt tihendatud kultuur kurnatakse läbi bakterite filtri ja saadud filtraati kasutatakse alttuberkuliinina.

PPD-tuberkuliin on puhastatud proteiini derivaat tuberkuloositekitajatest, mis sisaldab polüsahhariidi ja nukleiinhapet ja on vees lahustuv.

Tuberkuliintesti võib teha mitmel viisil:

1. Pirquet'test - transkutaanne meetod. Sel tuhul puhastatakküünarvarre volaarsel pinnal nahk alkoholi ja eetriga. Asetatakse nahale 2 tilka tuberkuliini vahekaugusega 5 - 6 cm. Siis skarifitseeritakse vastava Pirquet' puuriga või rõuge panemise nõelaga puhast nahka poolel vahekaugusel, see on kontrolliks tuberkuliintestile. Selle järele skarifitseeritakse nahk tuberkuliinitilgas. Tuberkuliini imendumisaeg on 5 min., hiljem võib kuivatada naha vatiga.

Tuberkuloosse nakkuse esinemisel 24 - 48 t. pärast ilmub manustamise kohal paapul punetava tsooniga. Reaktsiooni hinnatakse positiivseks, kui infiltraadi läbimõõt on vähemalt 5 mm.

Pirquet' test on vähe tundlik ja ainult umbes 50% tuberkuloosist nakatatuil positiivne. Selletõttu tehakse negatiivse reaktsiooni puhul juba tundlikum nahasisene tuberkuliintest.

2. Mantoux'test - intrakutaanne meetod. Sel puhul tehakse tuberkuliini lahjendused 10^{-2} - 10^{-6} steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses 0,25% fenooli lisandusega. Esmakordselt alustatakse kõige suurema lahjendusega. Küünarvarre dorsaalne pind puhastatakse alkoholi ja eetriga. Tuberkuliini vajalikku lahjendust süstitakse 0,1 ml koguses erilise süstla ja intrakutaannõela abil naha sisse. Süstimisel fikseeritakse nahavolt vasaku käega ja viiakse nõel nahka paralleelselt nahapinnale, nii et nõela ava on ülalpool. Õigesti süstimisel tekib süstimiskohale väike kubel. Kontrolliks süstitakse 4 - 5 cm kaugemale 0,1 ml füsioloogilist keedusoolalahust naha sisse.

Reaktsiooni tulemusi kontrollitakse 48 t. järel. Positiivseks hinnatakse reaktsiooni siis, kui paapuli läbimõõt on 5 x 5 mm ja üle selle.

3. Moro test - perkutaanne meetod. Sel puhul hõõrutakse tuberkuliin indiferentse salvi koostises nahasse kas mõõkjätkepiirkonnas kõhunahal või seljal abaluupiirkonnas.

4. Oftalmo test Calmette'i järgi. Sel puhul tilgutatakse alttuberkuliini lahjenduses 10^{-2} silma sidekestale. Positiivse reaktsiooni puhul 6 t. pärast tekib silma sidekesta punetus, mis on kõige tugevam 24 - 48 t. järele. Seda testi tänapäeval inimestel ei kasutata tuberkuloosi diagnoosimiseks.

5. Kochi test - subkutaanne meetod. Sel puhul süstitakse tuberkuliini 0,2 ml naha alla. Selle meetodi rakendamisele võib järgneda liiga tugev reaktsioon kehatemperatuuri tõusu ja protsessi ägestumise näol haiguskoldes. Seepärast tänapäeval ei leia see meetod enam kasutamist.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Värvida preparaat Löffleri söötmel kasvanud segakultuurist Neisser-Ginsi meetodi järgi ja uurida mikroskoobis eriti difteeriatekitajate suhtes.
2. Tuberkuloosihaige rögast tehtud valmispreparaat värvida Ziehl-Neelseni meetodi järgi, milles otsida mikroskoobi all happekindlaid kepikesi.
3. Liikvorist valmistada preparaat flotatsioonimeetodi järgi, värvida Ziehl-Neelseni järgi ja uurida.
4. Teha vastastikku tuberkuliintest kas Pirquet' või Mantoux' järgi.

XIV p r a k t i k u m .

T e e m a : TUBERKULOOSI JA LEEPRA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Kui uuritavas patoloogilises materjalis on vähe tuberkuloositekitajaid, siis on mikroskoobilised uurimismeetodid tavaliselt tulemusteta. Sel juhul on vaja tuberkuloosi diagnoosimiseks kasutada juba tundlikumat meetodit - nimelt teha külvid uuritavast materjalist valiksöötmetele.

Kõigepealt tehakse uuritavast algmaterjalist külvid kiiresti kasvava segamikrofloora kindlakstegemiseks. Selleks külvatakse uuritav materjal lihapeptoonpuljongisse ja veriagarplaadile. Kui uuritavast materjalist tehtud külvides ei kasva teisi mikroobe, siis tehakse külvid otse algmaterjalist või selle tsentrifuugimisel saadud sademest valiksöötmetele tuber-

kuloositekitajate isoleerimiseks. Sega mikrofloora esinemisel tuleb aga enne külvide teostamist valiksöötmetele uuritavat materjali töödelda, nii et häviksid teised mikroobid. Vahel on vajalik materjal homogeniseerida, kusjuures ei tohi kahjustada tuberkuloositekitajaid.

Segamikrofloorat sisaldavat materjali töödeldakse järgmiselt:

1. Uuritavale materjalile, näit. 2 ml rögale lisatakse juurde 8 ml 7,5%-list H_2SO_4. Segu loksutatakse korduvalt ja lastakse seista toatemperatuuris 20 min. Siis tsentrifuugitakse 20 min. Sademest, ilma neutraliseerimata, tehakse külvid valiksöötmetele.

2. Ühele osale uuritavale materjalile lisatakse 1 osa 4%-list NaOH ja loksutatakse korduvalt. Segu asetatakse 20 min. 37°C juurde. Siis tsentrifuugitakse segu 20 min., pestakse seda füsioloogilise keedusoolalahusega veelkordsel tsentrifuugimisel. Lõpuks neutraliseeritakse sade mõne tilga 4%-lise HCl lisandamisega. Selle järele tehakse külvid.

3. Uuritavale materjalile lisatakse juurde võrdses koguses 10%-list trinaatriumfosfaadilahust (Na_3PO_4). Segu asetatakse 24 t. 37°C juurde, selle järele tsentrifuugitakse, sade neutraliseeritakse ning tehakse külvid.

4. Loksutus-sadestusmeetod: 2 ml rögale lisatakse juurde 5 ml 1%-list NaOH + Na_3PO_4 lahust klaaskuulidega varustatud kolbi. Segu loksutatakse 5 min. loksutusaparaadis 280 t/min. Siis lisatakse 1 ml $CaCl_2$ lahust. Sel puhul tekib $Ca_3(PO_4)_2$ sade, millega sadestuvad ka tuberkuloositekitajad. See sade lahustatakse segus, mis on valmistatud ammooniumtsitraadist, naatriumtsitraadist ja sidrunhappest. Sellest juba neutraliseerimata materjalist tehakse külvid, kuid võib ka otse sademest teha külvid valiksöötmetele.

Külvid nii algmaterjalist kui ka töödeldud materjalist tehakse Pasteuri pipeti abil 3 - 5-le mõnele kasutatavaist valiksöötmeist. Kultuurid tahkel söötmel asetatakse termostaati kasvama längasendis, et tagada söötme kogu pinna osas ühtlast niiskust. Kuivamise vältimiseks suletakse katsutid

puuvillkorkidega ja kaetakse pealt kas parafiiniga või plastiiliniga. Külve hoitakse termostaadis 6 - 8 näd. 37°C juures ja kasvu kontrollitakse iga 3 - 5 päeva järel. Tavaliselt ilmneb tuberkuloositekitajate kasv söötmel nähtavate kollakate karedate pesadena 10. - 30. päeval. Nähtava kasvu puhul tehakse kultuurist äigepreparaadid ja värvitakse Ziehl-Neelseni meetodi järgi. Happe- ja alkoholikindlate kepikeste esinemisel osutub leid tuberkuloositekitajate suhtes positiivseks. Samuti võib teha külve vedelaile valiksöötmeile, sel puhul jälgitakse kasvu ilmumist söötme pinnal saarekestena või kelmena ja ka sademena katsuti põhjas. Mycobacterium tuberculosis'e esinemine tõestatakse nii nagu tahkeil söötmeil kasvanud kultuuriski.

Mycobacterium tuberculosis'e isoleerimiseks valiksöötmetena kasutatakse peamiselt mitmesuguseid muna- ja verisöötmeid, harva sünteetilist Sautoni söödet.

Tuberkuloositekitajate diagnoosimiseks patoloogilisest materjalist kasutatakse ka veel mikrokultuuri meetodit Pryce'i järgi. Selleks valmistatakse rõgast äigepreparaadid steriilsetele esemeklaasidele. Segamikrofloora hävitamiseks asetatakse need preparaadid 6%-lisesse H_2SO_4 20 minutiks. Siis loputatakse preparaadid 3 steriilses destilleeritud vees, igas 10 minutit. Selle järele asetatakse preparaadid vedelsöötmega pudelisse. Igast materjalist valmistatakse selliselt vähemalt 5 preparaati. Preparaadid uurimiseks võetakse 2., 4., 6., 8. ja 10. päeval söötmest, kuivatatakse, fikseeritakse ja värvitakse Ziehl-Neelseni meetodi järgi. Preparaatide mikrobioloogilisel uurimisel võib leida tuberkuloositekitajate mikrokolooniaid juba alates 4. päevast.

Tuberkuloositekitaja kasvatamiseks kasutatakse alljärgnevaid söötmeid kõige sagedamini.

1. Muna-asparagiin ehk MA-sööde.

Koostis ja valmistamisviis:

Lahustatakse 4 g asparagiini 100 ml kuumas destilleeritud vees. Siis lahustatakse 1,2 g mono-kaaliumfosfaati, 0,5 g naatriumtsitraati, 0,5 g kristalset magneesiumsulfaati ja 0,02 g

ferriammooniumtsitraati igaüks 25 ml kuumas destilleeritud vees ja lisatakse juurde asparagiinilahusele. Lisatakse 0,8 g glükoosi ja 1 g peptooni, keetes segu peptooni täieliku lahustumiseni. Järgnevalt reguleeritakse pH 7,2. Siis lisatakse juurde 160 ml värsket lehmapiima, 5 g kartulitärklist ja 40 ml steriilset glütseriini. Segu kuumutatakse vesivannis pidevalt loksutades, algul 60°C juures 30 min., seejärel kuni keemiseni ja lõpuks keedetakse 15 min. jooksul. Seejärel steriliseeritakse segu autoklaavis 30 min 105°C juures. Peale steriliseerimist lastakse segu jahtuda 56°C t-ni ning lisatakse 200 ml värsket steriilselt võetud homogeniseeritud kanamunakollast. Nüüd kuumutatakse valmistatavat söödet 60°C juures 1 tund ja lisatakse siis 400 ml autoklaavis steriliseeritud ja 60°C t-ni jahutatud 2%-list agar-agari vesilahust. Lõpuks lisatakse 3 ml 1%-list steriilset briljantrohelise vesilahust iga 100 ml söötme kohta. Sööde valatakse välja vedelana steriilsetesse katsutitesse, need asetatakse längasendis vastavale statiivile tardumiseks.

2. Petragnani sööde.

Klaaskolvikestega varustatud 1 l kolbi valatakse 150 ml lehmapiima, 6 g kartulitärklist, 1 g peptooni, 1 väikesteks tükkideks lõigatud kartul (kanamunasuurune). Kolb asetatakse keeva vette ja hoitakse seal loksutades 10 min. Siis lastakse olla 56°C juures 1 t. vesivannis ja lisatakse sinna 4 muna ja 1 munakollane. Loksutatakse segi ja filtritakse läbi marli. Lisatakse juurde 12 ml glütseriini ja 10 ml malahhiitrohelise 2%-list vesilahust. Sööde valatakse katsutisse ja koaguleeritakse längasendis 2½ t. 85°C juures.

3. Löwenstein-Jenseni sööde.

0,4 g KH_2PO_4,
0,04 g kristalset magneesiumsulfaati,
0,1 g kristalset magneesiumtsitraati,
0,6 g asparagiini,
2 g glütseriini,
100 ml destilleeritud vett.

600 ml selle segu kohta lisatakse 30 g kartulitärklist ja 22

homogeniseeritud kanamuna, 20 ml 2%-list malahhiitrohelise vesilahust.

4. Sautoni sööde.

4 g asparagiini,
2 g sidrunhapet,
0,5 g kristalset magneesiumsulfaati,
0,5 g monokaaliumfosfaati,
0,05 g ferriammooniumtsitraati,
60 ml glütseriini,
940 ml destilleeritud vett.

Peale valiksöötmete kasutatakse Mycobacterium tuberculosis'e isoleerimiseks veel külvide tegemist kanaembrüosse ja koekultuuridesse.

Mycobacterium tuberculosis'e kasvatamiseks kasutatakse mitmesuguseid kanaembrüo nakatamisviise. Neist leiab kõige sagedamini rakendamist suhteliselt lihtne koorionallantoisimeetod ja rebukotimeetod. Selleks nakatatakse uuritava algmaterjaliga või segamikrofloora esinemisel juba töödeldud materjaliga kanaembrüo eespool nimetatud meetoditel. Kanaembrüomeetodiga võib diagnoosida tuberkuloositekitajaid keskmiselt 6-12 p. pärast. Mycobacterium tuberculosis'e isoleerimiseks patoloogilisest materjalist on viimasel ajal kasutatud ühekihilist koekultuuride tehnikat. Selleks kasutatakse inimese emakakaela epidermoidkartsinoomirakkude nn. HeLa tüve koekultuuri. Tuberkuloositekitajaid võib leida sellises koekultuuris juba 3. - 5. päevast alates. Sellistes koekultuurides on võimalik ka Mycobacterium tuberculosis't eristada mittepatogeensetest mükobakteritest juba kasvu järgi. Nimelt kasvab Mycobacterium tuberculosis HeLa rakkudes palmikutaoliselt, sellist kasvu ei anna teised mükobakterid.

Liikide määramine.

Mycobacterium tuberculosis't on võimalik eristada Mycobacterium bovis'est ja Mycobacterium avium'ist kõigepealt kultuuriliste omaduste järgi. Tahkel munasöötmel kasvab Myco-

bacterium tuberculosis suhteliselt kiiremini, pesad on kõvad, karedad, vanas kultuuris valkjaspruunilt pigmenteeritud. Mycobacterium bovis kasvab suhteliselt aeglasemalt, väikeste siledate pesadena. Mycobacterium avium kasvab suuremate siledate pesadena ja on kergesti suspendeeritav lahuses. Samuti on erinev nende 3 mükobakteri liigi kasv glütseriinpuljongis. Mycobacterium tuberculosis annab juba 3 nädala pärast söötmepinnal rikkaliku kasvu kurrulise kelmena, mille servad ronivad katsuti seintele. Mycobacterium bovis kasvab selle aja jooksul saarekeste taoliselt õhukese kelmena, millel on näsataolised (käsnjad) paksenemised. Mycobacterium avium kasvab väikeste valgete saarekestena, vanemas kultuuris kiuliselt, limaselt ja omandab kollaka värvuse.

Kuid kõige kindlamalt on võimalik neid eristada loompatogeensuse järgi. Loomkatses on võimalik määrata samaaegselt nii tuberkuloositekitaja liiki kui ka virulentsust. Selleks süstitakse isoleeritud tuberkuloositekitajate puhaskultuuri 2 küülikule veeni 0,1 ja 0,01 mg. Mycobacterium tuberculosis ei põhjusta 2 - 3 kuu kestel küülikul progresseeruvat haigestumist, küll aga kutsub Mycobacterium bovis esile tugeva kopsude kahjustuse ning looma surma 90 päeva jooksul. Mycobacterium avium annuses 0,1 mg põhjustab küülikul septilise nakkuse ja katseloom sureb 10 - 15 päeva jooksul.

Virulentsuse määramine.

Kõige sagedamini määratakse tuberkuloositekitajate virulentsust merisigadel, kusjuures süstitav mikroobide annus määratakse mikroobide kultuuri kaalumisega (arvestusega 1 mg on 100 miljonit tuberkuloositekitajat). Merisigadele süstitakse naha alla ingvinaalpiirkonda 0,01 mg mikroobide kultuuri 1 ml füsioloogilises keedusoolalahuses. Kõrge virulentsusega tüve puhul sureb merisiga tuberkuloosi 60 - 90 päeva jooksul, keskmise virulentsusega tüve puhul 90 - 150 päeva jooksul, madala virulentsusega tüve puhul 150 päeva - 1 a jooksul.

Bioloogiline meetod.

Mycobacterium tuberculosis'e kindlakstegemiseks osutub bioloogiline meetod võrreldes teiste uurimismeetoditega suhteliselt paremaks haigusetekitajaid vähe sisaldavate patoloogiliste materjalide uurimisel. Kõige tundlikumaks katseloomaks Mycobacterium tuberculosis'e nakkusele osutub merisiga. Merisigu nakatatakse kas otse algmaterjaliga või siis (segamikrofloora esinemisel) eelnevalt töödeldud materjaliga, nagu see toimus ka külvide puhul. Merisigu võib nakatada väga mitmel viisil:

1. Süstitakse uuritav materjal koguses 1 - 2 ml meriseale naha alla ingvinaalpiirkonda. Tuberkuloositekitajate esinemisel tekib 2 nädala pärast lokaalselt infiltraat ja lümfisõlmede suurenemine, katseloom võib surra 1½ - 2 kuu pärast.

2. Sama materjali koguse võib süstida meriseale kõhuõõnde. Uurimiseks surmatakse loom 4 näd. pärast.

3. Meriseale võib süstida uuritavat materjali intratestikulaarselt kuni 0,5 ml. Uurimiseks võib meriseal eemaldada testised operatsiooni teel juba 10. - 15. päeval ja loom surmata alles hiljem.

