**Перечень практических навыков**

1. Основные правила поведения в бактериологической лаборатории.
2. Правила забора материала для микробиологических исследований (кровь, гной, кал, моча, слизь из носоглотки, ликвор, мокрота).
3. Правила забора материала, хранения и транспортировки при ООИ.
4. Составить направление на микробиологическое исследование.
5. Дезинфекция в микробиологической лаборатории: рук, рабочего места, выделений больного, предметных и покровных стекол.
6. Стерилизация лабораторной посуды, подготовка к стерилизации.
7. Этапы приготовления мазка для иммерсионной микроскопии.
8. Основные правила микроскопии (микроскопия готовых препаратов).
9. Метод Грамма (назначение, основная окраска, протрава, обесцвечивающий фактор, дополнительная окраска; механизм).
10. Окраска по Циль-Нильсену (назначение, основная окраска, протрава, обесцвечивающий фактор, дополнительная окраска; механизм).
11. Окраска по Нейссеру (назначение, основная окраска, протрава, обесцвечивающий фактор, дополнительная окраска; механизм).
12. Методы определения подвижности бактерий (микроскопические и бактериологические).
13. Механические и биологические методы выделения чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных бактерий.
14. Метод Дригальского, назначение (1- 4 этапы).
15. Методы создания анаэробных условий (механические, физические, химические и биологический).
16. Этапы выделения чистых культур анаэробов ( 1 – 5)
17. Короткий «пестрый » ряд. Изменение короткого «пестрого» ряда при росте E.coli и S.typhi .

18. Идентификация бактерий посевом на триаду Хейберга.

19.Принципы определения каталазной и плазмокоагулазной активности бактерий .

20. Методы изучения протеолитической активности бактерий (реакции на индол, сероводород и др.)

1. Вирусологические методы. Заражение куриного эмбриона в аллантоисную полость. Цель. Этапы заражения.
2. РГА (реакция гемагглютинации). Назначение. Компоненты. Механизм.
3. Методы индикации и титрования бактериофагов по Грациа и Аппельману.
4. Реакции фаголизиса. Идентификация возбудителей дизентерии. Компоненты, механизм, учет реакции.

1. Реакция фаготипирования St. аureus. Назначение, ингредиенты, учет реакции.
2. ПЦР, принцип метода. Назначение, ингредиенты, достоинства.
3. Этапы получения рекомбинантных молекул (векторы, рестриктазы).
4. Определение антибиотикочуствительности бактерий методами «бумажных дисков» и серийных разведений.
5. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника.
6. Определение общего микробного числа воздуха по методам Коха и Кротова.
7. Определение фекального загрязнения воды по коли-индексу.
8. Заражение экспериментальных животных (биологический метод). Цель, принцип метода.
9. Методы выявления факторов вирулентности бактерий: адгезивности, капсулообразования, антигенов-ингибиторов фагоцитоза.
10. Методы выявления факторов патогенности ( токсигенности, альфа-, бета-, гамма-, энтеро- и тиолзависимых гемолизинов).
11. Методы выявления факторов вирулентности - ферментов агрессии бактерий: лизоцима, гиалуронидазы, лецитовителлазы и др.
12. Методы определения персистентных свойств бактерий: антилизоцимной, антикомплементарной и антиинтерфероновой активности.
13. РА на стекле. Назначение. Компоненты. Механизм. Учет реакции.
14. РА Вейгля (назначение, компоненты, механизм, недостатки, учет реакции).
15. РА Райта (назначение, компоненты, механизм, недостатки, учет реакции).
16. РА Видаля (назначение, компоненты, механизм, недостатки, учет реакции).
17. РПГА (определение напряженности поствакцинального протифодифтерийного антитоксического иммунитета). Компоненты. Механизм. Учет реакции.
18. РПГА (определение напряженности противоскарлатинозного

 антитоксического иммунитета). Компоненты. Механизм. Учет реакции.