Katseloomad lahatakse ja uuritakse tuberkuloossete patoloogilis-anatoomiliste muutuste osas kopsu, põrna, maksa, lümfisõlmi. Elundeist valmistatakse äigepreparaadid või peenestatakse elundid uhmris ja tehakse suspensioon füsioloogilises keedusoolalahuses. Saadud elundite suspensioonist võib sadestada mikroobe tsentrifuugimisel või kasutada tihendamiseks flotatsioonimeetodit. Mikroskoobilisel uurimisel tuberkuloositekitajate mitteleidmisel võib teha elundite suspensioonist külvid valiksöötmetele või nakatada jällegi merisigu.

L e e p r a m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Leepra tekitajaks on happekindel eosteta mitteliikuv pulgake - Mycobacterium leprae. Leepra diagnoosimiseks kasutatak-

se mikroskoobilist ja patoloogilis-histoloogilist uurimismeetodit, allergilist nahatesti ja mittespetsiifilist seroloogilist meetodit.

Uuritav materjal.

Leepra diagnoosimisel on uuritavaks materjaliks röga, ninalima, lümfisõlmed, nahatükid ja leproomidest võetud eritis või leproomikude. Varajaseks leepra diagnoosimiseks on kõige tähtsam ninalima mikroskoobiline uurimine või nina limaskesta patoloogilis-histoloogiline uurimine. Ninalima võetakse haigelt steriilse vatt-tampooniga. Röga kogutakse steriilsesse nõusse. Leproomidest võetakse materjal uurimiseks haavandite puhul samuti steriilse vatt-tampooniga. Patoloogilis-histoloogiliseks uurimiseks võetakse leproomi- või nahatükikesed.

Mikroskoobiline uurimine.

Leproomide sisust, ninalimast ja rögast valmistatakse äigepreparaadid, mis värvitakse Ziehl-Neelseni meetodi järgi. Sellises äigepreparaadis võib leida sirgeid või kergelt kõverdunud happekindlaid kepikesi, mis sageli on teralise ehitusega. Need happekindlad kepikesed on asetatud tüüpiliselt kimpudena. Tekitajaid võib leida eriti rohkesti uuritavas algmaterjalis. Tuberkuloosi puhul on tuberkuloositekitajaid väga harva uuritavas algmaterjalis sellises külluses. Leepratekitajate tüüpilist kimpudena esinemist peetakse nende paljunemisel tekninud rakusisestest mikrokolooniatest põhjustatuks. Lepromatoosse granulatsioonikoe lõikude patoloogilis-histoloogilisel uurimisel võib leida tüüpilisi ühe- või paljutuumalisi rohkesti vakuoole ja leepratekitajate kuhilaid sisaldavaid suuri rakke.

Allergiline nahatest.

Diagnoosimiseks allergilise nahatesti abil süstitakse naha sisse 0,1 ml lepromiini. Leepra esinemisel tekib patsiendil varajase positiivse reaktsioonina 1. - 3. päeval 1 - 3 cm lä-

bimõõduga teravalt piirdunud punetus süstimiskohal. Ühe nädala pärast on tekkinud väike violetne paapul, 3. nädalal hilisreaktsioonina haavandiliselt lagunev sõlmeke. Hilisreaktsiooni järgi diagnoositakse leeprat.

Lepromiin on leepratekitajaid sisaldava leepromi peenustatud suspensioon füsioloogilises keedusoolalahuses.

Seroloogiline uurimine.

Vähese diagnostilise väärtusega on leepra diagnoosimiseks teostatavad seroloogilised reaktsioonid oma mittespetsiifilisuse tõttu. Mittespetsiifiliselt võib positiivseks osutuda Wassermanni komplemendi sidumise reaktsioon. Samuti leiab kasutamist komplemendi sidumise reaktsioon tuberkuloositekitaja - antigeeniga, kuna esineb antigeenne sugulus Mycobacterium leprae ja Mycobacterium tuberculosis'e vahel. See meetod annab positiivseid tulemusi varajastel juhtudel 45%, närvileepra puhul 60%. ja nahaleepra puhul 95%.

Leepra diagnoosimiseks kasutatakse leepra reaktsiooni Rubino järgi, mis põhineb leeprahaige inaktiveeritud vereseerumis formoliseeritud oinapunaliblede aglutinatsioonile. Formoliseeritud oinapunaliblede saamiseks võetakse 10 osa normaalsete oinapunaliblede suspensiooni ja 1 osa 4%-list formaliini. Segu lastakse seista 20 - 24 tundi toatemperatuuris ja siis pestakse formaliin oinapunalibledelt füsioloogilise keedusoolalahusega. Inaktiveeritud vereseerum ja formoliseeritud punaliblede suspensioon hoitakse 37°C juures 15, 30 ja 60 minutit. Leeprahaige seerumis tekib aglutinatsioon juba mõne minuti jooksul.

Tuberkuloosist eristamiseks tehakse uuritavast materjalist külvid vastavaile tuberkuloositekitajate valiksöötmeile. Mycobacterium leprae ei kasva kunstlikel söötmeil ja sellega on ta eristatav Mycobacterium tuberculosis'est. Samaks otstarbeks nakatatakse ka uuritava materjaliga merisiga kui tuberkuloositekitajate nakkusele kõige vastuvõtlikum katseloom. Mycobacterium leprae ei põhjusta katselooma nakatumist ega kutsu esile viimasel mingeid patoloogilisi muutusi.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Homogeniseerida uuritav patoloogiline materjal.
2. Külvata homogeniseeritud materjali tuberkuloositekitajate valiksöötmele (MA-söötmele, kartulisöötmele, Sautoni söötmele jne.).
3. Jälgida demonstratsiooni korras katselooma nakatamist uuritava materjaliga.
4. Tundma õppida patoloogilis-anatoomilisi muutusi tuberkuloosi nakatunud katselooma elundeis.
5. Uurida Mycobacterium leprae't valmispreparaatides, mis on värvitud Ziehl-Neelseni meetodi järgi.

XV p r a k t i k u m .

T e e m a : DIFTEERIA JA TUBERKULOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

I s e s e i s e v t ö ö .

XVI praktikum.

Teema: PATOGEENSETE SEENTE JA SPIROHEETIDE POOLT PÕHJUSTATUD NAKKUSHAIGUSTE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Aktinomükoosi mikrobioloogiline diagnoos.

Aktinomükoosi tekitajaks on G. Actinomyces'esse kuuluvad kiirikseened. Need on täisnurga all hargnevad seenniidid. Organismis nad moodustavad druuse.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on fistulitest erituv mäda, fistulite äärtest granulatsioonkude, kopsu aktinomükoosi puhul on materjaliks röga ja soolevormi puhul roe.

Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast materjalist otsitakse druuse. Need on väikesed 1 mm läbimõõduga kollase värvusega kõvad terakesed. Druusid loputatakse ettevaatlikult kaevuvees ja uuritakse natiivselt eseme- ja katteklaasi vahel või värvitakse Grami meetodi järgi. Druusi keskosa moodustab seenniitide põimistik, mis värvub gram-positiivselt. Druusi servades on niidid paksenenud ja moodustavad siin kolvikesi, mis värvuvad gram-negatiivselt. Kui materjalis druuse ei leidu, valmistatakse sellest

tavalisel viisil äigepreparaadid ja värvitakse Grami meetodi järgi. Preparaadis esinevad gram-positiivselt värvunud täisnurga all hargnevad seenniidid või seenniitide fragmendid.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Druusid loputatakse steriilses füsioloogilises keedusoolalahuses ja hoitakse kõrvalfloora hävitamiseks 24 t. jooksul glütseriinis 37°C juures.

Osa inimesel antinomükoosi põhjustavaid kiirikseeni kasvab anaeroobselt, osa aeroobsetes tingimustes. Anaeroobsete kiirikseente kasvatamiseks kasutatakse 1,5%-list agarsöödet, millele on lisatud 1% glükoosi. Sööde kaetakse pealt steriilse vaseliinõli korraga. Kiirikseened kasvavad 37°C juures 5 päeva jooksul valgete läbipaistmatute kõvade pesadena. Aeroobselt kasvatatakse kiirikseeni nõrgalt leelisel agarsöötmel (pH 7,3), millele on lisatud 2% glütseriini. Nad kasvavad 37°C juures 2 - 4 päeva jooksul.

Seroloogiline uurimine.

Kasutatakse komplemendi sidumise reaktsiooni. Antigeeniks on kiirikseente lüseerunud puljongkultuuride filtraat.

Allergilised nahareaktsioonid.

0,3 ml kiirikseente puljongkultuuri filtraati süstitakse naha sisse. Reaktsiooni hinnatakse 24 t. pärast. Positiivse reaktsiooni puhul tekib süstekohal punetus ja turse.

D e r m a t o m ü k o o s i d e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Dermatomükoosidest esinevad sagedamini järgmised nakkused:

Favus e. lubiraig - tekitajaks on Trichophyton schoenleinii.

Trichophytia e. pügajaraig - tekitajaks on Trichophyton

tonsurans.

Microsporia - tekitajaks on Microsporon audouini.

Uuritav materjal.

Nakatatud kohast võetakse juuksed, karvad, nahaketud, küünte tükikesed. Juuksed ja karvad tõmmatakse välja koos juuksesibulaga, küüntest lõigatakse tükikesed skalpelliga. Materjal saadetakse uurimiseks kahe esemeklaasi vahel või paberisse pakitult.

Mikroskoobiline uurimine.

Esemeklaasile asetatakse paar tilka 25 - 30%-list KOH lahust ja sinna uuritav materjal. Preparaati soojendatakse kergelt leegil, kaetakse pealt katteklaasiga ja uuritakse mikroskoobi kuiva süsteemiga.

Trichophyton schoenleinii nakkuse puhul on juustes näha kuubikutaolisi, ümmargusi ja ovaalseid eoseid, mis on asetatud üksikult või lühikestes ahelates. Ahelad ei ole paralleelselt juukse pikiteljega. Juukse sees esinevad veel õhumullid.

Trichophyton tonsurans'i nakkuse puhul on eosed ümmarguse kujuga ja asetatud juukses pikkade ahelatena. Juukses esinevad veel seenniidid. Ectothrix liikide nakkuse korral on näha veel juukse ümber väikestest ümmargustest eostest koosnevat tuppe.

Microsporon audouinii nakkuse korral on juuks täidetud pikkade paralleelselt kulgevate ahelatega, mis koosnevad väikestest ümmargustest eostest. Ka juukse ümber on eostest koosnev tupp.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Seened on vähenõudlikud. Nende kasvatamiseks kasutatakse Sabouraud söödet (4 g maltoosi, 1 g peptooni, 1,8 g agarit, 100 ml aq. dest.). Kõrvalfloora hävitamiseks hoitakse materjali enne külvamist 2 - 3 min. jooksul 2 - 4%-lises

formaliinis. Optimaalne kasvutemperatuur on 27°C. Seened kasvavad söötmel 3 - 4 nädala jooksul nahkjate voldiliste mitmevärviliste pesadena.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomaks on merisiga. Merisea küljepiirkond vabastatakse karvadest ja skarifitseeritakse skalpelliga. Vigastatud kohale hõõrutakse uuritav materjal. Loom haigestub tavaliselt 6 - 7 päeva jooksul. Nahakettudes on võimalik sedastada mikroskoobilisel uurimisel seenniite ja eoseid.

Allergilised nahareaktsioonid.

Nahatesti kasutatakse trichophytia diagnoosimiseks. Allergeen e. trihofütiin valmistatakse Trichophyton tonsurans'i kultuurist ja süstitakse nahasse 0,1 - 0,2 ml. Positiivse reaktsiooni korral tekib süstekohal punetus ja turse 24 t. jooksul.

K a n d i d o o s i d e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Kandidoosside tekitajateks on Genus Candida'sse kuuluvad pärmisarnased seened. Kõige sagedamini põhjustab nakkust just Candida albicans. See on ümarjas, ovaalne või niidikujuline ainurakne seen. Noored vormid sarnanevad pärmirakkudele. Nad on ümmarguse või ovaalse kujuga, protoplasma on homogeenne ja selles asub tuum ning vakuool. Noored rakud paljunevad intensiivselt pungumise teel. Vanemad rakud on pikad niidikujulised ja moodustavad pseudomütseeli. Nende rakkude protoplasma on teraline ja sisaldab vakuoole. Pikkadel niidikujulistel rakkudel tekivad külgedele ja otstesse pungad, nn. blastospoorid, mille abil seen paljuneb. Pseudomütseeli otstes võivad areneda veel suured 20 - 22 µ läbimõõduga ümmargused moodustised, nn. klamüdospoorid. Nende rakkude kest on kahekordse piirjoonega ja sisaldis on teraline. Klamüdospoorid on seene püsivormideks.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on valkjashallikad katud limaskestadelt, mäda, röga, uriin, roe, seljaajuvedelik, harva ka veri. Materjali tuleb kohe uurida peale selle võtmist. Kui see pole võimalik, siis hoitakse materjali konserveeritult (1 osa glütseriini ja 2 osa materjali) jahedas kohas.

Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast materjalist valmistatakse preparaat kraanivees, 5 - 10%-lises leelises või järgmises segus: glütseriini 4 osa, etüülalkoholi 2 osa ja destilleeritud vett 4 osa. Segu võetakse sama palju kui materjali. Preparaat kaetakse pealt katteklaasiga ja 3 - 5 min. pärast uuritakse mikroskoobi kuiva süsteemiga.

Materjali võib uurida ka värvitud preparaatides. Sel juhul valmistatakse materjalist õhukesed äigepreparaadid, fikseeritakse etüülalkoholiga ja värvitakse Grami või Giemsa-Romanovski meetodi järgi.

Pärmisarnased seened värvuvad gram-positiivselt. Preparaadis on näha ümmargusi või ovaalseid pärmisarnaseid rakke, nende kõrval pikki niidikujulisi rakke e. pseudomütseeli. Klamüdospoore patoloogilises materjalis ei esine.

Kultuuri isoleerimine.

Candida albicans kasvab tavalistel söötmetel, kuid kiirema kasvu saamiseks puhaskultuuri isoleerimisel kasutatakse Sabouraud söödet või õllevirreagarit. Seened kasvavad 30°C juures 3 - 5 päeva jooksul tahkel söötmel valgete ümmarguste läikivate pesadena, vedelsöötmes kasvavad söötme põhjas teralise sademena. Candida albicans fermenteerib väikeses kirjus reas glükoosi ja maltoosi happeks ja gaasiks, sahharoosi ainult happeks.

Seroloogiline uurimine.

Antikehade määramiseks haige vereseerumis kasutatakse aglutinatsioonireaktsiooni ja komplemendi sidumise reaktsiooni. Aglutinatsioonireaktsioonis on antigeeniks 48 t. vanuse agarkultuuri suspensioon füsioloogilises keedusoolalahuses. KSR-is on antigeeniks sama kultuuri alkohoolne ekstrakt.

Allergilised nahareaktsioonid.

Nahareaktsiooni teostamiseks kasutatakse polüvalentset allergeeni. See on valmistatud mitmest värskelt isoleeritud seente kultuurist ja seened on surmatud kuumutamisel 80°C juures 2 t. jooksul.

L e p t o s p i r o o s i d e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Leptospiroose põhjustavad G. Leptospira'sse kuuluvad spiroheedid. Nõukogude Liidus on leptospirooside tekitajateks järgmised liigid:

1. Leptospira icterohaemorrhagiae - Weil-Vassiljevi tõve tekitaja.

2. Leptospira grippotyphosa - veepalaviku tekitaja. Haigus kulgeb tavaliselt seroosse meningiidina, kergetel juhtudel aga gripitaoliselt.

3. Leptospira hebdomadis - seitsmepäevapalaviku tekitaja.

4. Leptospira canicola - Weil-Vassiljevi tõvele sarnase, kuid kliiniliselt kergema kuluga nakkushaiguse tekitaja.

Kõik need spiroheedid on korrapäraste tihedate loogetega. Spiroheetide otsad on konksutaoliselt kõverdunud ja sageli on näha neis nööbitaolisi moodustisi. Konksutaoliselt kõverdunud otstega spiroheet meenutab kujult S tähte.

Leptospiroose diferentsitakse üksteisest erineva kliinilise pildi järgi. Kultuuri isoleerimine toimub kõikide liikide nakkuste puhul ühte viisi. Erinevaid liike pole võimalik diferentsida morfoloogiliste ja kultuuriliste omaduste järgi,

vaid selleks kasutatakse bioloogilist katsu ja aglutinatsiooni-lüüsi reaktsiooni spetsiifilise seerumiga.

Uuritav materjal.

1. Haigelt võetav materjal: veri, vereseerum, uriin ja meningiidi puhul seljaajuvedelik. Spiroheedid esinevad veres esimesel haigusnädalal, kui haigel on temperatuur kõrgenenud. Uriinis on spiroheedid 8. - 40. haiguspäevani.
2. Koolnu siseelundite tükikesed, veri, seljaajuvedelik.
3. Kahtlased loomad: hiired, rotid, kassid, koerad.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobilise meetodiga uuritakse verd, seljaajuvedelikku ja uriini spiroheetide suhtes. Haige tsitraatverd hoitakse 1 t. kestel toatemperatuuri juures, siis võetakse 10 tilka vereplasmat ja uuritakse pimeväljameetodiga (vt. üldosa IV praktikum). Seljaajuvedelikku ja uriini tsentrifuugitakse eelnevalt ja sadet uuritakse samuti pimeväljameetodiga.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Verest ja seljaajuvedelikust teostatakse külv söötmele. Tavaliselt kasutatakse söödet, mis koosneb 9 osast steriilsest kaevuveest ja 1 osast küüliku vereseerumist. Materjali külvatakse 1 - 2 tilka 2 ml söötme kohta. Spiroheedid kasvavad 25 - 30°C juures. Külve kontrollitakse mikroskoobiliselt pimeväljameetodiga 5 - 7 päeva järel 3 kuu kestel.

Bioloogiline uurimine.

Noortele merisigadele (150 - 200 g) või kuldhamsteritele süstitakse intraperitoneaalselt haige värsket verd, harvem tsitraatverd, seljaajuvedelikku või uriinisadet. Mõne päeva pärast tõuseb infitseeritud katseloomadel palavik ja südamevere külvist on võimalik isoleerida leptospirade kultuuri. Loomad surevad 1 - 2 nädalat peale nakatamist tüüpiliste muutustega. Lahangul on loomad ikteerilised, kõigis siseelundeis

ja kõhukelmel on näha täppverevalumid, maksas on nekrootilised kolded. Siseelundeis, eriti maksas, esinevad spiroheedid, mida sedastatakse mikroskoobilisel uurimisel.

Merisigadele on patogeenne eriti L. icterohaemorrhagiae, kuna teised leptospirade liigid on vähem või üldse mitte patogeensed. Viimastega nakatamisel katseloomad ei sure ja lahangul ei esine kollatõbe.

Seroloogiline uurimine.

1. Aglutinatsiooni-lüüsi reaktsioon.

Reaktsiooni kasutatakse antikehade määramiseks vereseerumis või seljaajuvedelikus alates 6. - 8. haiguspäevast. Kõige enam antikehi esineb vereseerumis 3. - 5. haigusnädalal.

Reaktsiooniks võetakse vereseerum lahjenduses 1:50 või lahjendamata seljaajuvedelik. Antigeeniks on 4 - 10 päeva vanune leptospirade kultuur, mis sisaldab vähemalt 100 - 150 spiroheeti vaateväljas 280-kordse suurendusega. Antigeen kontrollitakse pimeväljameetodiga, et ta ei sisaldaks aglutineerunud või lüseerunud leptospirasid.

Seerumlahjendusele lisatakse antigeeni võrdses koguses - 0,1 ml või 1 - 2 tilka. Katsutid hoitakse 37°C juures 2 tunni kestel ja loetakse tulemused mikroskoobiliselt. Kui see reaktsioon on positiivne, valmistatakse edasi seerumist lahjendused 1:50, 1:100, 1:200 jne. , seljaajuvedelikust 1:2, 1:4, 1:8. Reaktsioon teostatakse sarnaselt eelmisele. Reaktsiooni positiivsust hinnatakse mikroskoobi abil: katsuti sisu uuritakse pimeväljameetodiga. Reaktsioon on positiivne, kui tekib spiroheetide aglutinatsioon ja lüüs. Aglutinatsiooni puhul on preparaadis näha liikuvaid ämblikusarnaseid moodustisi, lüüsi korral muutuvad spiroheedid teralisteks.

2. Võib kasutada komplemendi sidumise reaktsiooni. Antigeenina kasutatakse tsentrifuugimisel tihendatud spiroheetide suspensiooni.

S ü ü f i l i s e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Süüfilise e. luese tekitajaks on Treponema pallidum. See on korrapäraste tihedate loogetega spiroheet, mille otsad on välja venitatud, sirged.

Uuritav materjal.

Uuritav materjal oleneb haigusstaadiumist.

I staadiumis (3 - 4 nädalat peale nakatumist) tekib nakkuskohas kõvade äärtega haavand - ulcus durum. Uuritavaks materjaliks on koevedelik haavandist. Haavandi põhi puhastatakse steriilse tampooniga ja servadele vajutades eraldub põhjast koevedelikku, mida uuritakse mikroskoobiliselt spiroheetide suhtes.

II staadiumis (9 - 10 nädalat peale nakatumist) tekivad nahale roseoolid või paapulid, millest võetakse koemahla mikroskoobiliseks uurimiseks. Selles staadiumis on aga põhiliselt uuritavaks materjaliks vereseerum seroloogilisteks reaktsioonideks.

III staadiumis (2 - 3 aastat peale nakatumist) tekivad nahal, limaskestadel, siseelundites ja luudes lagunemisele kalduvad sõlmetaolised moodustised - gummad.

IV staadiumis (10 - 20 aastat peale nakatumist) tekivad spetsiifilised kahjustused kesknärvisüsteemis. III ja IV staadiumis on uuritavaks materjaliks vereseerum ja seljaajuvedelik seroloogilisteks reaktsioonideks.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobilist uurimist kasutatakse I ja II haiguse staadiumis. Spiroheete uuritakse elusalt pimeväljameetodiga, Burri meetodiga ja värvitud preparaatides. Värvimiseks kasutatakse hõbetamismeetodit ja Giemsa-Romanovski meetodit.

Seroloogiline uurimine.

Spetsiifilised antikehad tekivad vereseerumisse 10 - 30 päeva peale ulcus durum'i teket. Nende määramiseks kasutatakse komplemendi sidumise reaktsiooni Wassermanni järgi koos kahe sadestusreaktsiooniga.

Wassermanni reaktsioon sarnaneb tehnilise läbiviimise poolest Bordet-Gengou reaktsioonile, kuid erineb reaktsiooni mehhanismilt. Kui Brodet-Gengou' reaktsioonis adsorbeeritakse komplement spetsiifilise kompleksi antikeha-antigeeni poolt, siis Wassermanni reaktsioonis on antigeeniks mitte spiroheetide kultuur, vaid süfiliitilise ja normaalse koe lipoidide alkohoolne ekstrakt. Patoloogiliselt muutunud kudedest valmistatud antigeeni nimetatakse spetsiifiliseks ja normaalsest koest valmistatud antigeeni mittespetsiifiliseks antigeeniks. Praegu kasutatakse just mittespetsiifilisi antigeene, näiteks härja südamelihase alkohoolset ekstrakti. Wassermanni reaktsiooniks tuleb kasutada vähemalt kahte erinevat antigeeni.

Komplemendi sidumise reaktsioon Wassermanni järgi.

Katsuti nr.	Haige seerum	Füsiol. lahus	Antigeen I	Antigeen II	Komplement	Hemolüütiline süsteem
1.	0,1	0,4	0,5	-	0,5	1,0
2.	0,1	0,4	-	0,5	0,5	1,0
3.	0,1	0,9	-	-	0,5 1 tund	1,0 30-60 min
4.	-	-	1,0	-	0,5	1,0 37°C
5.	-	-	-	1,0	0,5 37°C	1,0
6.	-	0,5	1,0	-	-	1,0
7.	-	0,5	-	1,0	-	1,0

Esitatud skeemi põhjal rakendatakse põhireaktsiooni (1., 2. katsuti) kõrval mitmesuguseid kontrolle: katsutis nr. 3 on uuritava seerumi kontroll, katsuteis 4 ja 5 antigeenide antikomplementaarsuse kontroll ja katsuteis 6 ja 7 antigeenide he-

motoksilisuse kontroll. Katsutites 3, 4 ja 5 peab normaalselt alati toimuma hemolüüs, kuna vastupidi, katsuteis 6 ja 7 ei tohi normaalselt hemolüüsi tulla.

Paralleelselt Wassermanni reaktsiooniga teostatakse sadestusreaktsioone. Siin on antigeeniks koelipoidide alkohoolsed lahused, mille tundlikkus on tõstetud mitmesuguste ainete, näiteks kolesteriini lisamisega. Sagedamini kasutatakse Kahni ja Sachs-Witebsky (citocholi) reaktsiooni.

Kahni reaktsiooni skeem.

Katsuti nr.	Antigeen	Haige seerum	Füsiol. lahus	Loksutada 3 minutit	Füsiol. lahus	Segada ja hinnata	
1.	0,05	0,15	-		1,0		
2.	0,025	0,15	-		0,5		
3.	0,0125	0,15	-		0,5		
4.	0,05	-	0,15		1,0		
5.	0,025	-	0,15		0,5		
6.	0,0125	-	0,15		0,5		

Positiivse Kahni reaktsiooni puhul tekib kõigis kolmes reaktsioonikatsutis pretsipitaat, mis on selgesti nähtav nii palja silmaga kui ka aglutinoskoobiga.

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

Taastuva tüüfuse e. typhus recurrens'i tekitajaks on Borrelia recurrentis. See on ebakorrapäraste loogetega spiroheet.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on haige veri, mis võetakse temperatuuri tõusu perioodil.

Mikroskoobiline uurimine.

Verd uuritakse pimeväljameetodiga. Samuti valmistatakse äigepreparaat ja preparaat paksutilgameetodiga ning värvitakse Giemsa-Romanovski värvilahusega 30 - 45 min. jooksul. Spiroheedid on ebakorrapäraste loogetega roosakasvioletselt värvunud niidikestena punaliblede vahel preparaadi värvumata foonil.

Kui spiroheete on vähe perifeerses veres, kasutatakse nende avastamiseks rikastusmeetodit. 5 ml haige verele lisatakse 10 ml 2%-list äädikhappelahust destilleeritud vees ja lastakse seista 10 min. Järgnevalt tsentrifuugitakse materjal ja sademest valmistatakse äigepreparaadid.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Spiroheedid kasvavad söötmetel halvasti. Nende kasvatamiseks kasutatakse söötmeid, mis sisaldavad natiivseid valke, tavaliselt hobuse või küüliku vereseerumit. Neid kasvatatakse 28 - 30°C juures 5 - 7 päeva jooksul. Kasvu kontrollitakse mikroskoobiliselt pimeväljameetodiga.

Bioloogiline uurimine.

Haige verega nakatatakse intraperitoneaalselt hiiri või merisigu. Loomadel esinevad spiroheedid perifeerses veres 24 t. peale nakatamist ja püsivad seal 24 t. jooksul. Spiroheete avastatakse katseloomadel Giemsa-Romanovski meetodi järgi värvitud vere äigepreparaatides.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Vaadata pimeväljas preparaati Leptospira icterohaemorrhagiae kultuurist.
2. Vaadata Leptospira icterohaemorrhagiae't demonstratsiooni preparaadis. Preparaat on valmistatud spiroheetide kultuuriga nakatatud merisea maksast ja värvitud hõbetamismeetodiga.

3. Teostada komplemendi sidumise reaktsioon Wassermanni järgi toodud skeemi kohaselt.
4. Vaadata Treponema pallidum'i demonstratsiooni preparaadis. Preparaat on valmistatud ulcus durum'ist võetud materjalist ja värvitud hõbetamismeetodiga.
5. Vaadata Borrelia recurrentis't demonstratsioonipreparaadis. Preparaat on valmistatud taastuva tüüfuse haige verest ja värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.
6. Valmispreparaat kiirikseente kultuurist värvida Grami meetodi järgi.
7. Uurida favushaige juukseid mikroskoobiliselt.
8. Uurida trichophytiahaige juukseid mikroskoobiliselt.
9. Värvida valmispreparaat Candida albicans'i kultuurist Grami meetodi järgi.

XVII praktikum.

Teema: PATOGEENSETE ALGLOOMADE POOLT PÕHJUSTATUD NAKKUSHAIGUSTE JA TÄHNILISE TÜÜFUSE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Malaaria mikrobioloogiline diagnoos.

Malaariatekitajateks on Genus Plasmodiumisse kuuluvad algloomad:

Plasmodium vivax,
Plasmodium malariae,
Plasmodium ovale,
Plasmodium falciparum.

Nende algloomade areng toimub kahes tsüklis: suguline areng hallasääses - sporogoonia, ja suguta arengutsükkel inimese organismis - skisogoonia, mitmesugustes koerakkudes ja vere punalibledes. Inimene nakatub sääse torkest, kelle süljenäärmetest satuvad organismi sporozoidid, mis on algloomade sugulise arengu lõppastmeks. Sporozoidid paljunevad algul mitmesugustes koerakkudes - maksa ja põrnarakkudes, kus arenevad merezoidideks. Viimased tungivad verre ja on siin punaliblede parasiitideks.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on haige veri, mis võetakse temperatuuri tõusu perioodil või temperatuuri haripunktis tavaliselt sõrmest Franck'i nõela abil. Materjaliks võib olla veel sternaalpunktaat ja põrna punktaat.

Mikroskoobiline uurimine.

Diagnostikas kasutatakse just mikroskoobilist meetodit. Verest valmistatakse äigepreparaate ja preparaate paksutilgameetodil. Äigepreparaate fikseeritakse 96°-se etüülalkoholiga 15 min. jooksul, paksutilga preparaate ei fikseerita. Preparaadid värvitakse Giemsa-Romanovski meetodi järgi 30 - 50 min. jooksul (1 - 2 tilka Giemsa värvi 1 ml veele). Punalibled värvuvad heleroosalt, algloomade protoplasma helesiniselt, tuumaaine karmiinpunaselt. Leukotsüütide tuumad värvuvad violetselt.

Pl. vivax'i noored vormid punalibledes on sõrmusekujulised. Raku protoplasma on ringikujuliselt nähtav, kuna algloomа keskel asub suur vakuool, tuum asub ringi kõige kitsamas kohas nn. "sõrmusekivina". Pigmenti on näha 6 t. vanusel plasmoodil. Edasi ringikujuline skisont suureneb, omandab ebakorrapärase amöboidse kuju. Samal ajal suureneb punalible 1½ korda ja on värvunud kahvatumalt võrreldes teistega. Punalible protoplasmas on näha punaselt värvunud terakesi, nn. Schüffneri tähne. Umbes 36 tunni jooksul on punalible täitunud

plasmoodiga ja viimane hakkab jagunema. Amöboidne moodustis punalibledes jaguneb osakesteks, ka tuum jaguneb ühtlaselt nende osakeste vahel. Punalibles tekib rattakodaratacline moodustis, mis edasi jaguneb 12 - 24 (tavaliselt 16) osakeseks e. merozoidiks. Punalible lõhkeb ja merozoidid vabanevad. Selline tsükkel toimub 48 tunni jooksul. Merozoidid võivad uuesti tungida teistesse punalibledesse ning suguta arengufaas võib selliselt toimuda korduvalt.

Kõrvuti suguta vormidega arenevad punalibledes ka sugulised vormid - mikro- ja makrogametotsüüdid. Pl. vivax'i nakkuse puhul on neid perifeerses veres näha 10 - 14 päeva peale parasiitideveresuse tekke. Nad on ümmarguse kujuga, punaliblest veidi suuremad. Makrogametotsüütidel on helesinine protoplasma ja väike kromatiinivaene, sageli ekstsentriliselt asetsev tuum. Mikrogametotsüütidel on sinakas violetselt värvunud rakuplasma, tuum on suurem, asetatud tsentraalselt ja sisaldab palju kromatiini.

Plasmodium malariae arengutsükkel punalibledes toimub 72 t. jooksul. Algul areneb samuti ringikujuline moodustis, kuid punalibled ei suurene, ei ole kahvatumad ja neis ei esine Schüffneri tähne. Kui skisont areneb edasi, tekib paelataoline moodustis, mis on tugevasti pigmenteeritud ja värvuselt tumepruun. See jaguneb 4 - 12 (tavaliselt 8) merozoidiks. Need on asetatud punalibles korrapäraselt, rosetikujuliselt.

Gametotsüüdid on punaliblede suurused ja tugevamini pigmenteeritud kui Pl. vivax'i puhul.

Plasmodium ovale arengutsükkel sarnaneb eelmisele, kuid toimub kiiremini - 48 t. jooksul. Ringikujulisest plasmoodist areneb samuti paelataoline moodustis, kuid punalibled on suurenenud ja neis esinevad Schüffneri tähnid. Plasmoodi jagunemisel tekib 6 - 12 merozoidi, mis on asetatud rosetikujuliselt.

Plasmodium falciparum'i arengutsükkel kestab 24 - 36 t. Perifeerses veres esinevad ainult noored skisondid ilma pigmendita ja täiskasvanud sugulised vormid - gametotsüüdid. Vanemad skisondid esinevad siseelundite kapillaarides, nagu maksas, põrnas, luuüdis, ajus. Mikroskoobiline diagnoos pannakse

just gametotsüütide leiu alusel perifeerses veres.

Alglooma noored vormid on ringikujulised, suuruselt 1/5 punalible läbimõõdust. Samaaegselt võib ühte punaliblesse tungida 4 - 5 plasmoodi. Ringikujulised skisondid arenevad edasi hobuserauakujulisteks. Järgnevalt moodustub neist 16 - 20 merozoidi.

Noored gametotsüüdid on näha ainult siseelundeis, vanemad ka perifeerses veres ja nimelt 5 - 10 päeva peale parasiitideveresuse tekke. Gametotsüüdid on poolkuukujulised. Makrogametotsüüte on rohkem. Nende protoplasma on värvunud siniselt, keskel on väike tuum, mis sageli on kaetud pigmendiga. Mikrogametotsüütide protoplasma värvub punasemalt ja tuum on jaotunud difuusselt üle raku.

L e i š m a n i o o s i d e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Leishmania tropica tekitab idamaa katku e. naha leišmanioosi, kuna Leishmania donovani on kala-azari e. vistseraalse leišmanioosi tekitajaks.

Inimene nakatub moskiito torkega, kes on algloomade vahekandjaks.

Leišmanioosi tekitajad esinevad inimesel retikulo-endoteliaalsüsteemi-, põrna- ja maksarakkudes rakusiseste parasiitidena. Nad on ovaalse või ümmarguse kujuga algloomad raku keskel asuva suure ümmarguse tuumaga ja blefaroplastiga. Viburid neil puuduvad, nad on liikumatud.

Kultuuris on algloomad piklikud lansetikujulised, varustatud pika viburiga ja asetatud rosetikujuliselt.

N a h a l e i š m a n i o o s i m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on haavandi äärtest granulatsioonikude ja paapulite sisu.

Mikroskoobiline uurimine.

Materjalist valmistatakse äigepreparaadid, fikseeritakse 96°-se etüülalkoholiga 15 - 20 min. jooksul ja värvitakse Giemsa-Romanovski värvilahusega (1:10) 30 min. jooksul.

Leishmania tropica on asetatud intratsellulaarselt, peamiselt makrofaagides ja monotsüütides. Algloomade rakuplasma värvub siniselt, tuum karmiinpunaselt ning blefaroplast on pulgakujuline ja värvunud tumepunaselt.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Materjal külvatakse NNN (Novy, Nicolle, Mc. Neal) söötmele. See on 1,4%-line agarsööde, millele on lisatud 30% inimese, hobuse või küüliku defibrineeritud verd. Teiste mikroobide kasvu takistamiseks lisatakse veel juurde 200 - 500 toimeühikut/ml penitsilliini.

Algloomad kasvavad 22 - 25°C juures 4 - 5 ööpäeva kestel söötme kondensatsioonivees väikeste läbipaistvate pesadena. Kultuure jälgitakse 1 - 3 nädala jooksul. Kultuurist valmistatud preparaadis on algloomad pika lansetitaolise kujuga ja blefaroplastist väljuva pika viburiga. Nad moodustavad 10 - 15 algloomast koosnevaid rosette, s.t. algloomad on asetatud ringikujuliselt üksteise kõrvale, viburitega sissepoole.