1. РП по Асколи (назначение, компоненты, механизм, учет реакции).
2. РН токсина антитоксином по Оухтерлони (назначение, компоненты, механизм, недостатки, учет реакции).
3. РСК по Борде-Жангу (назначение, компоненты, механизм, учет реакции).
4. РСК Вассермана (назначение, компоненты, механизм, учет реакции).
5. РИТ - реакция иммобилизации бледной трепанемы. Назначение, ингредиенты, механизм, учет реакции.
6. Опсонофагоцитарная реакция. Серологическая диагностика бруцеллеза (in vitro). Компоненты. Механизм. Учет реакции.
7. РН на мышах с целью установления токсигенности Cl.Perfringens. Компоненты. Механизм. Учет реакции.
8. РН на мышах с целью идентификации вируса клещевого энцефалита. Компоненты. Механизм. Учет реакции.
9. РТГА (определение серотипа вируса гриппа А). Компоненты. Механизм. Учет реакции.
10. РИФ (экспресс-диагностика и серологическая диагностика гриппа А). Компоненты. Механизм. Учет реакции.
11. ИФА(конкурентный способ) определение HBs-АГ вируса гепатита В. Компоненты. Механизм. Учет реакции.
12. ИФА (непрямой способ),серологическая диагностика СПИДа Компоненты. Механизм.
13. Серологическая диагностика ВИЧ-инфекции с помощью реакции иммуноблотинга. Компоненты. Механизм Учет реакции.

**1)правила поведения в баклаюораториях**

1. В помещение лаборатории нельзя входить без специальной одежды: халата, тапочек, сменной обуви,
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, запрещается курить и приносить пищу.
3. При распаковывании заразного материала необходимо соблюдать осторожность: пробирки снаружи обтирать дезинфицирующим раствором: переливание жидкостей, содержащих патогенные микробы, производят над сосудом, содержащим дезинфицирующий раствор.
4. Если разбилась посуда. Содержащая заразный материал (пробирка, чашка Петри),  немедленно производится обеззараживание предметов, ©дежды, стола и помещения.
5. После окончания работы дезинфицируют руки и поверхность рабочего стола.
6. Музейные культуры микробов ставят на хранение в холодильник, закрывают и опечатывают.
7. Работники лаборатории подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных болезней, с возбудителями которых они работают. На кафедре микробиологии используются материалы, содержащие возбудителей III-IV групп, после разрешения председателя режимной комиссии Республиканской ГЭС.

**2) Правила забора материала для микробиологических исследования**

При заборе и работе с клиническим материалом персонал должен исполь­зовать перчатки и халат. Сроки доставки клинического материала в лаборато­рию должны быть сокращены до минимума.

**Кровь**для посева следует брать до начала антибактериальной терапии; на высоте подъема температуры; у постели больного с соблюдением правил асеп­тики. Посев производится в двойную и тиогликолевую среду в соотношении 1:10.

**Моча**для посева берется до начала антибактериальной терапии. Моча здо­рового человека стерильна. От начала взятия пробы мочи до начала исследова­ния в лаборатории должно проходить не более 1-2 часов.

**Гной**получают с помощью стерильного шприца или стерильного ватного тампона.

**Испражнения**на патогенные энтеробактерии берут ректальными петлями, смоченными консервантом, и помещают в пробирку с консервирующей средой.

**Слизь из носоглотки** (на дифтерию) забирают стерильным тампоном натощак. Тампон помещают в стерильную пробирку и доставляют в лабораторию не позже 2-3 часов с момента забора материала.

**Спинно-мозговую жидкость**получают в результате люмбальной пунк­ции. 3-5 мл ликвора помещают в пробирку (при транспортировке предохранять от охлаждения).

**Мокроту**собирают натощак после ополаскивания рта в стерильную посуду

**3)Правила забора материала, хранения и транспортировке при ООИ**

К особо опасным инфекциям прежде всего относится чума. При постанов­ке предварительного диагноза «чума» в лаборатории проводятся срочные мероприятия:

1.  Немедленно сообщают 8 вышестоящие органы здравоохранения,

2.  На лабораторию накладывается карантин, т.е. ни один лабораторный работник, контактировавший с заразным материалом, не должен покидать поме­щения лаборатории до прибытия эпидемиолога.

3.  Все материалы: от больных, чистые культуры и павшие животные долж­ны быть направлены в специализированные лаборатории для окончательного  установления диагноза.

**Меры безопасности при транспортировке**

Материал помещают в банки с плотно закрывающейся пробкой, обвязы­вают пергаментом(т.е. водонепроницаемым материалом), затем обвертывают салфетками, смоченными 5% раствором лизола или фенола. В таком виде банки с материалом помещают в металлические биксы. На банки с материалом на­клеивают этикетки. Все надписи на этикетке делают простым графитным ка­рандашом, г.к. надписи чернилами смываются при дезинфекционной обработ­ке.

4. После отправки материала проводят заключительную дезинфекцию.

Культуру автоклавируют при температуре 120 ЯС в течение 1 часа.

Стеклянную лабораторную посуду обеззараживают в 3% растворе хлора­мина или карболовой кислоты 1 сутки, а затем кипятят в 1% растворе бикарбо­ната натрия.

Трупы животных автоклавируют, заливают 10% раствором лизола на сутки и закалывают в специально вырытую яму.

Кожу открытых частей тела обрабатывают 70% раствором спирта.

**4)составить направление на мб исследование**

Направление на исследование является сопроводительным документом, который прилагается к инфекционному материалу, предназначенному для лабораторных исследовании.

**Составляется  по следующей форме:**

1.  название материала

2.  учреждение, направляющее материал

3. фамилия, имя отчество больного

4. возраст

5. адрес больного

6. дата заболевания

7. дата взятия материала

8. предполагаемый клинический диагноз

9. подпись врача, направляющего материал

Поступивший в лабораторию инфекционный материал  регистрируется в специальном журнале.

**5)Дезинфекция в микробиологической лаборатории**

**Дезинфекция**- это обеззараживание объектов окружающей среды с по­мощью химических веществ, обладающих антимикробным действием.

**Цель дезинфекции**- предупредить передачу возбудителей от инфициро­ванного организма неинфицированному.

В микробиологический лаборатории **используют**:

1. хлорную известь (0,1 — 10% раствор);

2.  хлорамин (0.5 -5% раствор), для дезинфекции рук 0,25 — 0,5% раствор, для дезинфекции предметов ухода за больными при кишечных и воздушно-капельных инфекциях 1-3% раствор, при туберкулезе — 5% раствор;

3.  фенол (карболовая кислота) в виде 3 — 5% раствора для дезинфекции по­мещений;

4.  лизол (3 — 5% раствор);

5.  биглюконатхлоргексидина (гибитан), для дезинфекции рук 0,5% рас­твор, для дезинфекции помещений 0,1% раствор;

6.  дихлорид ртути (сулема) — иногда используют для дезинфекции предме­те ухода за больными. Препарат высокотоксичен, всасывается через кожу.

**6)Подготовка посуды к стерилизации**

В бактериологических и вирусологических лабораториях используют обычную лабораторную посуду: цилиндры, колбы, склянки для растворения и хранения реактивов, химические пробирки. Помимо этого используют специ­альную посуду:

**Пробирки**

• биологические- с крупным дном, неразвернутым краем;

• центрифужные- сужены книзу, конической формы;

• преципитацию иные- очень узкие с внутренним диаметром 2-3 мм **Стеклянные чашки**Петри для выращивания микроорганизмов на плотных питательных средах. Их изготавливают из прозрачного стекла, не имеюще­го камней, пузырей. Высота чашки 20-30 мм, диаметр 60-200 мм

**Пипетки**

• градуированные должны соответствовать параметрам ГОСТа

• пастеровские-  стеклянные трубки диаметром 5-7 мм, у которых один конец оттянут над пламенем горелки в виде капилляра

Специальная лабораторная посуда должна быть чистой и стерильной. Мытье производят ершами с мылом и содой. Новую посуду следует до мытья прокипятить в 1-2% растворе хлористоводородной кислоты. Сушат посуду в су­шильном шкафу

Сухую посуду закрывают и помещают в пеналы. В пробирки вставляют ватные пробки и заворачивают в пачки по 5-10 штук. К чашкам Петри подбирают крышки и завертывают по одной или несколько штук. Пипетки закрывают ваткой с того конца, который берут в руки. Готовые пипетки заворачивают в бумагу и укладывают в пеналы. Стерилизация проводится в сухожаровом шкафу при температуре 180°С в течение 1 часа.