Bioloogiline uurimine.

Uuritava materjaliga või kultuuriga nakatatakse valgeid hiiri intrakutaanselt kõrva- või sabajuure kohale. 10 - 12 päeva jooksul ilmub nakatuskohale infiltraat, milles esinevad intratsellulaarselt algloomad.

Allergilised nahareaktsioonid.

Allergeen valmistatakse algloomade kultuurist veri-suhkuragarilt. Kultuur pestakse steriilse füsioloogilise keedusoolalahusega 3 korda. Saadud sademes surmatakse algloomad kuumutamisel 56°C juures ja konserveeritakse 0,25%-lise fe-

nooli lisamisega. Suspensiooni süstitakse nahasse 0,1 ml. Positiivse reaktsiooni korral tekib süstimise kohas 24 - 48 t. jooksul punetus ja turse läbimõõduga 10 - 15 mm.

K a l a - a z a r i m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on põrna-, maksa-, lümfisõlmede ja sternaalpunktaat.

Mikroskoobiline uurimine ja kultuuri isoleerimine sarnanevad naha leišmanioosi puhul kasutatavale metoodikale.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomadeks on hamsterid, keda nakatatakse uuritava materjaliga intraperitoneaalselt. Loomad surmatakse 2 - 4 nädala pärast ning uuritakse siseelundeid mikroskoobiliselt algloomade suhtes ja isoleeritakse kultuur.

Seroloogiline uurimine.

Võib kasutada KSR-i, kus antigeeniks on algloomade kultuuri alkohoolne ekstrakt.

A a f r i k a u n e h a i g u s e m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Aafrika unehaigusetekitajad on Genus Trypanosoma'sse kuuluvad algloomad: Trypanosoma gambiense ja Trypanosoma rhodesiense.

Inimene nakatub tse-tse kärbse hammustusega, kes on algloomade vahekandjaks.

Algloomadel on piklik rakukeha, mida mööda külgeb unduleeruv membraan, mis lõpeb raku eesotsas pika viburiga. Viburi lähtekohaks on ümmarguse kujuga blefaroplast. Raku tuum on ümmargune ja asub algloomade keskosas. Tuumas asub tuumake ja tihedalt kromatiinterakesi.

Uuritav materjal.

Võetakse verd enne temperatuuri tõusu tavaliselt sõrmest Francki nõela abil. Samuti uuritakse lümfisõlmede ja sternaalpunktaati ning kliiniliselt väljakujunenud haigusjuhtudel seljaajuvedeliku sadet.

Mikroskoobiline uurimine.

Materjalist valmistatakse äigepreparaat ja preparaat paksutilgameetodil, mis värvitakse Giemsa-Romanovski värviga (1:10) 30 min. jooksul. Algllooma rakukeha värvub siniselt või sinakasvioletselt, unduleeruv membraan, vibur ja blefaroplast värvuvad karmiinpunaselt. Kuna algloomi esineb perifeerses veres perioodiliselt ja väheses hulgas, siis tuleb uuringut teostada korduvalt. Lümfisõlmede- ja sternaalpunktaadis esineb algloomi sagedamini ja suuremal arvul kui perifeerses veres.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomadeks on valged hiired ja hamstrid. Peale nakatamist haigestuvad loomad mõne päeva kuni nädala jooksul. Algloomi on võimalik avastada perifeersest verest Giemsa-Romanovski meetodi järgi värvitud äigepraparaadis.

A m ö b i a a l s e d ü s e n t e e r i a m i k r o b i o l o o g i l i n e d i a g n o o s.

Amöbiaalse düsenteeria tekitajaks on Entamoeba histolytica. Ta võib inimesel esineda kahesuguse vormina. Patogeenseks vormiks on vegetatiivne vorm, mis esineb soole limaskestas. See on ovaalse või ebakorrapärase kujuga algloom, hästi on eraldatav ento- ja ektoplasma, algloom liigub pseudopoodide abil. Tuum on ümmargune ja selle keskel asub tuumake. Entoplasmas esinevad fagotsüteeritud punalibled.

Teine vorm on väiksem, ovaalse või ümmarguse kujuga ja esineb soolevalendikus. Endo- ja ektoplasma pole nii hästi

eraldatav. Entoplasmas on tuum tuumakesega, kuid pole alati hästi nähtav. Entoplasmas esinevad veel väikesed vakuoolid. See vorm moodustab tsüste. Nakatumine amöbiaalsesse düsenteeriasse toimubki tsüstide sattumisel organismi seedetrakti kaudu. Algul on tsüst ühetuumaline ja sisaldab suuri glükogeenivakuoole. Valmis tsüst sisaldab 4 tuuma tuumakestega ja on peeneteralise protoplasmaga.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on haige roe või limane eritis pärasoolest.

Mikroskoobiline meetod.

Materjali uuritakse kas natiiv- või värvitud preparaatides. Natiivpreparaat tuleb valmistada kohe peale materjali võtmist, et see ei jahtuks. Otsitakse välja verine ja limane roojatükike, mis asetatakse esemeklaasile sooja füsioloogilise keedusoolalahuse tilka ning kaetakse pealt katteklaasiga. Preperaati uuritakse mikroskoobi kuiva süsteemiga.

Kui haigevoodi juures pole võimalik uuringut teostada, tuleb hiljem preparaadi tegemisel esemeklaasid soojendada.

Entamoeba histolytica tuleb diferentsida sooles normaalselt esinevast mittepatogeensest Entamoeba coli'st. Viimasel ei esine kunagi entoplasmas fagotsüteeritud punaliblesid, tuum on suurem ebakorrapärase kujuga ja tuumake asub ekstsentriliselt. Entamoeba histolytica tsüstil on 1 - 4 tuuma, E. coli tsüstil 1 - 8 tuuma.

Nakkuse diagnoosimisel kasutatakse ka värvitud preparaate. Värvimiseks kasutatakse raud-hematoksüliini. Sellises preparaadis värvuvad algloomas fagotsüteeritud punalibled mustalt, tuum on hall ja hästi on nähtav tuuma keskel tuumake.

Haigusetekitaja isoleerimine.

Algloomad kasvavad munakollast ja seerumit sisaldaval söötmel 37°C juures. Mikroobide kasvu pärssimiseks lisatakse

veel juurde penitsilliini ja streptomütsiini. Kontrollpreparaadid söötmetest tehakse 24 t. pärast. Negatiivse leiu puhul tehakse ümberkülvid katsuti põhjas sademest 48 - 72 t. järel.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomadeks on kassipojad, keda nakatatakse per rectum vegetatiivseid vorme sisaldava materjaliga või per os tsüste sisaldava materjaliga. Per rectum nakatamisel tehakse katseloomale eelnevalt klistiir ja narkoosi all viiakse jämesoolde kateetriga 6 - 7 ml materjali. Loom haigestub 1 - 21 päeva jooksul. Esineb kõhulahtisus ja roojas on leida algloomi.

Balantidium coli poolt põhjustatud nakkuse mikrobioloogiline diagnoos.

Balantidium coli põhjustab amöbiaalsele düsenteeriale sarnanevat jämesoolepõletikku. Ta esineb inimese sooles tavaliselt vegetatiivse vormina, väga harva tsüstina.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on haige roe.

Rooja uurimine mikroskoopilise meetodiga, samuti kultuuri isoleerimine sarnaneb amöbiaalse düsenteeria diagnoosimise meetoditele.

Balantidium coli on 50 - 100 μ suur ovaalse või ümmarguse kujuga algloom. Ta liigub aktiivselt natiivpreparaadis ripsmete abil ja on 2 tuumaga: üks on kõverdunud kujuga suur tuum, teine on väiksem ja kujult ümmargune. Algloома ümber on näha värvitud preparaadis ripsmete ring.

Toksoplasmoosi mikrobioloogiline diagnoos.

Toksoplasmoosi tekitajaks on Toxoplasma gondii. See on 4 - 7 μ pikkune apelsinilõigukujuline algloom, mis parasiteerib intratsellulaarselt inimese aju-, kopsu-, põrna-, maksarakkudes ja teistes elundeis. Algloomadel ei ole liikumisorganelle, rakkude protoplasmasse tungivad nad pöörlevate liigutuste abil.

Toksoplasmoosi haigestuvad nii koduloomad, metsloomad kui ka mitmesugused närilised. Haigusetekitajad eritatakse loomade organismist rögaga, uriiniga, roojaga, piimaga. Inimene haigestub peamiselt alimentaarsel teel, kasutades nakatatud toiduaineid - piima, liha, mune jne.

Uuritav materjal.

1. Haigelt võetav materjal: lümfisõlmede punktaat, proovitükikesed lümfisõlmedest, mandleist, lihastest, seljaajuvedelik, veri. Nimetatud materjale uuritakse mikroskoobilise ja bioloogilise meetodiga haigusetekitajate suhtes. Veel on uuritavaks materjaliks haige vereseerum, kus määratakse antikehi.

2. Laibalt võetav materjal: elundite, aju-, maksa-, põrna- jne. tükikesed.

Mikroskoobiline uurimine.

Uuritavast materjalist (lümfisõlmede punktaat, veri) valmistatakse äigepreparaadid või elunditükikestest puutepreparaadid. Seljaajuvedelikku tsentrifuugitakse ja sadet uuritakse algloomade suhtes. Preparaadid värvitakse Giemsa-Romanovski meetodi järgi. Algloomad on värvitud preparaatides poolkuukujulised, harvem ümarja kujuga ja asetatud tavaliselt intratsellulaarselt. Nende protoplasma värvub helesiniselt, tuum on granulaarne või kämpjas ja värvub rubiinpunaselt.

Uuritavast materjalist võib valmistada veel natiivpreparaadid eseme- ja katteklaasi vahel, mida vaadatakse tavalises mikroskoobis või faaskontrastmikroskoobis.

Preparaate tuleb väga hoolikalt uurida, kuna materjalis, eriti veres, on algloomi vähe.

Bioloogiline uurimine.

Katseloomadeks on tavaliselt valged hiired, kuid võib nakatada ka rotte, suslikuid ja hamstreid.

Uuritava materjali suspensiooni füsioloogilises keedusoolalahuses süstitakse katseloomale kõhuõõnde, naha alla või ajju. Valgele hiirele süstitakse materjali tavaliselt kõhuõõnde. Loomad haigestuvad 3 - 4 päeva jooksul. Lahangul esinevad algloomad kõhuõõne vedelikus ja siseelundeis, kus neid saab määrata mikroskoobilise meetodiga.

Seroloogiline uurimine.

1. Sabin-Feldmani test.

Testi põhimõte seisneb selles, et Toxoplasma gondii protoplasma värvub vereseerumis, kus ei esine spetsiifilisi antikehi, aluselise metüleensinise lahusega siniseks. Kui aga vereseerumis esinevad spetsiifilised antikehad, siis algloomade kuju muutub ja rakuplasma ei värvu.

Spetsiifilisi antikehi haige vereseerumis on võimalik määrata selle testiga 10 - 14 päeva peale nakatumist.

2. Komplemendi sidumise reaktsioon.

Antigeenina kasutatakse toksoplasmoosi tekitajatega nakatatud valgete hiirte kõhuõõnevedelikku, kus neid algloomi esineb suures hulgas.

Allergilised nahareaktsioonid.

Nahareaktsioon muutub positiivseks 4 nädalat peale nakatumist ja püsib positiivsena tavaliselt kogu eluaja.

Allergeenina kasutatakse algloomadega nakatatud valgete hiirte kõhuõõne eksudaati, milles haigusetekitajad on surmatud erilisel töötlemisel. Allergeeni süstitakse naha sisse 0,1 ml. Reaktsiooni hinnatakse 48 t. pärast.

Tähnilise tüüfuse mikrobioloogiline diagnoos.

Tähniline tüüfus on raskekujuline nakkushaigus, mis levib ainult haigusetekitajatega nakatunud riide- ja peatäide kaudu.

Tähnilise tüüfuse ehk typhus exanthematicus'e tekitajaks on Rickettsia prowazekii. Riketsiad on rakusisesed parasiidid. Nad paljunevad ainult elavates koerakkudes, mitte aga kunstlikel söötmeil.

Riketsiad on ümmargused, ovaalsed või pulgakujulised. Nad on liikumatud, gram-negatiivsed, värvuvad halvasti tavaliste aniliinvärvidega.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on veri, sternaalpunktaat ja vereseerum. Riketsiad esinevad haigel veres kogu palavikuperioodi kestel. Antikehi on võimalik määrata vereseerumis 5. - 6. haiguspäevast alates.

Mikroskoobiline uurimine.

Mikroskoobiline uurimine osutub sageli negatiivseks, kuna riketsiad on väga väikesed ja neid on uuritavas materjalis raske avastada.

Verest ja sternaalpunktaadist valmistatakse preparaadid ja värvitakse Giemsa-Romanovski meetodi järgi. Riketsiad on punaselt värvunud väikesed punktitaolised kehakesed, asetatud intratsellulaarselt. Preparaate võib värvida veel hõbetamismeetodiga ja Macchiavello meetodi järgi.

Preparaati võib valmistada ka nakatatud täi soolest, milles on näha massiliselt riketsiaid intratsellulaarselt 4 - 5 p. peale täi nakatamist.

Bioloogiline uurimine.

Merisigu, tavaliselt isasloomi, nakatatakse intraperitoneaalselt 2 - 4 ml värske või defibrineeritud verega, mis on

võetud haigelt palaviku perioodis. 5 - 12 päeva peale nakatamist esineb riketsiaid massiliselt meriseal ajus, munandeis, põrnas.

Intranasaalselt võib nakatada küülikuid, hiiri, koeri, merisigu, kellel tekib riketsiate pneumoonia.

Nakatatud loomade elundeis määratakse riketsiaid mikroskoobilisel uurimisel.

Seroloogiline uurimine.

Nakkuse diagnoosimiseks kasutatakse komplemendi sidumise- ja aglutinatsioonireaktsiooni riketsiate antigeeniga. Kasutatav antigeen valmistatakse tsentraliseeritud korras vastavates laboratooriumides ja kujutab endast riketsiate suspensiooni, mis on saadud nakatatud hiire kopsust või nakatatud kanaembrüo rebukotist. Reaktsioonid on positiivsed alates 5. - 6. haiguspäevast.

Sageli kasutatakse veel diagnoosimiseks Weil-Felix i aglutinatsioonireaktsiooni, kus antigeeniks on Proteus vulgaris OX_{19} või OX_2 tüvede eluskultuur või standarddiagnostikumid. Reaktsiooni teostatakse tehniliselt samuti nagu klassikalist Widali aglutinatsioonireaktsiooni. Weil-Felix i reaktsioon muutub positiivseks 5. päeval peale haigestumist. 5. - 6. haiguspäevast on reaktsioon positiivne seerumlahjenduses 1:320 ja enam. Reaktsiooni tuleb teostada korduvalt, kusjuures alles tiitri tõus kinnitab diagnoosi.

T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Uurida malaariatekitajaid Giemsa-Romanovski meetodi järgi värvitud äigepreparaatides.
2. Vaadata Leishmania donovani demonstratsioonipreparaadis. Preparaat on valmistatud haige luuüdist ja värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.
3. Tutvuda demonstratsioonipreparaadiga, mis valmistatud Leishmania donovani kultuurist ja värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.

4. Uurida Trypanosoma gambiense't demonstratsioonipreparaadis. Preparaat on valmistatud haige verest ja värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.
5. Uurida Entamoeba histolytica't demonstratsioonipreparaadis. Preparaat on valmistatud haige roojast ja värvitud raud-hematoksüliiniga.
6. Uurida Toxoplasma gondii demonstratsioonipreparaadis. Preparaat on värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.
7. Vaadata Rickettsia prowazekii preparaati mikroskoobis. Preparaat on valmistatud täi soolest ja värvitud Giemsa-Romanovski meetodi järgi.
8. Teostada Weil-Felixi aglutinatsioonireaktsioon.

XVIII praktikum.

Teema: VIIRUSLIKE NAKKUSHAIGUSTE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.

Viiruslike nakkushaiguste mikrobioloogilise diagnoosimise põhised.

Viiruslike nakkushaiguste mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse mikroskoobilisi ja seroloogilisi meetodeid, samuti viiruste isoleerimist.

Mikroskoobilised meetodid.

Mikroskoobilised meetodid põhinevad:
1) elementaarkehakeste leiul,
2) inklusioonkehakeste sedastamisel ja
3) viiruste poolt kudedes tekitatud tüüpiliste patohisto-

loogiliste muutuste avastamisel.

Elementaarkehakeste leidu kasutatakse näiteks rõugete (Paschen kehakesed), tuulerõugete (Aragao kehakesed) ja ornitoosi diagnoosimisel. Inklusioon - ehk sulundkehakeste sedastamisel põhineb marutõve (Negri kehakesed), trahhoomi (Prowazeki kehakesed) ja kollatõve diagnoosimine.

Elementaar- ja sulundkehakeste levinumad värvimismeetodid on toodud üldmikrobioloogia XV praktikumis. Viimasel ajal on elementaar- ja sulundkehakeste sedastamiseks ja samastamiseks hakatud tarvitama ka fluorestseerivaid antikehi.

Viiruste poolt kudedes tekitatud tüüpiliste patohistoloogiliste muutuste avastamine aitab diagnoosida näiteks lümfotsütaarset koriomeningiiti.

Seroloogilised meetodid.

Seroloogilistest meetoditest kasutatakse kõige sagedamini:

1) komplemendi sidumise reaktsiooni (KSR),
2) viiruse neutralisatsioonireaktsiooni ja
3) hemaglutinatsiooni pärssimise reaktsiooni (HAPR).

Viiruslike nakkushaiguste diagnoosimisel püütakse seroloogilisi reaktsioone alati teha paarisseerumitega, võttes haigelt verd esimestel haiguspäevadel (esimene seerum) ja teatud aja möödumisel (teine seerum). Sageli on reaktsioon diagnostilise väärtusega ainult siis, kui teises seerumis võrreldes esimese seerumiga on täheldatav vähemalt neljakordne vastavate antikehade tiitri tõus.