**7)Этапы приготовления мазка**

Для приготовления мазка необходимо иметь:

•     Чистое обезжиренное предметное стекло.
•     Бактериологическую петлю
•     Культуру, выращенную на плотной питательной среде — агаре, или жидкой среде — бульоне.
•     Спиртовку.
•     Набор красок.

1. Обезжиренное предметное стекло и бактериологическую петлю прожигают в пламени горелки. Пробирку с изучаемой культурой держат  между указательным и большим пальцами левой руки. Петлю берут правой рукой, мизинцем правой руки прижимают пробку пробирки к ладони.

Если мазок готовится с жидкой питательной среды, то каплю культуры на­носят петлей на предметное стекло.

Если мазок делают из культуры с агара, то петлю с культурой вносят на предметное стекло и добавляют каплю физиологического раствора, в котором эмульгируют внесенный материал.

Петлю обжигают в пламени горелки. Мазок должен быть тонким, рав­номерно растертым, округлой формы, размером 1,5-2 см.

2. Высушивание мазка производится при комнатной температуре.

3.  Фиксация мазка производится с целью:

• Убить микробные клетки.
• Обеспечить лучшее прилипание микробов к предметному стеклу.
• Облегчить дальнейшее окрашивание.

Фиксация мазка в пламени горелки производится 3-кратно, действие пла­мени должно длиться 2 секунды.

Для более нежной фиксации мазков крови, спирохет и простейших использующих химические фиксаторы:

•     Метиловый спирт в течении 5-и минут.
•     Этиловый спирт (96°) в течении 10-и минут.
•     Смесь Никифорова — в течении 10-15 минут.
•     Ацетон — в течении 5-и минут.
•   Пары формалина — в течении нескольких секунд.

4. Окраска препаратов проводится:

•     Простыми методами (водным фуксином Пфейффера, метиленовой синькой Леффлера), когда окрашивается вся клетка и используется только один краситель;
•    Сложными методам, когда определяются клеточные структуры,

После экспозиции мазок промывают водой, высушивают фильтроваль­ной бумагой и микроскопируют под иммерсией.

**8)Основные правила микроскопии (микроскопия готовых препаратов)**

Световой микроскоп — это обязательная принадлежность любой микробиологической лаборатории.  Разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм. Общее увеличение микроскопа определяется произведением объекта на увеличение окуляра.

Микроскопия с сухими объективами дает увеличение в 120-600 раз. Не­достаток: часть лучей отклоняется в сторону и не достигается

хорошее освещение изучаемого объекта. Иммерсионные объективы — это объективы, которые погружают в жидкости (кедровое масло, персиковое мас­ло). Поскольку показатели преломления стекла и иммерсионного масла практи­чески одинаковы 1,52 , сохраняется четкость и ясность поля зрения. Полезное увеличение микроскопа достигает 2000 раз. Современный микроскоп — это точ­ный оптический прибор, поэтому необходимо строго соблюдать ряд правил при работе с ним:

1) использовать правильное освещение;

2) хранить закрытым от пыли;

3) для чистки оптических частей применять кисточку или мягкую ткань, смоченную водой или спиртом. Раз в год микроскоп должен просматривать мастер-оптик.

**9)метод грамма**

Метод Грама введен в 1884 году датским микробиологом Гансом ХристианомГрамом и является важным таксономическим признаком.

К грамположительным бактериям относятся те, у которых комплекс, образуемый генцианвиолетом и йодом, удерживается при обработке спиртом.

Грамотрицательными называют те бактерии, которые не обладают свойством удерживать комплекс и обесцвечиваются при обработке спиртом.

Способность или неспособность клеток удерживать комплекс генцианвеолета с йодом связывают с различным составом и структурой клеточной стенки бактерий.

Методика окраски.

1 .На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу, пропитанную генцианвиолетом и наносят каплю воды на 2 минуты. Генцианвиолет основная краска.

2. Бумагу сбрасывают и, не промывая водой, наливают раствор Люголя на 1 минуту. Раствор Люголя протрава: усиливает действие основной краски у грамположительных бактерий.

3. Препарат обесцвечивают 3-5 каплями спирта в течение ЗОсекунд до прекращения отхождения фиолетовых струек краски. Спирт обесцвечивающий фактор.

4. Промывают водой.

5. Докрашивают водным фуксином Пфейффера в течение 1-2 минут. Водный фуксин дополнительная краска. Грамположитель-ные бактерии (кокки) сине-фиолетового цвета, грамотрицательные (палочковидные формы) розового цвета.

6. Промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсией.

**10) Метод Циль-Нильсена**

Метод используется для окраски спор и кислотоустойчивых бактерий (микобактерии туберкулеза). Кислотоустойчивость связана с наличием в клеточной стенке мяколовых кислот. Метод Циль-Нильсена основан на использовании концентрированных красителей прогревания.

**Методика окраски:**

|  |  |
| --- | --- |
| 1. На фиксированный мазок накладывают белую фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля. Препарат 2-3 раза подогревают в в пламени до появления паров. | Карболовый фуксин-основная краска; прогревание-протрава. |
| 2. Препарат промывают водой, бумагу сбрасывают. |  |
| 3. Препарат обесцвечивают в 5% растворе серной кислоты. | Серная кислота-обесцвечивающий фактор. |
| 4. Промывают водой |  |
| 5. Докрашивают синькой Леффлера 3-5 минут | Синька Леффлера — дополнительная краска |
| 6. Промывают водой, высушивают, смотрят под иммерсией | Кислотоустойчивые бактерии и споры рубиново- красного цвета, а остальная микрофлора — синего цвета |
|  |  |

**11)Окраска по Нейссеру(определение зерен волютина)**

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синей 4 мин, затем сливают краску.
2. Промывают водой и наливают ***раствор Люголя*** на 20-30 сек.
3. Не промывая водой, окрашивают везувином 1-3 мин.
4. Промывают водой, высушивают.

**NB!***Тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет,****зерна волютина****- в темно-синий, почти черный цвет.*

**12)Определение подвижности микроорганизмов методом «раздавленной капли»**

Жгутики являются органами движения бактерий, состоят из белка флагеллина. По количеству и характеру расположения жгутиков различают бактерии, монотрихи, лофотрихи, амфитрихи и перитрихи. Жгутики обладают антиген­ными свойствами (Н-антиген) и дают возможность бактериям перемешаться вжидкой среде.

О наличии жгутиков можно судить по характеру движения бактерий в «раздавленной» и «висящей» каплях при опущенном конденсоре и частично прикрытойдиафрагме микроскопа.

**Метод «раздавленной капли»**

Культуру в изотоническом растворе хлорида натрия наносят на предмет­ное стекло и сверху накладывают покровное. Капля материала должна быть та­кой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклом и не выступала за пределы покровного. Препарат рас­сматривают с иммерсионной системой и слегка опущенным конденсором.

**Метод «висячей капли»**

Необходимо иметь предметное стекло с лупочкой. Каплю культуры нано­сят на покровное стекло, сверху накладывают предметное стекло с лупочкой посредине, края которого предварительно обмазаны вазелином. Затем предмет­ное стекло слегка прижимают к покровному, и препарат переворачивают по­кровным стеклом кверху. Получается герметично закрытая камера, в которой капля долго не высыхает.

**13)Выделение чистой культуры микробов(механические и биологические)**

Чистая культура — это популяция микроорганизмов одного вида. Для выделения чистой культуры аэробов используют методы, основанные на:

* Механическом разобщении бактериальных клеток
	+ Метод Дригальского - распределение капли суспензии материала с
* помощью шпателя;
	+ Рассев штрихом;
	+ Метод Коха является количественным и позволяет определить
* количество бактерий в исследуемом материале
* Биологические методы:
	+ Посев на элективные среды;
	+ Метод Шукевича - посев материала в конденсат скошенного МПА для
* выделения чистых культур бактерий, обладающих ползучим ростом
* (например, протей);
	+ Обработка кислотами и щелочами (например, микобактерии
* туберкулеза);
	+ Прогревание при 80°С для выделения споровых форм;
	+ Заражение лабораторных животных - для диагностики зоонозов и др.
* (туляремия).