Viroloogias kasutatakse KSR-i teostumisel sageli nn. komplemendi külma sidumist - põhisüsteem paigutatakse enne indikaatorsüsteemi lisamist 18 tunniks külmutuskappi 4°C juurde. Tavaliselt hoitakse põhisüsteemi ühe tunni vältel termostaadis 37°C juures (vaata üldmikrobioloogia XIV praktikum). Komplemendi külm sidumine suurendab reaktsiooni tundlikkust. Viiruslikest nakkushaigustest diagnoositakse KSR-i abil näiteks puugientsefaliiti, kollapalavikku, ornitoosi, parotiiti, grippi jne.

Viiruse neutralisatsioonireaktsioon põhineb haige organismis tekkivate spetsiifiliste viirust inaktiveerivate antikehade sedastamisel. Reaktsiooni teostamisel tavaliselt valmistatakse vastava viiruse lahjendused, lisatakse neile lahjendamata uuritavaid seerumeid, lastakse 1 - 2 tundi seista ja süstitakse tundlikele katseloomadele. Kontroll-loomadele süstitakse viiruse ja füsioloogilise keedusoolalahuse, samuti viiruse ja normaalseerumi segu. Reaktsiooni loetakse positiivseks, kui võrreldes kontrollrühma surnud loomade arvuga jääb ellu vähemalt 50% katseloomi, ja tugevasti positiivseks, kui ellu jääb vähemalt 75% katseloomi.

Viiruse neutralisatsioonireaktsiooni võib teostada ka kanaembrüotel ja koekultuuridel. Viimasel juhul tõestab spetsiifiliste antikehade olemasolu puuduv tsütopatogeenne efekt. Viiruse neutralisatsioonireaktsiooni koekultuuridel kasutatakse eriti laialdaselt poliomüeliidi ja teiste seedetrakti viiruste uurimisel.

Viirusliku nakkushaiguse kulus muutub komplemendi sidumise reaktsioon positiivseks juba esimestel haiguspäevadel, viiruse neutralisatsioonireaktsioon aga alles 3. - 4. haigusnädalal. Seejuures püsib KSR positiivsena vaid 3 - 4 kuud, viiruse neutralisatsioonireaktsioon aga aastaid. Öeldust sugeneb mõlemate reaktsioonide kasutamine: KSR kasutatakse viiruslike nakkushaiguste varajasel, viiruse neutralisatsioonireaktsiooni aga retrospektiivsel diagnoosimisel, samuti elanikkonna immuunsusseisundi määramisel.

Mitmesugused viirused põhjustavad merisea, oina, kana jmt. loomaliikide, samuti inimese erütrotsüütide kokkukleepumise - hemaglutinatsiooni. Vastava nakkushaiguse põdemisel (samuti vaktsineerimise tagajärjel) tekivad organismis spetsiifilised antikehad, mis seda viiruse omadust pärsivad. Nende antikehade sedastamisel vereseerumis põhineb hemaglutinatsiooni pärssimise reaktsioon - HAPR. HAPR-i kasutatakse kõige sagedamini gripi ja parotiidi, kuid samuti rõugete jmt. viiruslike nakkushaiguste diagnoosimisel.

Viiruste isoleerimine.

Viiruste isoleerimiseks kasutatakse:

1) katseloomi,
2) kanaembrüoid ja
3) koekultuure.

Katseloomade valikul viiruste isoleerimiseks tuleb arvestada nende tundlikkust ühe või teise viiruse suhtes, nakatamisviisi valikul aga viiruse tropismi. Nii näiteks saab poliomüeliidi viirusi isoleerida ainult ahvidel, amrutõveviirust aga samuti küülikutel ja valgetel hiirtel. Neurotroopse puugientsefaliidiviiruse isoleerimiseks tuleb valgeid hiiri nakatada intratserebraalselt, pneumotroopse gripiviiruse isoleerimiseks aga intranasaalselt. Vaatamata viiruse tropismile on valged hiired üldiselt siiski kõige tundlikumad intratserebraalsele nakatamisele.

Häid tulemusi annab viiruste isoleerimine pahaloomulis-te kasvajatega katseloomadel. Valgetele hiirtele poogitakse Ehrlichi astsiitkartsinoomi või Crockeri sarkoomi ja süstitakse siis uuritavat materjali. Sellistel katseloomadel võib viirust suurimas hulgas sedastada just kasvajakoes. Katseloomadele võib pookida ka eelnevalt uuritava materjaliga segatud kasvajakude.

Mõnede viiruste isoleerimisel on määrava tähtsusega katseloomade vanus. Nii näiteks on Coxsackie-viirusi võimalik isoleerida ainult vastsündinud hiirtel.

Viiruste isoleerimist katseloomadel kasutatakse kollapalaviku, ornitoosi, psittakoosi, puugientsefaliidi jmt. viiruslike nakkushaiguste diagnoosimisel.

Viiruste isoleerimisel kanaembrüotel tuleb silmas pidada, et mitmesugustele viirustele on optimaalseiks erinevad nakatamisviisid, kanaembrüote vanus, inkubeerimisaeg ja temperatuur. Nii näiteks nakatatakse parotiidiviiruse isoleerimiseks amnioniõõnde 7-päevaseid kanaembrüoid ja inkubeeritakse neid 4 päeva vältel 37°C juures, gripiviiruse tüübi C isoleerimiseks aga nakatatakse amnioniõõnde 10 - 11-

päevaseid kanaembrüoid ja inkubeeritakse neid kahe päeva vältel 32°C juures. Psittakoosiviiruse isoleerimisel nakatatakse kanaembrüoid rebukotti.

Viiruste isoleerimist kanaembrüotel kasutatakse kõige sagedamini gripi, parotiidi ja rõugete diagnoosimisel.

Viimasel ajal on eriti levinud viiruste isoleerimine koekultuuridel. Ei tohi aga unustada, et mitmesugustele viirustele võivad olla optimaalseiks erinevad koekultuurid. Nii näiteks on enamik adenoviirusi paremini isoleeritavad HeLa kultuuril, ECHO-viirused aga ahvi neerukoe kultuuril.

Viiruste isoleerimist koekultuurides kasutatakse esmajoones poliomüeliidi diagnoosimisel.

Viiruste isoleerimisel töödeldakse eelnevalt uuritavat materjali penitsilliini ja streptomütsiiniga (500 - 1000 ü 1 ml uuritava materjali kohta), et hävitada võimalik bakteriaalne floora. Samal eesmärgil võib uuritavat materjali filtrida läbi bakteriaalsete filtrite.

Viiruste isoleerimiseks uuritavast materjalist on kõige otstarbekohasem üheaegselt kasutada mitmesuguseid isoleerimismeetodeid (näiteks koekultuure ja katseloomi), seejuures omakorda varieerides ka neid (näiteks HeLa ning ahvi neerukoe kultuure ja vastsündinud ning täiskasvanud valgeid hiiri).

Alati ei õnnestu isoleerida viirust esmasnakatamisel. See asjaolu sunnib kasutama nn. pimedaid passaaže - näiteks süstitakse uutele hiirtele intratserebraalselt esmaselt nakatatud hiirte ajukoe suspensiooni. Analoogiliselt talitatakse ka viiruste isoleerimisel kanaembrüotel või koekultuuridel. Tavaliselt tehakse 2 - 3 pimedat passaazi.

Viiruste isoleerimisel sedastatakse ja samastatakse neid seroloogiliste reaktsioonide abil vastavate spetsiifiliste seerumitega. Nii näiteks puugientsefaliidiviiruse isoleerimisel valgetel hiirtel kasutatakse KSR-i ajukoe suspensiooni ja puugientsefaliidi immuunseerumiga; poliomüeliidiviiruse isoleerimisel koekultuuridel tsütopatogeensel efektil põhinevat viiruse neutralisatsioonireaktsiooni toitelahuse ja

poliomüeliidi immuunseerumiga; parotiidiviiruse isoleerimisel kanaembrüotel HAPR-i allantoisivedeliku ja parotiidi immuunseerumiga jne. Kasutatakse ka mikroskoobilisi meetodeid (näiteks Negri kehakeste leid katselooma ajukoes marutõveviiruse isoleerimisel), arvestatakse haigestunud katseloomade kliinilist pilti (näiteks entsefaliidinähud valgetel hiirtel puugientsefaliidiviiruse isoleerimisel), makroskoobiliselt täheldatavaid tüüpilisi muutusi kudedes (näiteks rõugete viirusele iseloomulikud valkjad naastutaolised moodustised koorionallantoisil) jne.

Viiruslike nakkushaiguste mikrobioloogilisel diagnoosimisel kasutatakse väga mitmesuguseid uurimismeetodeid. Igal konkreetsel haigusjuhul tuleb valida just need uurimismeetodid, mis võiksid anda parimaid tulemusi. Seejuures arvestatakse haigusjuhu epidemioloogiat, anamnestilisi andmeid, kliinilist leidu, haiguspäeva, laboratoorseid võimalusi jne. Alati annab paremaid tulemusi mitmesuguste uurimismeetodite kombineeritud kasutamine. Olgu mainitud, et mõnede viiruslike nakkushaiguste puhul (ornitoos, parotiit) kasutatakse ka allergilisi nahareaktsioone. Suure tähtsusega eriti just viiruste isoleerimisel on õige uuritava materjali võtmine ja uurimiseks saatmine.

Uuritava materjali võtmine ja viroloogiliseks uurimiseks saatmine.

Uuritava materjali võtmise ja mikrobioloogia laboratooriumi saatmise põhinõuded on toodud üldmikrobioloogia XII praktikumis. Siinkohal juhitakse tähelepanu ainult mõningatele üksikasjadele, mida tuleb tähele panna just viroloogilise materjali korral.

Viiruste isoleerimiseks võetakse haigelt see materjal, mis peab sisaldama viirust kõige suuremal hulgal. Neurotroopsete viiruste puhul on selliseks materjaliks seljaajuvedelik ja veri, lahangul aga pea- ja seljaajutükikesed. Pneumotroopsete viiruste isoleerimiseks võetakse haigelt

nina- ja kurgulima, lahangul aga kopsukude , samuti kurgu limanaha kaabet. Dermotroopseid viirusi isoleeritakse kahjustatud naha- ja limanahatükikestest, villide ja mädavillide sisaldisest, samuti verest. Pantroopsete viiruste korral on tähtsaimaks uuritavaks materjaliks veri, kuid uuritakse ka nina- ja kurgulima, seljaajuvedelikku, uriini, rooja. Kui ei osata kahtlustada teatud kindlat viirust, võetakse haigelt viiruse isoleerimiseks verd, seljaajuvedelikku, nina- ja kurgulima, uriini, rooja, lahangult aga mitmesuguseid elund- ja koetükikesi.

Vere võtmisel viiruste isoleerimiseks ei tohi kasutada naatriumtsitraati, vaid tuleb veri defibrineerida. Hüübimise vältimiseks on lubatud lisada verele hepariini. Vastavate võimaluste puudumisel võib isoleerida viirusi hüübunud verest, kasutades nakatamiseks verehüübest valmistatud suspensiooni.

Viiruste säilitamiseks on kõige parem saata materjal laboratooriumi külmutatult laiasuudmelistes termostes (nn. hiina termosed). Tahke süsihappe puudumisel võib termosed täita jää (lume) ja keedusoola seguga. Erandi moodustab leetrite viirus, mis külmas hävib. Selle viiruse isoleerimiseks tuleb nakatada koekultuure uuritava verega vahetult haigevoodi juures.

Rooja- ja koetükikesi saadetakse laboratooriumi 50%-lises glütseriinilahuses. Selle lahuse valmistamisel võetakse üks osa keemiliselt puhast glütseriini ja üks osa füsioloogilist keedusoolalahust, reguleeritakse pH 7,4 - 7,6 ja steriliseeritakse autoklaavis 30 minuti vältel 120°C juures. Konservandi leelise reaktsiooni säilitamiseks võib füsioloogilise keedusoolalahuse asemel kasutada fosfaatpuhvrit (fosfaatpuhvri valmistamine: I lahus - 1 liitris destilleeritud vees lahustada 11,876 g $Na_2HPO_4.2H_2O$; II lahus - 1 liitris destilleeritud vees lahustada 9,078 g KH_2PO_4; segada 8 osa I ja 2 osa II lahust -puhverlahuse pH 7,4). Kõige parem on ka konservanti võetud materjal saata laboratooriumi külmutatult. Tuleb silmas pidada, et ainsa viirusena ei

säili glütseriinis lymphogranuloma inguinale viirus.

Viroloogilised laboratooriumid on viroloogilise materjali säilitamiseks varustatud sügavkülmutuskappidega, kus temperatuur püsib -15 - -70°C juures.

Gripi viroloogiline diagnoosimine.

Gripitekitajaks on gripiviirus, millel eristatakse kolme tüüpi - A, B ja C. Tüüpi A kuuluvad viirused A, A_1 ja A_2, samuti mõned loompatogeensed viirused. Gripi viroloogilisel diagnoosimisel kasutatakse mikroskoobilisi ja seroloogilisi meetoteid, samuti viiruse isoleerimist kanaembrüotel. Diferentsiaaldiagnostiliselt on kõige tähtsam eristada grippi ülemiste hingamisteede katarridest.

Mikroskoobilised meetodid.

Mikroskoobilised meetodid põhinevad gripi puhul nina limanaha rakkudes esinevate muutuste sedastamisel. Neid muutusi uuritakse nina limanahast valmistatud puutepreparaatides - nn. rinotsütogrammides. Gripile on iseloomulik nina limanaha epiteelirakkude irdumine ühes nende rakkude protoplasmas ilmnevate fuksinofiilsete sulundkehakestega. Üksnes epiteelirakkude irdumine võib olla ka mõnede teiste haigusprotsesside tulemuseks, kuid siis puuduvad nendes rakkudes fuksinofiilsed sulundkehakesed. Ülemiste hingamisteede katarride korral leidub rinotsütogrammides suurel hulgal leukotsüüte ning mitmesuguseid mikroobe ja tavaliselt vaid üksikuid epiteelirakke.

Rinotsütoskoopia on parimaks seni tuntud gripi varajaseks laboratoorseks diagnoosimismeetodiks. Gripiviiruse tüüpe rinotsütoskoopia aga ei võimalda määrata. Rinotsütoskoopiat teostatakse 2. - 4. haiguspäeval.

Rinotsütogrammide tarvis kasutatakse spetsiaalseid kitsaid lihvitud äärtega esemeklaase pikkusega 9 - 11 cm, laiusega 5 - 8 mm ja paksusega 2 - 2,5 mm. Selliseid esemeklaa-

se võib valmistada ka läbipaistvast plastmassist. Rinotsütogramme võetakse järgmiselt:

Esemeklaasi üks pool märgistatakse klaasipliiatsiga. Haiget palutakse nina nuusata ja siis viiakse esemeklaas ettevaatlikult väikese nurga all alla läbi ninapeegli ninna nii, et märgistatud pool jääks vastu nina vaheseina. Tundes väikest vastupanu, pööratakse esemeklaas märgistatud poolega ülespoole ja surutakse õrnalt vastaspoolega vastu nina limanahka. Edasi pööratakse esemeklaas jälle märgistatud poolega vastu nina vaheseina ja tõmmatakse ninast välja. Puutepreparaat jääb esemeklaasi märgistamata poolele. Otstarbekohane on valmistada rinotsütogrammid mõlemast ninasöörmest. Kui ninapeeglit pole, võib puutepreparaate valmistada kirjeldatud viisil ka ninapeeglita.

Rinotsütogrammidel lastakse õhus kuivada ja saadetakse laboratooriumi fikseerimata.

Rinotsütogrammide värvimiseks kasutatakse Koljaditski, Pigarevski, Pavlovski jt. värvimismeetodeid. Neist lihtsaim ja parim on Pavlovski värvimismeetod.

Pavlovski värvimismeetod.

Selleks värvimismeetodiks kasutatav värvilahus: 10 ml destilleeritud veele lisada 1 - 3 tilka aluselise fuksiini küllastatud lahust metüülalkoholis (10 g aluselist fuksiini 100 ml metüülalkoholis) ja 6 - 8 tilka metüleensinise küllastatud lahust metüülalkoholis (7 g metüleensinist 100 ml metüülalkoholis). Värvilahus peab olema sinine violetse varjundiga.

Rinotsütogrammi värvimine:

1. Fikseerimata puutepreparaat värvida Pavlovski värvilahusega 1 - 2 min.
2. Loputada kraaniveega.
3. Kuivatada, uurida.

Rakkude tuumad on sinised tumevioletse kromatiinollusega, protoplasma helelilla ja fuksinofiilsed sulundkeha-

kesed punase värvusega. Viimased võivad asetuda ka rakuväliselt.

Seroloogilised meetodid.

Gripi diagnoosimisel kasutatakse hemaglutinatsiooni pärssimise (HAPR) ja komplemendi sidumise reaktsiooni (KSR). Mõlemad reaktsioonid teostatakse paarisseerumitega, millest esimene võetakse 1. - 3. haiguspäeval, teine aga 15. - 20. päeval pärast haigestumist. Antigeenina kasutatakse gripiviiruse A-, A_1-, A_2-, B- ja C-ga nakatatud kanaembrüote allantoisivedelikku või vastavaid diagnostikume. Praegu toodetavad diagnostikumid on ühtsed mõlema reaktsiooni tarvis, sisaldades gripiviiruse nii korpuskulaarset V- kui ka lahustuvat S-antigeeni. HAPR-iga võib nende diagnostikumide abil määrata haigestumise põhjustanud gripiviiruse, KSR-i abil aga on võimatu diferentsida viirused A, A_1 ja A_2 nendel esineva ühise tüübispetsiifilise S-antigeeni tõttu. Mainitud viiruste eristamine KSR-i abil on siiski võimalik V-antigeenidega, mille valmistamine nõuab erimenetlusi.

Seroloogilised meetodid võimaldavad diagnoosida grippi vaid retrospektiivselt, kuid lubavad seeruures määrata haigestumist põhjustanud viirust. Viimane asjaolu on suure epidemioloogilise tähtsusega. KSR võimaldab diagnoosida ka ülemiste hingamisteede katarre.

Hemaglutinatsiooni pärssimise reaktsioon.