Выделение чистой культуры микробов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Метод механического разъединения микроорганизмов, находящихся в исследуемом материале, с целью получения изолированных колоний на поверхности или в глубине питательной среды. Очень широко применяются элективные питательные среды.

При выделении чистой культуры патогенных микробов из патологического материала, загрязненного посторонней микрофлорой, прибегают иногда к заражению лабораторных животных, восприимчивых к тому виду микроба, который предполагается выделить из исследуемого материала. Биологический метод выделения чистой культуры применяется при исследовании мокроты на содержание в ней пневмококков, микобактерий туберкулеза. Получение чистой культуры методом рассева в глубине среды (по Коху). Три пробирки, содержащие по 15 мл мясо-пептонногоагара, ставят в водяную баню для расплавления агара. Расплавленную среду остужают до температуры 43— 45 °С. В пробирку вносят одну бактериальную петлю исследуемого материала. После этого прокаленной и остуженной; петлей содержимое 1-й пробирки переносят во 2-ю и таким же образом из 2-й в 3-ю. Приготовленные разведения микробов выливают из пробирок в стерильные чашки Петри, обозначенные номерами, соответствующими номерам пробирок. После застудневания среды с исследуемым материалом чашки помещают в термостат. Количество колоний в чашках с питательной средой уменьшается по мере разведения материала.

**14)метод дригальского**

Метод Дригальского основан на механическом разобщении на поверхности плотной, питательной среды микробов всех видов, входящих в состав исследуемого материала.

I этап.

1. Определение микробного состава исследуемого материала (приготовление

мазка\* окраска по Граму). v

2. Посев на чашку Петри: одну каплю материала наносят на поверхность

МПА и растирают шпателем. Не обжигая шпателя и не набирая нового

материала, засевают вторую и третью чашки.

3. Засеянные чашки переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате

18-20 часов при температуре 37°С.

II этап.

1. Макроскопическое изучение колоний по величине, форме, окраске,

характеру поверхности, краев, консистенции. .

2. Микроскопическое изучение одной исследуемой колонии (приготовление

мазка, окраска по Граму).

3. Оставшуюся часть колонии пересевают в пробирку со скошенным агаром.

4. Пробирку инкубируют в термостате 18-20 часов при температуре 37°С.

III этап.

Проверка культуры на чистоту (макроскопическим - однородный рост, микроскопическим — однородные по морфологическим признакам и тинкториальным признаками клетки).

IV этап.

Идентификация проводится по:

- ферментативным свойствам.

- антигенным свойствам, токсигенности и другим признакам

- фагочувствительности

**15)Методы культивирования анаэробов(создание анаэробных условий)**

Сущность условий, необходимых для культивирования анаэробов, заклю­чается в снижении парциального давления молекулярного кислорода.

**Механические методы:**

1. Посев уколом в столбик сахарногоагара.

2. Метод Виньял-Вейона: в расплавленный и остуженный до 50° Сагар вносят исследуемую анаэробную культуру, перемешивают и засасывают в пас­теровскую пипетку, конец которой запаивают. Через 24 — 48 часов столбике агара вырастают ясно видимые колонии микробов — анаэробов.

3. Метод Перетца. Исследуемый материал вносят в 3 пробирки с физиоло­гическим раствором, а затем в 3 пробирки с остуженным до 50° С МПА. Со­держимое пробирок перемешивают и выливают в 3 стерильные чашки Петри, на дно которых предварительно кладут стерильное предметное стекло, через 18-20 часов инкубации в термостате под пластинками стекла вырастают ана­эробы.

**Физические методы:**

1. Анаэростат — создание вакуумных условий.

2. Аппарат Киппа — замена воздуха индифферентным газом (водородом).

3. Среда Китт-Тароцци — содержит кусочки печени, обладающие высокой адсорбционной способностью, 0.5% глюкозы. Перед посевом среду кипя­тят на водяной бане не менее 15 минут, сверху заливают слоем вазелиного мас­ла, чтобы предохранить посев от проникновения кислорода,

**Химические методы**

1.  Прибор Омелянского — для поглощения кислорода используется пиро­галлол.