HAPR-i tulemustele mõjuvad segavalt vereseerumis leiduvad mittespetsiifilised gripiviiruse inhibiitorid - ained, mis takistavad gripiviiruse poolt tingitud hemaglutinatsiooni. Spetsiifiliste antikehade toime sedastamiseks tuleb seerum eelnevalt vabastada mittespetsiifilistest inhibiitoritest. Selleks otstarbeks soovitatud menetlustest (seerumi töötlus süsihappegaasiga, kaaliumperjodaadilahusega ja kooleratekitaja filtraadiga) tuleb lugeda parimaks seerumi töötlust kooleratekitaja filtraadiga, millist toodavad vastavad instituudid.

S e e r u m i t ö ö t l u s k o o l e r a t e k i t a j a f i l t r a a d i g a : Seerum inaktiveeritakse vesivannis 30 minuti vältel 56°C juures. Inaktiveeritud seerum lahjendatakse steriilselt 1:10 kooleratekitaja filtraadiga ja paigutatakse 18 - 20 tunniks termostaati 37°C juures. Pärast seda kuumutatakse seerumit uuesti vesivannis 30 minuti vältel 56°C juures.

E r ü t r o t s ü ü d i d : HAPR-is gripiviirustega A, A_1, B ja C kasutatakse 1%-list kana, viirusega A_2 aga 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni. Suspensioonid valmistatakse eelnevalt kolm korda füsioloogilise keedusoolalahusega pestud erütrotsüütidest. Verd võetakse kanal tiivaveenist või südamest (1 ml 5%-list naatriumtsitraadilahust + 4 ml kana verd).

A n t i g e e n i t i i t r i m i n e : 1.Valmistatakse antigeenide alglahjendused 1:10 füsioloogilise keedusoolalahusega.

2. Iga antigeeni tarvis võetakse 7 katsutist koosnev katsutite rida. Igasse katsutisse pipeteeritakse 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust.

3. Ridade esimestesse katsutitesse lisatakse 0,25 ml vastava antigeeni lahust alglahjenduses ja valmistatakse tavalisel viisil ridamisi antigeenide lahjendused 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 ja 1:1280. Iga lahjenduse hulgaks ühes katsutis jääb 0,25 ml.

4. Kõikidesse katsutitesse pipeteeritakse 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust.

5. Katsutitesse, mis sisaldavad gripiviiruste A, A_1, B ja C antigeeni, lisatakse 0,5 ml 1%-list kana erütsüütide suspensiooni. Katsutitesse, mis sisaldavad gripiviiruse A_2 antigeeni, lisatakse aga 0,5 ml 1 %-list inimese O-grupi erütsüütide suspensiooni.

6. Kontrolliks võetakse kaks katsutit 0,5 ml füsioloogilise keedusoolalahusega. Ühte neist pipeteeritakse 0,5 ml 1%-list kana ja teise 0,5 ml 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni.

7. Katsuteid loksutatakse korralikult. Tulemuste hindamiseni paigutatakse katsutid gripiviiruse C antigeeniga 60 minutiks külmutuskappi, teised aga jäetakse seisma 50 - 60 minutiks toatemperatuuri juurde.

Hemaglutinatsiooni puhul meenutab erütrotsüütide sade pitsäärisega rosetti, hemaglutinatsiooni puudumisel aga sileda äärisega ketast.

Antigeeni tiitrile vastab suurim antigeeni lahjendus, mis kutsub veel esile selgesti täheldatava hemaglutinatsiooni. Seda lahjendust nimetatakse ka antigeeni üheks hemaglutineerivaks ühikuks - 1 HÜ. Reaktsiooni võetakse antigeeni 4 HÜ - kui näiteks selgesti täheldatav hemaglutinatsioon oli veel katsutis antigeeni lahjendusega 1:320, tuleb HAPR-i võtta antigeeni lahjenduses 1:80.

H A P R - i m e t o o d i k a :

1. Valmistatakse antigeenide lahjendused füsioloogilise keedusoolalahusega vastavalt nende tiitrimisel saadud tulemustele.

2. Võetakse kummagi seerumi tarvis 5 rida katsuteid - igas reas 7 katsutit. Esimesed katsutid kõikides ridades jäetakse tühjaks, ülejäänud katsutitesse aga pipeteeritakse 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust.

3. Viie rea esimesse ja teise katsutisse pipeteeritakse 0,25 ml kooleratekitaja filtraadiga töödeldud esimest seerumit, ülejäänud 5 rea esimesse ja teise katsutisse aga 0,25 ml kooleratekitaja filtraadiga töödeldud teist seerumit (seerumid on lahjendatud 1:10 töötlusel kooleratekitaja filtraadiga). Tavalisel viisil valmistatakse ridamisi seerumite lahjendused 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 ja 1:640. Iga lahjenduse hulgaks ühes katsutis jääb 0,25 ml.

4. Ridamisi pipeteeritakse katsutitesse 0,25 ml vastavat antigeeni: kummagi seerumiga katsutite esimesse ritta viiruse A, teise ritta - A_1, kolmandasse ritta - A_2, neljandasse ritta - B ja viiendasse ritta - C antigeeni. Katsuteid loksutatakse korralikult ja jäetakse 30 minutiks seisma toatemperatuuri juurde.

5. Katsutitesse, mis sisaldavad gripiviiruse A, A_1, B ja C antigeeni, lisatakse 0,5 ml 1%-list kana erütrotsüütide suspensiooni. Katsutitesse, mis sisaldavad gripiviiruse A_2 antigeeni, lisatakse aga 0,5 ml 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni.

6. Kontrolliks võetakse 5 katsutit 0,25 ml füsioloogilise keedusoolalahusega. Igasse neist katsuteist lisatakse 0,25 ml vastava gripiviiruse antigeeni. Katsutisse, mis sisaldab gripiviiruse A_2 antigeeni, pipeteeritakse 0,5 ml 1%-list inimese O-grupi, teistesse katsutitesse aga 0,5 ml 1%-list kana erütrotsüütide suspensiooni.

7. Katsuteid loksutatakse korralikult. Tulemuste hindamiseni paigutatakse katsutid gripiviiruse C antigeeniga 60 minutiks külmutuskappi, teised aga jäetakse seisma 50 - 60 minutiks toatemperatuuri juurde.

HAPR loetakse positiivseks selle gripiviiruse antigeeniga, mille suhtes teise seerumi antikehade tiiter vähemalt neljakordselt ületab vastava antikehade tiitri esimeses seerumis.

Hemaglutinatsiooni pärssimise reaktsioon.

Antigeenina kasutatud gripiviirus	I seerum (võetud 1.-3.haiguspäeval)							II seerum (võetud 15.-20. p. peale haigestumist)							Kontroll
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
A	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
A_1	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
A_2	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0
B	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\+ - hemaglutinatsioon puudub,

0 - esineb hemaglutinatsioon,

HAPR on positiivse gripiviiruse A_2 antigeeniga - selle antigeeni poolt põhjustatud hemaglutinatsiooni pärsib esimene seerum lahjenduses 1:10, teine aga veel lahjenduses 1:80.

Gripiviiruse isoleerimine kanaembrüotel.

1. Uuritavaks materjaliks on 1. - 3. haiguspäeval võetud nina- ja kurgulima. Haiget palutakse nina nuusata. Peale selle viiakse ettevaatlikult kummassegi ninasõõrmesse 5 - 10 minutiks steriilsed vatt-tampoonid. Tampoonidesse imbunud ninalima suspendeeritakse 5 ml lihapeptoonpuljongisse. Samasse katsutisse suspendeeritakse ka kolmanda tampooniga võetud kurgulima. Saadud suspensioon paigutatakse haigevoodi juures jää ning keedusoolaga täidetud termosesse ja saadetakse laboratooriumi.

2. Vahetult enne kanaembrüote nakatamist sulatatakse uuritav materjal toatemperatuuri juures üles ja lisatakse sellele 1000 ü penitsilliini ning 1000 ü streptomütsiini. Viiruse isoleerimiseks süstitakse 0,1 - 0,2 ml uuritavat materjali 5 10-11 päeva vanusele kanaembrüole amnioni. Sama süstlaga tehakse kontrollkülv glükoosipuljongisse võimaliku bakteriaalse reostuse kindlakstegemiseks. Nakatatud kanaembrüod paigutatakse 48 tunniks inkubaatorisse 34°C, kontrollkülv aga termostaati 37°C juures.

3. Kanaembrüod ovoskopeeritakse. Neist elusad paigutatakse järgmise päevani külmutuskappi 4°C juures (tarbekorral võib seda aega lühendada kahe tunnini), surnud aga avatakse kohe. Kontrollkülv peab olema steriilne - vastasel juhul lisatakse uuritavale materjalile uuesti antibiootikume ja korratakse kanaembrüote nakatamist.

4. Kanaembrüod avatakse ja steriilse Pasteuri pipetiga eemaldatakse amnioni- ja allantoisivedelikud. Viiruse sedastamiseks teostatakse hemaglutinatsioonireaktsioon igalt kanaembrüolt saadud vedelikuga (amnioni- ja allantoisivedeliku seguga). Selleks pipeteeritakse kahte katsutisse 0,25 ml vedelikku. Esimesse katsutisse lisatakse 0,25 ml 1%-list kana, teise aga 0,25 ml 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni. Katsuteid loksutatakse ja jäetakse seisma 50 - 60 minutiks toatemperatuuri juurde. Positiivse hemaglutinatsioonireaktsiooni korral määratakse isoleeritud viiruse tiiter.

Kui hemaglutinatsioonireaktsioon on negatiivne kõikidelt kanaembrüotelt saadud vedelikega, ühendatakse eraldi surnud ja surmatud kanaembrüote vedelikud, lisatakse antibiootikume ja nakatatakse nendega uued kanaembrüod - st. teostatakse uuritava materjali passaaž. Negatiivsete tulemuste puhul tuleb teostada vähemalt 2 passaaži - siis alles tohib uuringule anda negatiivne vastus.

5. Isoleeritud viiruse tiitri määramiseks pipeteeritakse kahte 7 katsutist koosnevasse katsutite ritta 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust. Mõlema rea esimestesse katsutitesse lisatakse 0,25 ml kanaembrüo vedelikku ja valmistatakse tavalisel viisil ridamisi viiruse lahjendused 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 ja 1:128. Iga lahjenduse hulgaks on 0,25 ml. Kõikidesse katsutitesse pipeteeritakse 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust ja ühte ritta 0,5 ml 1%-list kana ning teise ritta 0,5 ml 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni. Kontrolliks võetakse kaks katsutit 0,5 ml füsioloogilise keedusoolalahusega. Ühte neist pipeteeritakse 0,5 ml 1%-list kana ning teise 0,5 ml 1%-list inimese O-grupi erütrotsüütide suspensiooni. Katsuteid loksutatakse ja jäetakse seisma 50 - 60 minutiks toatemperatuuri juurde. Kui viiruse tiiter ehk 1 HÜ nii kana kui ka inimese erütrotsüütide suhtes on väiksem kui 1:8, tuleb viirus passeerida kanaembrüotel. Tiitri korral 1:8 ja enam võib asuda isoleeritud viiruse samastamisele. Seejuures kasutatakse neid erütrotsüüte, mille suhtes viiruse tiiter on kõrgem. Samastamiseks võetakse viirus lahjenduses, mis vastab 4 HÜ-le.

6. Viiruse samastamiseks kasutatakse HAPR gripiviiruse spetsiifiliste diagnostiliste seerumitega. Võetakse 5 rida katsuteid ja valmistatakse neisse gripiviiruse A, A_1, A_2, B ja C diagnostiliste seerumite lahjendused alates 1:40 ja lõpetades vastava seerumi tiitriga. Iga lahjenduse hulgaks ühes katsutis jääb 0,25 ml. Kõikidesse katsutitesse pipeteeritakse 0,25 ml lahjendatud samastatavat viirust ja 0,5 ml 1%-list erütrotsüütide (kas kana või inimese) suspensiooni. Seerumite kontrolliks pipeteeritakse 5 katsutisse 0,25 ml vastavat see-

rumit lahjenduses 1:40, 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust ja 0,5 ml 1%-list erütrotsüütide suspensiooni. Viiruse kontrolliks võetakse ühte katsutisse 0,25 ml lahjendatud viirust, 0,25 ml füsioloogilist keedusoolalahust ja 0,5 ml 1%-list erütrotsüütide suspensiooni. Katsuteid loksutatakse ja jäetakse seisma 50 - 60 minutiks toatemperatuuri juurde.

Uuritavast materjalist isoleeritud viirus vastab sellele viirusele, mille seerum kõige suuremas lahjenduses pärsib viiruse poolt tingitud hemaglutinatsiooni.

Ülemiste hingamisteede katarre põhjustavad viirused kanaembrüotel ei arene. Nende isoleerimiseks kasutatakse koekultuure.

R õ u g e t e v i r o l o o g i l i n e d i a g n o o s .

Rõuged on raske viiruslik nakkushaigus, mis peale üldnähtude iseloomustub sõlmelis-villilise löövega nii nahal kui ka limaskestadel. Haigusetekitaja suurus on 125 - 180 mμ. Selle viiruse elementaarkehakesi, nn. Pascheni kehakesi võib uurida tavalises mikroskoobis. Epiteelrakkude protoplasmas esinevad rõugete puhul tüüpilised sulundkehakesed, nn. Guarnieri kehakesed.

Rõugete viroloogilisel diagnoosimisel kasutatakse mikroskoobilisi ja seroloogilisi meetodeid, samuti viiruse isoleerimist kanaembrüotel. Harva kasutatakse ka bioloogilisi meetodeid. Laboratoorsel tööl rõugeviirusega tuleb täita eriti ohtlike nakkuste puhul kehtestatud ettevaatusabinõusid.

Uuritav materjal.

Uuritavaks materjaliks on naha- ja limaskestade löövelementide (nahasõlmekeste, vesi- ja mädavillikeste) sisaldis, nahakoorukesed ning ketud, nina- ja kurgulima, veri.

Uurimismaterjali võtmisel töödeldakse nahasõlmekesi ja villikesi etüülalkoholis niisutatud vatt-tampooniga. Edasi aspireeritakse nende sisaldis steriilse süstla või Pasteuri

pipetiga. Seejuures tuleb nõel või Pasteuri pipeti ots viia nahasõlmekestesse ja villikestesse paralleelselt nahapinnale. Kui selliselt vedelikku saada ei õnnestu, võetakse steriilse skalpelli või rõugepookimissulega uurimiseks lööbeelementide kaabet. Laboratooriumi saadetakse materjal kinnijoodetud ampullides ja katsutites või steriilse kummikorgiga suletud ja parafineeritud katsutites.

Nina- ja kurgulima võetakse steriilsete vatt-tampoonidega. Viimased saadetakse laboratooriumi samuti kinnijoodetud või steriilse kummikorgiga suletud ja parafineeritud katsutites.

Verd viiruse isoleerimiseks (1 - 2 ml) on soovitav võtta katsutitesse, mis sisaldavad 1 - 2 ml steriilset destilleeritud vett - s. t. verd viiruse isoleerimiseks on otstarbekohane lahjendada pooleks destilleeritud veega juba haigevoodi juures. Verd seroloogilisteks reaktsioonideks võetakse 3 - 5 ml steriilsetesse kuivadesse katsutitesse. Ka veri saadetakse laboratooriumi eespool kirjeldatud viisil suletud katsutites.

Katsutid uuritava materjaliga pakitakse vatti ja siis metallkarpi. Viimane pakitakse omakorda vatti ja tsellofaani ja asetatakse puukasti.

Mikroskoobilised meetodid.

Rõugete mikroskoobilisel diagnoosimisel kasutatakse kõige sagedamini Pascheni kehakeste sedastamist naha ja limanaha lööbeelementide sisaldisest valmistatud Morozovi järgi värvitud preparaatides (vaata"Laboratoorsed tööd mikrobioloogias" I lk. 154). Morozovi meetodi abil värvuvad Pascheni kehakesed tumepruuniks või mustaks ja on hästi nähtavad helekollasel foonil. Nad on kerasarnased ja asetuvad üksikuina, paarikaupa, lühikeste ahelatena ning kogumikena. Pascheni kehakesi tuleb diferentsida tuulerõugete viiruse elementaarkehakestest - Aragao kehakestest. Viimased on väiksemad, värvuvad halvemini ja asetuvad sageli tüüpiliste kolmest elementaarkehakesest koosnevate ahelatena.

Morozovi järgi värvitud preparaate võib uurida pimeväljameetodi abil. Sel juhul on Pascheni kehakesed eriti hästi nähtavad valgete moodustistena tumedal foonil.

Kõige kergem on sedastada Pascheni kehakesi äsja ilmunud villikeste veel läbipaistvast sisaldisest valmistatud preparaatides. Neid preparaate võib valmistada vahetult haigevoodi juures.

Seroloogilised meetodid.

Rõugete seroloogilisel diagnoosimisel kasutatakse peamiselt hemaglutinatsiooni pärssimise reaktsiooni (HAPR), harvemini komplemendi sidumise reaktsiooni (KSR). HAPR-i abil määratakse haige vereseerumis ilmnevaid antikehi, KSR-i abil aga naha ja limanaha löövbeelementides leiduvat spetsiifilist antigeeni - s. t. rõugeviirust.

Kui tegemist on vaktsineerimata või palju aastaid tagasi vaktsineeritud haigetega, muutub HAPR positiivseks juba 5. - 6. haiguspäeval. Hemaglutinatsiooni pärssivate antikehade tiiter saavutab kõige kõrgemaid väärtusi 12. - 15. haiguspäeval. Otstarbekohane on teostada HAPR algul 5. - 6. haiguspäeval võetud vereseerumitega, korrates hiljem reaktsiooni juba paarisseerumitega.

HAPR-i teostamisel inaktiveeritakse vereseerumit vesivannis 56°C juures 30 minuti vältel. Antigeeniks on kanaembrüo koorionallantoisi kestal kasvatatud rõugevaktsiiniviirus, erütrotsüütideks - 1%-line kanaerütrotsüütide suspensioon. Reaktsiooni võetakse antigeeni 4 hemaglutineerivat ühikut.

Seerumi lahjendused (1:10 - 1:1280) valmistatakse 0,25 ml hulgas, antigeeni lisatakse samuti 0,25 ml. Seerumilahjenduste ja antigeeni segu hoitakse 40 minuti vältel toatemperatuuri juures, pipeteeritakse juurde 0,5 ml erütrotsüütide suspensiooni ja hinnatakse katsetulemusi 30 minutit pärast erütrotsüütide lisamist. Tehniliselt teostatakse HAPR nii nagu gripi korral.

KSR-i puhul on antigeeniks vesi- ja mädavillikeste sisaldis, samuti nahakoorukeste ekstrakt, diagnostiliseks seeru-

miks aga rõugevaktsiiniviirusega immuniseeritud küülikute vereseerum.

Rõugeviiruse isoleerimine kanaembrüotel.

Rõugeviiruse isoleerimiseks uuritavast materjalist nakatatakse kanaembrüod koorionallantoisi kestale. Eelnevalt lisatakse uuritavale materjalile 200 - 400 ühikut penitsilliini ja 50 - 100 ühikut streptomütsiini 1 ml kohta. Katsesse võetakse 11 - 12 päeva vanused kanaembrüod, mida peale nakatamist inkubeeritakse 72 - 120 tunni vältel 34,5 - 35°C juures.

Kanaembrüote avamisel on rõugeviirusele iseloomulik valkjate teravapiiriliste täpikujuliste kollete esinemine koorionallantoisi kestal, mis muutuvad eriti hästi nähtavaiks peale kesta loputamist füsioloogilises keedusoolalahuses. Selliste kollete puudumisel valmistatakse koorionallantoisi kestast suspensioon füsioloogilises keedusoolalahuses, millega nakatatakse uued kanaembrüod. Negatiivne vastus antakse uuringule vaid peale kolmandat passaaži.

Hästi õnnestub rõugeviiruse isoleerimine lööbeelementide sisaldisest, nahakoorukestest ja kettudest. Verest õnnestub isoleerida rõugeviirust ainult esimestel haiguspäevadel ja sedagi tavaliselt vaid rasketel haigusjuhtudel. Vere uurimine on aga siiski suure tähtsusega, võimaldades diagnoosida haigust veel enne nahalööbe arenemist.

Bioloogilised meetodid.

Bioloogilistest meetoditest võib kasutada rõugete diagnoosimisel Pauli reaktsiooni. Peale sarvkesta skarifitseerimist tilgutatakse uuritavat materjali küülikule silma. 36 - 48 tunni pärast ilmnevad kriimustustel läbipaistvad ümmargused sõlmekesed, mille keskkohal hiljem toimub epiteelirakkude irdumine. Selle irdumise tulemusena võivad sõlmekestel tekkida kraaterikujulised süvendid.

Katsetulemused on eriti hästi nähtavad eemaldatud silma

kastmisel sublimaadi alkohoolsesse lahusesse ($HgCl_2$ 4,0 etüülalkoholi 30 ml, destilleeritud vett 60 ml): 1 - 2 minuti vältel muutuvad sõlmekesed kriitvalgeks, kahjustamata kude jääb aga läbipaistvaks.

Kui Pauli reaktsioon on negatiivne, võib silma sarvkestast tehtud histoloogilistes preparaatides otsida Guarnieri sulundkehakesi.

T ö ö ü l e s a n d e d :

1. Demonstratsiooni korras tutvuda gripihaigeilt võetud Pavlovski järgi värvitud rinotsütogrammidega.
2. Vastamisi naabriga valmistada rinotsütogrammid, värvida need Pavlovski järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
3. Gripi diagnoosiga haigelt võeti verd 2. haiguspäeval ja 18. päeval peale haigestumist. HAPR-i abil määrata haigestumise põhjustanud gripiviiruse tüüp.
4. Vastamisi naabriga võtta nina- ja kurgulima gripiviiruse isoleerimiseks.
5. Demonstratsiooni korras tutvuda gripiviiruse isoleerimisega kanaembrüotel.
6. Rõugevaktsiinist valmistatud preparaat värvida Morozovi järgi ja uurida mikroskoobiliselt.
7. Demonstratsiooni korras tutvuda rõugevaktsiiniviiruse poolt põhjustatud muutustega kanaembrüo koorionallantoisi kestal.

L i s a 1.

BAKTERITE SAMASTAMINE.

Meid ümbritsevas keskkonnas, nii õhus, maapinnas, vees jne. kui ka normaalselt inimorganismis esinevad väga mitmesugused mikroobiliigid samaaegselt. Mikroobide uurimiseks on vajalik isoleerida bakteriliikide puhaskultuurid. Selleks kasutatakse kõige sagedamini Kochi agarplaadimeetodit ja seedetraktis esinevate bakterite puhul laktoosindikaatorsöötmeid.

Kui on isoleeritud mikroobi puhaskultuur, siis tuleb see samastada, s. o. kindlaks määrata liik ja seega asukoht mikroorganismide üldises süsteemis, klassifikatsioonis. Varem tuntud liigi samastamist võib teostada ka lihtsustatud viisil, sest igapäevases laboratoorses uurimistöös on välja kujunenud kindlad süsteemid, mille alusel määratakse isoleeritud bakterikultuuril teatud iseloomulikud omadused ja nende järgi osutub juba võimalikuks vastava liigi samastamine. Kuid üldiselt toimub see ühesuguselt nii uue tundmatu mikroobi avastamise puhul kui ka varem tuntud liigi kindlakstegemisel. Uurimiseks kasutatakse bakteri noort kultuuri ja ka korduvate ümberkülvide järgi saadud kultuure paralleelselt.

Bakteri samastamiseks määratakse tema 1) morfoloogilised omadused, 2) füsioloogilised omadused, 3) biokeemiline aktiivsus, 4) väliskeskkonna tegurite toime bakterile, 5) antigeenne struktuur, 6) patogeensus ja toksilisus.

Bakteri morfoloogilisi omadusi määratakse mikroskoobilisel või elektronmikroskoobilisel uurimisel.

1. Morfoloogilised ja tinktoriaalsed omadused.

Bakteritel määratakse kõigepealt:

Kuju - kerasarnane, lühike või pikk pulgasarnane, niitjas, spiraalne.

Telg - sirge, kõverdunud.

Suurus - piki- ja ristiläbimõõt mikronites või millimikronites.

Küljed - paralleelsed, kumerad, nõgusad või ebakorrapärased.

Otsad - ümarad, järsult lõigatud, nõgusad või teritatud.

Asetus - üksikult, paarikaupa, neljakaupa, kuupjate pakkidena, ahelas, viinamarjakobara taoliselt, kimpudes või tähtede kujudena.

Kuju ebakorrapärasus - variatsioon kujus ja suuruses, kiulisus, paksenemised, okslikkus, pundumine jne.

Liikuvus - liikuv või liikumatu.

Viburid - monotricha, amphitricha, lophotricha, peritricha.

Endospoor - kerajas, ovaalne või ellipsoidne, ekvatoriaalne, subterminaalne, terminaalne, üks või mitu. Muutus batsilli kujus on või puudub eose asetuse kohal.

Kihn - olemas või puudub.

Värvumus - ühtlane, ebaühtlane, unipolaarne, bipolaarne, tilgasarnane, vöötjas; variatsioon värvumuse intensiivsuses, metakromaatiliste terade olemasolu; värvumine Grami ja Ziehl-Neelseni meetodi järgi.

2. Füsioloogilised omadused.

Bakteri füsioloogilised omadused määratakse bakterioloogilisel uurimisel kasvu järgi mitmesugustes kunstlikkudes söötmetes. Kõigepealt määratakse, kas bakter kasvab lihtsöötmetel või on kasvuks vajalikud valiksöötmed. Siis määratakse, missugustes tingimustes toimub kasv:

Kasvuks vajalik O_2 - aeroobne, fakultatiivne anaeroobne, rangelt anaeroobne, mikroaerofiilne.

Suurenenud CO_2 vajadus - vajalik enam kui 0,03% CO_2 kasvuks.

Temperatuur - kasvu piiralad, optimaalne kasvutemperatuur.

Pigment - määratakse kasvul 22°C juures või päraast kasvu 37°C lastakse seista kultuuri toatemperatuuris valguse käes.

a) Pesade kasv tahke söötme pinnal.

Kasvu järgi tahke söötme pinnal määratakse mikroobi pesadel:

Kuju - sõõrjas, ebakorrapärane, kiirjas, juurjas.
Suurus - millimeetrites.
Tõusang - lame, vähe või rohkem kumer, kuplitaoline, pinnal näsa või nabataoline sissetõmme, längus äärega või ilma.
Ehitus - amorfne, vähe, keskmiselt või tugevasti teraline, kiuline, kõverdunud lokitaoliselt kiuline.
Pind - sile, joonisega või mustriga; karе- peene, keskmise või jämeda teralisusega, sõõrjas, näsaline, tuhm või läikiv.
Ääris - ühtlane, laineline, uuristatud, niitjalt või loogeliselt kõverdunud kiuline.
Värvus - pinna valgustamisel ja läbivalgustusel; fluorestseeriv, sillerdav, opalestseeriv, ise-helendav.
Läbipaistvus - läbipaistev, läbinähtav, läbipaistmatu.
Tihedus - puderjas, veniv, rabe, kilejas.
Suspendeeruvus - kergesti või raskelt; ühtlane või teraline suspensioon.
Eristumine - eristunud kesk- ja ääreosaks.

b) Kasv joonkülvis tahke söötme pinnal.

Aste - vähene, mõõdukas või rikkalik.
Kuju - niitjas, laiuv, hargnev.
Tõusang - lame või tõusev.
Pind - sile; joonisega; kare, peenelt, mõõdukalt või jämedalt teraline; näsaline, kuiv või niiske.
Ääris - sile, laineline, sagarline, kiuline.
Värvus - tihedus, läbipaistvus määratakse nagu pesadel.
Lõhn - puuduv, määratav, sarnanev mingi aine lõhnale.
Sööde - värvunud, veeldatud, kristallide moodustumine.

c) Kasv pistekultuurina tahkes söötmes.

Siin määratakse kasvu aste nagu joonkülvilgi.

Kuju - nõeljas, pungunud, hargnenud või mitte.
Ulatus - sügavus, kuhu ulatub kasv söötmes.
Pind - kas on pinnal kasv või puudub, kui olemas, siis läbimõõt, pind ja ääris.
Värvus ja läbipaistvus määratakse nagu pesadelgi.
Veeldus - olemas või puudub; kui olemas kas kraaterikujuline, lehtrikujuline, kotikujuline või kihitatud.

d) Kasv vedelsöötmes.

Kasv vedelsöötmes määratakse tavaliselt lihapeptoonpuljongis.
Aste - puudub, vähene, mõõdukas või rikkalik.
Hägusus - olemas või puudub; kui olemas - vähene, mõõdukas või tihe; ühtlane, teraline, helbeline.
Sade - olemas või puudub; kui olemas, kas vähene, mõõdukas või rohke; pulbritaoline, teraline, helbeline, kilejas või veniv, kas homogeniseerub loksutamisel või mitte.
Pinna kasv - olemas või puudub; kas sõõrjas või kelmena pinnal; kelme õhuke või paks; sileda teralise või kareda pinnaga; kelme loksutamisel homogeniseerub või mitte.
Lõhn - - puudub, määratav, sarnanev mingi aine lõhnale.

3. Mikroobide biokeemiline aktiivsus.

Mikroobide biokeemilist aktiivsust määratakse sahharolüütiliste, proteolüütiliste ja lipolüütiliste ensüümide olemasolu kindlakstegemisega vastavates söötmetes ja eriliste testide kaasabil.

1) Sahharolüütiliste ensüümide olemasolu määratakse 1%-lises peptoonvees, millele on lisatud tavaliselt 1% süsivesikut, alkoholi või glükosiidi ja indikaatorina kas broomtümoolsinist või Andrade indikaatorit.

Nii määratakse mikroobide sahharolüütilised omadused järgmiste ainete suhtes: monosahhariididest - arabinoos, ramnoos, ksüloos, levuloos, galaktoos, riboos, mannoos, disahha-

riididest - laktoos, sahharoos, maltoos, trehaloos, melibioos, tsellobioos; trisahhariididest rafinoos ja meletsitoos; polüsahhariididest tärklis, inuliin, dekstriin, glükogeen; alkoholidest - glütseriin, erütriit, arabiit, adoniit, manniit, sorbiit, dultsiit, inosiit ja glükosiididest - salitsiin, eskuliin ja koniferiin.

Mikroobidel määratakse kasv piimas, täheldades sealjuures reaktsiooni muutust, kalgendust ja peptonisatsiooni.

Veel tuleb uurida kasvu lakmuspiimas, määrates reaktsiooni - muutuseta, happeline või aluseline - kalgend ühtlane või purustatud gaasist, peptonisatsioon.

Eriomaduste määramiseks kasutatakse metüülpunase testi, Voges-Proskaueri testi, tsitraattesti jne.

2) Proteolüütiliste omaduste määramiseks kasutatakse indooltesti, eralduva H_2S ja NH_3 määramist, želatiini veeldamist ja α -, β -, γ -hemolüüsi.

Siis määratakse veel nitraatide taandamist nitriteks, urea hüdrolüüsi, trimetüülamiinoksüüdi taandamist, katalaasi produktsiooni, värvide taandamist, nagu metüleensinise taandamist jne.

4. Resistentsus väliskeskkonna tegurite suhtes.

Mikroobi omaduste tundmaõppimisel määratakse tema resistentsus mitmesuguste väliskeskkonna tegurite suhtes, nagu temperatuuri, mitmesuguste desinfitseerivate ühendite ja antibiootiliste ja keemiliste ravipreparaatide suhtes. Määratakse kõigi nende väliskeskkonna tegurite bakteriostaatiline ja bakteritsiidne toime uuritava mikroobikultuuri suhtes.

5. Antigeenne ehitus.

Järgnevalt tuleb määrata mikroobiliigi antigeenne struktuur. Selleks valmistatakse immuunseerumid, süstides isoleeritud mikroobikultuuri korduvalt katseloomale. Nii saadakse seerumid, millega seroloogiliste reaktsioonide, nagu aglutinatsiooni, pretsipitatsiooni, komplemendi sidumise reaktsi-

ooni jne. rakendamisel määratakse mikroobi antigeenne ehitus. Monoretseptoorsete seerumite abil on võimalik kindlaks teha mikroobi koostises olevaid üksikuid antigeenseid komponente.

6. Mikroobide toksilisuse, virulentsuse ja patogeensuse määramine.

Mikroobi virulentsuse astme määravad: 1) makroorganismi vastuvõtlikkus, 2) nakatamise tee, 3) mikroobi füsioloogilised omadused. Mikroobi virulentsuse tunnused on: kihn, eksoja endotoksiinid, ekstratsellulaarsed fermendid, nagu hüaluronidaas, koagulaas, hemolüsiin, proteinaas jne.

Mikroobide toksiinide toime ja patogeensus määratakse bioloogilise meetodi abil. Selleks süstitakse katseloomadele mikroobi toksilisi produkte ja jälgitakse nende nii lokaalset kui ka üldist toimet katselooma organismis ja määratakse, missugune toksiini annus surmab katselooma.

Patogeensuse määramiseks nakatatakse vastava uuritava mikroobikultuuriga katseloomi, määrates, milline katseloom osutub kõige vastuvõtlikumaks ja missugused haigussümptoomid ilmnevad erinevatel nakatamisviisidel.

Kui kõik eelmainitud vajalikud omadused on mikroobil määratud, siis võib saadud tunnuste järgi süstematiseerida uuritava mikroobiliigi vastavate klassifikatsioonis olevate reeglipäraste jaotuste alusel vastava erialase käsiraamatu abil.

L i s a 2 .

MIKROORGANISMIDE KLASSIFIKATSIOON.

Vastavalt sellele, kuidas süstematiseeritakse taimi ja loomi, nii klassifitseeritakse ka kindlaksmääratud omadustega mikroorganisme, kasutades selleks binaarset nomenklatuuri 2 sõnast koosnevat nimetust.

Mikroorganismide klassifitseerimisel on aluseks taksonoomiline ühik, liik ehk species. Liigi kirjeldus peab hõlmama kõik mikroobi arengu ja muutlikkuse vormid. Iga liigi nimetus on tavaliselt 2 ladinakeelsest sõnast koosnev, näit. Bacillus subtilis. Esimene nimi on perekonnanimetus ja kirjutatakse suure algtähega. Perekonnanimetus on kas ladinakeelne, latiniseeritud kreekakeelne või latiniseeritud autori nimi. Liigi nimetuses teine sõna on juba liigile spetsiifiline lisand, mis iseloomustab liiki. Selleks võib olla omadussõna, oleviku kesksõna, nimisõna omastavas käändes või selgitav nimisõnaline täiend.

Järgnev süstemaatiline ühik on perekond ehk Genus, mis moodustub sugulasliikide rühmast, näit. Genus Bacillus.

Omadusilt lähedased perekonnad moodustavad sugukonna ehk Familia, mille nimi moodustatakse sinna kuuluva kõige tüüpilisema perekonna nimetusest järelliite - aceae abil, näit. Familia Bacillaceae.

Sugukonnad on ühendatud seltsiks ehk Ordoks, mille nimetust iseloomustab järelliide - ales, näit. Ordo Eubacteriales.

Seltsidest rühmitub klass ehk Classis, näit. bakterid kuuluvad kõik Classis Schizomycetes'esse.

Klassid on koondatud jaoks ehk Divisioks, mis omakorda kuulub riiki ehk Regnum'isse.

Peale nende tavaliste jaotuste on suuremate mikroobide rühmituste puhul kasutusel veel subfamilia, subordo, tribus, subtribus.

Bakterite liigitamine on esitatud vastavalt 1957.a. il-

munud käsiraamatus"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7-nda väljaande järgi.

Seente kohta on esitatud lühike süstemaatiline ülevaade 1958. a. ilmunud P. Frágneri "Parasitische Pilze beim Menschen" järgi. Mikrobioloogia seisukohast tähtsust omavate algloomade liigitus on tehtud 1926. a. ilmunud C. M. Wenyoni "Protozoology" järgi.

Regnum - Taimed.
Divisio I Protophyta
Classis I - Schizophyceae
Classis II - Schizomycetes
Classis III - Microtatobiotes
Divisio II - Tallophyta Algae Mycophyta
-"- III - Bryophyta
-"- IV - Pteridophyta
-"- V - Spermatophyta

Divisio I Protophyta
II CLASSIS SCHIZOMYCETES

Ordo	Familia	Genus
I. Pseudomonadales	Subordo: I. Rhodobacteriineae	
	I. Thiorhodaceae	I. Thiosarcina
		II. Thiopedia
		III. Thiocapsa
		IV. Thiodictyon
		V. Thiothece
		VI. Thiocystis
		VII. Lamprocystis
		VIII. Amoebobacter
		IX. Thiopolycoccus
		X. Thiospirillum
		XI. Rhabdomonas
		XII. Rhodothece
		XIII. Chromatium

Ordo	Familia	Genus
	II. Athiorhodaceae	I. Rhodopseudomonas
		II. Rhodospirillum
	III. Chlorobacteriaceae	I. Chlorobium
		II. Pelodictyon
		III. Clathrochloris
		IV. Chlorobacterium
		V. Chlorochromatium
		VI. Cylindrogloea
	Subordo: II. Pseudomonadinea	
	I. Nitrobacteraceae	I. Nitrosomonas
		II. Nitrosococcus
		III. Nitrosospira
		IV. Nitrosocystis
		V. Nitrosogloea
		VI. Nitrobacter
		VII. Nitrocystis
	II. Methanomonadaceae	I. Methanomonas
		II. Hydrogenomonas
		III. Carboxydomonas
	III. Thiobacteriaceae	I. Thiobacterium
		II. Macromonas
		III. Thiovulum
		IV. Thiospira
		V. Thiobacillus
	IV. Pseudomonadaceae	I. Pseudomonas
		II. Xanthomonas
		III. Acetobacter
		IV. Aeromonas
		V. Photobacterium
		VI. Azotomonas
		VII. Zymomonas
		VIII. Protaminobacter
		IX. Alginomonas
		X. Mycoplana

Ordo	Familia	Genus
		XI. Zoogloea
		XII. Halobacterium
	V. Caulobacteraceae	I. Caulobacter
		II. Gallionella
		III. Siderophacus
		IV. Nevskia
	VI. Siderocapsaceae	I. Siderocapsa
		II. Siderosphaera
		III. Sideronema
		IV. Ferribacterium
		V. Sideromonas
		VI. Naumanniella
		VII. Ochrobium
		VIII. Siderococcus
		IX. Siderobacter
		X. Ferrobacillus
	VII. Spirillaceae	I. Vibrio
		II. Desulfovibrio
		III. Methanobacterium
		IV. Cellvibrio
		V. Cellfalcicula
		VI. Microcyclus
		VII. Spirillum
		VIII. Paraspirillum
		IX. Selenomonas
		X. Myconostoc
II. Chlamydobacteriales	I. Chlamydobacteriaceae	I. Sphaerotilus
		II. Leptothrix
		III. Toxothrix
	II. Peloplocaceae	I. Peloploca
		II. Pelonema
	III. Crenotrichaceae	I. Crenothrix
		II. Phragmidiothrix
		III. Clonothrix

Ordo	Familia	Genus
III. Hyphomicrobiales	I. Hyphomicrobiaceae	I. Hyphomicrobium
		II. Rhodomicrobium
	II. Pasteuriaceae	I. Pasteuria
		II. Blastocaulis
IV. Eubacteriales	I. Azotobteraceae	I. Azotobacter
	II. Rhizobiaceae	I. Rhizobium
		II. Agrobacterium
		III. Chromobacterium
	III. Achromobacteraceae	I. Alcaligenes
		II. Achromobacter
		III. Flavobacterium
		IV. Agarbacterium
		V. Beneckea
	IV. Enterobacteriaceae	Tribus:
		I. Escherichieae
		I. Escherichia
		II. Aerobacter
		III. Klebsiella
		IV. Paracolobactrum
		V. Alginobacter
		Tribus:
		II. Erwinieae
		VI. Erwinia
		Tribus:
		III. Serratieae
		VII. Serratia
		Tribus:
		IV. Proteeae
		VIII. Proteus
		Tribus:
		V. Salmonelleae
		IX. Salmonella
		X. Shigella

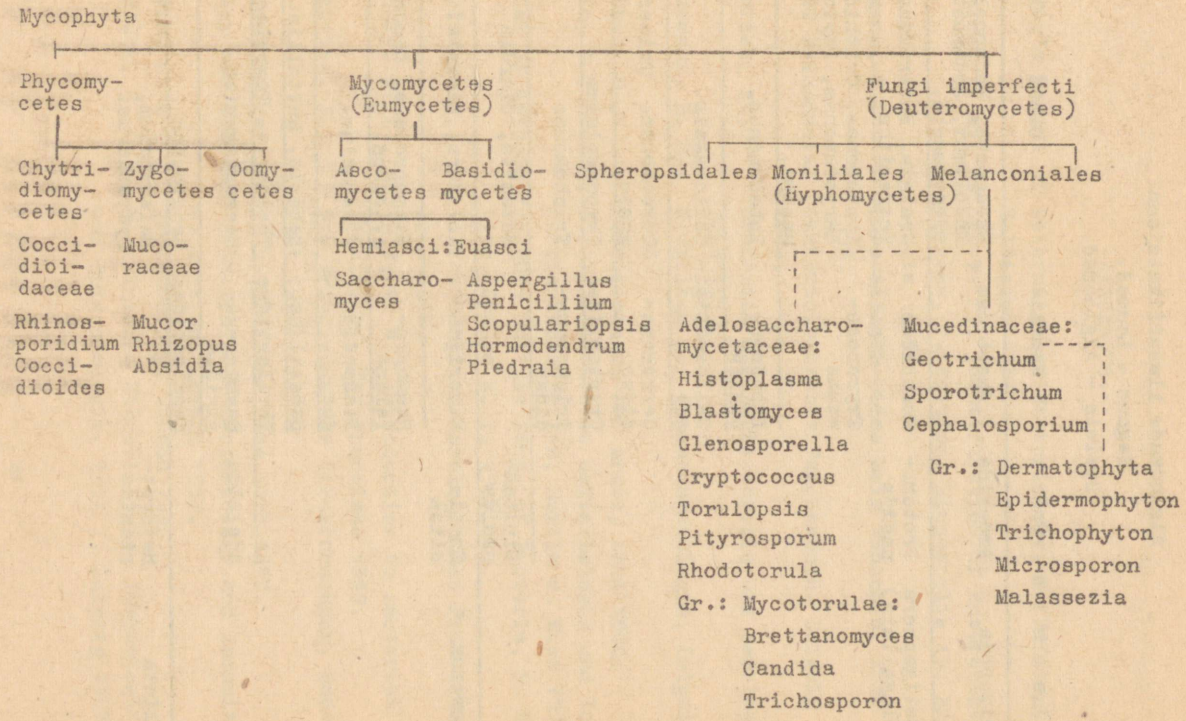
Ordo	Familia	Genus
	V. Brucellaceae	I. Pasteurella
		II. Bordetella
		III. Brucella
		IV. Haemophilus
		V. Actinobacillus
		VI. Calymmatobacterium
		VII. Moraxella
		VIII. Noguchia
	VI. Bacteroidaceae	I. Bacteroides
		II. Fusobacterium
		III. Dialister
		IV. Sphaerophorus
		V. Streptobacillus
	VII. Micrococcaceae	I. Micrococcus
		II. Staphylococcus
		III. Gaffkya
		IV. Sarcina
		V. Methanococcus
		VI. Peptococcus
	VIII. Neisseriaceae	I. Neisseria
		II. Veillonella
	IX. Brevibacteriaceae	I. Brevibacterium
		II. Kurthia
	X. Lactobacillaceae	Tribus:
		I. Streptococceae
		I. Diplococcus
		II. Streptococcus
		III. Pediococcus
		IV. Leuconostoc
		V. Peptostreptococcus
		Tribus:
		II. Lactobacilleae
		I. Lactobacillus
		II. Eubacterium
		III. Catenabacterium

Ordo	Familia	Genus
		IV. Ramibacterium
		V. Cillobacterium
	XI. Propionibacteriaceae	I. Propionibacterium
		II. Butyribacterium
		III. Zymobacterium
	XII. Corynebacteriaceae	I. Corynebacterium
		II. Listeria
		III. Erysipelothrix
		IV. Microbacterium
		V. Cellulomonas
		VI. Arthrobacter
	XIII. Bacillaceae	I. Bacillus
		II. Clostridium
V. Actinomycetales	I. Mycobacteriaceae	I. Mycobacterium
		II. Mycococcus
	II. Actinomycetaceae	I. Nocardia
		II. Actinomyces
	III. Streptomycetaceae	I. Streptomyces
		II. Micromonospora
		III. Thermoactinomyces
	IV. Actinoplanaceae	I. Actinoplanes
		II. Streptosporangium
VI. Caryophanales	I. Caryophanaceae	I. Caryophanon
		II. Lineola
		III. Simonsiella
	II. Oscillospiraceae	I. Oscillospira
	III. Arthromitaceae	I. Arthromitus
		II. Coleomitus
VII. Beggiatoales	I. Beggiatoaceae	I. Beggiatoa
		II. Thiospirillopsis
		III. Thioploca
		IV. Thiothrix
	II. Vitreoscillaceae	I. Vitreoscilla
		II. Bactoscilla
		III. Microscilla

Ordo	Familia	Genus
	III. Leucotrichaceae	I. Leucothrix
	IV. Achromatiaceae	I. Achromatium
VIII. Myxobacterales	I. Cytophagaceae	I. Cytophaga
	II. Archangiaceae	I. Archangium
		II. Stelangium
	III. Sorangiaceae	I. Sorangium
	IV. Polyangiaceae	I. Polyangium
		II. Synangium
		III. Podangium
		IV. Chondromyces
	V. Myxococcaceae	I. Myxococcus
		II. Chondrococcus
		III. Angiococcus
		IV. Sporocytophaga
IX. Spirochaetales	I. Spirochaetaceae	I. Spirochaeta
		II. Saprospira
		III. Cristispira
	II. Treponemataceae	I. Borrelia
		II. Treponema
		III. Leptospira
X. Mycoplasmatales	I. Mycoplasmataceae	I. Mycoplasma
Lisa II Classis, Schiromycetes juurde		A Caryococcus
		B Drepanospira
		C Holospora
		D Micrococcus batrachorum
		E Bacterium parapelomyxae
		F Cladothrix pelomyxae
		G Myxococcus pelomyxae

Classis	Ordo	Familia	Genus
III. Microtatobiotes	I. Rickettsiales	I. Rickettsiaceae	Tribus: I. Rickettsieae
			I. Rickettsia
			II. Coxiella
			Tribus: II. Ehrlichieae
			III. Ehrlichia
			IV. Cowdria
			V. Neorickettsia
			Tribus: III. Wolbachieae
			VI. Wolbachia
			VII. Symbiotes
			VIII. Rickettsiella
		II. Chlamydiaceae	I. Chlamydia
			II. Colesiota
			III. Ricolesia
			IV. Colettsia
			V. Miyagawanella
		III. Bartonellaceae	I. Bartonella
			II. Grahamella
			III. Haemobartonella
			IV. Eperythrozoon
		IV. Anaplasmataceae	I. Anaplasma
	II. Virales		

Seente klassifikatsiooni skeem.



Algloomade klassifikatsioon.

Regnum - Loomad.

Divisio - Algloomad.

Classis	Ordo	Familia	Genus
Rhizopoda	Amoebida	Amoebidae	Entamoeba, Endamoeba, Endolimax, Jodamoeba, Dientamoeba.
Mastigophora (Flagellata)	Protomonadida	Monadidae	Craigia, Enteromonas, Tetramitus.
		Trypanosomidae	Leptomonas, Crithidia. Herpetomonas, Phytomonas, Leishmania, Trypanosoma.
		Embadomonadidae	Embadomonas.
		Chilomastigidae	Chilomastix.
		Cercomonadidae	Cercomonas, Tricercomonas
		Cryptobiidae	Trypanoplasma
		Trichomonadidae	Trichomonas
	Diplomonadida		Hexamita, Giardia
Sporozoa	Coccidiida	Eimeriidae	Isospora, Eimeria.
		Haemoproteidae	Haemoproteus, Leucocytozoon.
		Plasmodiidae	Plasmodium.
		Babesiidae	Babesia, Nuttallia.
		Theileriidae	Theileria, Toxoplasma.
	Adeleida	Haemogregarinidae	Haemogregarina.
		Hepatozoidae	Hepatozoon
Ciliata	Heterotrichida		Balantidium, Nyctotherus.

KIRJANDUS.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Edition, Baltimore 1957.

Edwards, P. R., Ewing, W. H., Identification of Enterobacteriaceae, 2. Edition, Minneapolis 15, Minnesota 1957.

Fragner, P., Parasitische Pilze beim Menschen, Prag 1958.

Habs, H., Bakteriologisches Taschenbuch, Leipzig 1956.

Heinrich, H., Grundriss der Bakteriologie und Serologie, Jena 1959.

Hennemann, H. H., Praktikum der Immunohämatologie, Leipzig 1958.

Jirovec, O., Parasitologie für Ärzte, Jena 1960.

Kolle, W., Hetsch, H., Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten, Berlin u. Wien 1938.

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.

Sinkovics, J., Die Grundlagen der Virusforschung, Budapest 1956.

Zinsser Bacteriology, 11. Edition, New York 1957.

Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4. Edition, London 1957.

Wenyon, C. M., Protozoology, London 1926.

Wildführ, G., Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie, Teil I, Leipzig 1957.

Временные методические указания по эпидемиологии, клинике, диагностике и лечению токсоплазмоза, Министерство здравоохранения СССР, Москва, 1960.

Горбунова А. С. и Соколова М. И.. Руководство по лабораторной диагностике гриппа, парагриппозных и аденовирусных заболеваний, Москва, 1955.

Доссе Ж., Иммуногематология, Москва, 1959.

Здродовский П. Ф. и Голиневич Е. М., Учение о риккетсиях и риккетсиозах, Москва, 1953.

Жданов В. М., Определитель вирусов человека и животных, Москва, 1953.

Инструкция по лабораторной диагностике натуральной оспы, Министерство здравоохранения СССР, Москва, 1958.

Кауфман Ф., Семейство кишечных бактерий, Копенгаген, 1954, Москва, 1959.

Кашкин П. Н., Микробиология, Москва, 1958.

Козлов Ю. Л., Питательные среды в медицинской микробиологии, Москва, 1950.

Лебедева М. Н., Медицинская микробиология, Москва, 1960.

Лебедева М. Н., Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, Москва, 1955.

Пронин И. В., Пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, Томск, 1958.

Риверс Т., Вирусные и риккетсиозные инфекции человека, Москва, 1955.

Розанов Н. И., Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных, Москва, 1952.

Синай Г. Я. и Биргер О. Г., Микробиологические методы исследования при инфекционных заболеваниях, Москва, 1949.

Сборник важнейших официальных материалов по санитарным и противоэпидемическим вопросам, Книга третья, Москва, 1954.

Тец В. И., Санитарная микробиология, Ленинград, 1958.

Токаревич К. Н. и Васильева Л. Д., Серологические способы диагностики риккетсиозов, Методические указания ИЭМТ им. Пастера, Ленинград, 1960.

Томчик Я., Капсулы бактерий и их отношение к клеточной стенке. В кн. Анатомия бактерий, Москва, 1958.

Туманский В. М., Микробиология чумы, Москва, 1958.

Указания по лабораторной диагностике тифозно-паратифозных заболеваний /Салмонеллезов/, Министерство здравоохранения УССР, Днепропетровоск, 1960.

Шубладзе А. К. и Гайдамович С. Я., Краткий курс практической вирусологии, Москва, 1954.

Эндерс Д., Современное состояние техники тканевых культур, применяющихся при изучении вируса полиомиелита. В кн. Полиомиелит, Москва, 1957.

SISUKORD.

A. Lenzner — E e s s õ n a .

I p r a k t i k u m . PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS. (stafülo- ja streptokokid)... 4

II p r a k t i k u m . PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS. (pneumo-gono- ja meningokokid).13

III p r a k t i k u m . PATOGEENSETE KOKKIDE POOLT TEKITATUD HAIGUSPROTSESSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 25

IV p r a k t i k u m . KATKU, TULAREEMIA JA BRUTSELLOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS... 26

E. Tallmeister

V p r a k t i k u m . KÕHUTÜÜFUSE JA SALMONELLOOSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 49

VI p r a k t i k u m . KÕHUTÜÜFUSE JA SALMONELLOOSIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 63

VII p r a k t i k u m . SALMONELLOOSIDE, DÜSENTEERIA JA KOOLERA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 73

VIII p r a k t i k u m . SALMONELLOOSIDE JA DÜSENTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 91

IX p r a k t i k u m . DÜSENTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 94

X p r a k t i k u m . SIBERI KATKU JA GENUS HAEMOPHILUS'E NING GENUS KLEBSIELLA MIKROOBIDE PÕHJUSTATUD INFEKTSIOONIDE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 95

H. Jaakmees

XI p r a k t i k u m . GAASGANGREENI, TEETANUSE JA BOTULISMI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS.105

S. Laanes

XII praktikum. DIFTEERIA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 114

XIII praktikum. TUBERKULOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 124

XIV praktikum. TUBERKULOOSI JA LEEPRA MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 130

XV praktikum. DIFTEERIA JA TUBERKULOOSI MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 139

H. Jaakmees

XVI praktikum. PATOGEENSETE SEENTE JA SPIROHEETIDE POOLT PÕHJUSTATUD NAKKUSHAIGUSTE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 140

XVII praktikum. PATOGEENSETE ALGLOOMADE POOLT PÕHJUSTATUD NAKKUSHAIGUSTE JA TÄHNILISE TÜÜPUSE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 152

A. Lenzner

XVIII praktikum. VIIRUSLIKE NAKKUSHAIGUSTE MIKROBIOLOOGILINE DIAGNOOS 165

S. Laanes

Lisa 1. BAKTERITE SAMASTAMINE 186

Lisa 2. MIKROORGANISMIDE KLASSIFIKATSIOON 192

KIRJANDUS 203

Hind 39 kop.