2.  Среда Вильсон — Блера. Содержит глюкозу, сернисто-кислый натрий, хлорид железа. Анаэробы образуют черные колонии за счет восстановления сернисто-кислого натрия в сернистый натрий, который, соединяясь с хлоридом железа, образуют осадок черного цвета -сернистое железо.

**Биологический метод Фортнера**

Чашку Петри с толстым слоем агараделят на 2 половины на одну полови­ну засевают облигатный аэроб — «чудесную» палочку, на другую половину чашки засевают исследуемую анаэробную культуру. Чашку заливают растоп­ленным парафином. Через 24 — 48 часов в чашке вырастают аэробы, затем, ко­гда запас кислорода исчерпывается, начинают размножаться анаэробы.

**16)Выделение чистой культуры анаэробов**

I этап — обогащение на среде Китт-Тароцци, предварительно прокипяченной

в течение 30 минут. После посева среду прогревают 15 минут при 80°С для

уничтожения вегетативных форм, споры анаэробов при этом сохраняются.

II этап - получение изолированных колоний. На среде Китт-Тароцци

обнаруживается помутнение с пузырьками газа.

Ш этап - выделение чистой культуры проводится по одному из следующих

методов:

А) По Цейсслеру - каплю материала со среды Китт-Тароцци засевают в

чашку с кровяным агаром и распределяют материал шпателем, этим же

шпателем производят посев во второй и третьей чашках;

Б) По Вейнбергу - каплю материала со среды Китт-Тароцци переносят в

растопленный и слегка остуженный сахарный агар, затем набирают в трубки

Веньял-Вейона и инкубируют в термостате.

IV и V этапы - идентификация в реакции нейтрализации на белых мышах.

**17) Короткий «пестрый ряд». Рост E.coli и S.typhi.**

Короткий пестрый ряд используется для изучения биохимических свойств возбудителей пищевых токсикоинфекций и определения рода бактерий.

Короткий пестрый ряд представляет собой набор сред разлитых в пробирки, скошенный МПА, бульон Хоттингера, МПЖ, среды Гисса с сахарами (лактоза, глюкоза, сахароза и маннит). В бульон Хоттингера под пробку помещают ин­дикаторную бумажку, пропитанную уксуснокислым свинцом (для определения сероводорода), а в среду Гисса с глюкозой помещают газовичок для определе­ния углекислого газа.

Методика посева:

Посев на среды короткого пестрого ряда проводят взвесью мик­робных клеток. Для посева на скошеннный МПА бактериологическую петлю прожигают, остужают, опус­кают во взвесь бактерий и делают посев штрихом на скосе. На все остальные среды посев делают при помощи пастеровской пипетки. Запаянный конец стерильной пастеровской пипетки обламывают над пламенем газовой горелки, после чего пипетку заполняют взвесью микробных клеток. Пробирку со средой осторожно приоткрывают над пламенем газовой горелки и капают в нее каплю взвеси, после чего пробирку быстро закрывают. После посева конец пастеров­скую пипетки запаивают над пламенем газовой горелке, а саму пипетку поме­щают в емкость с дезинфекционным раствором. Штатив со средой короткого пестрого ряда помещают на 24 часа в термостат с температурой 37°С.

**18) Идентификация бактерий посевом на триаду Хейберга**

Определение у культур ферментативной группы Хейберга-Смита по результатам разложения сахарозы, маннозы, арабинозы.

 По отношению к трем углеводам- сахарозе, маннозе и арабинозе все вибрионы делятся на 8 групп (по Хейбергу). Биовары cholerae и eltor относятся к I группе Хейберга: расщепляют до кислоты без газа сахарозу и маннозу и не расщепляют арабинозу.

**19)принципы определения каталазной и плазмокоагулазной активности**

Ферменты, относящиеся к факторам патогенности

А)Тест на каталазную активность

Каталазная активность свойственна большинству патогенных аэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют.

Каталаза разлагает перекись водорода с образованием кислорода:

Для выявления каталазной активности наносят каплю 10%-ного раствора

пероксида на колонию или суспензию клеток. Выделение O , хорошо заметное по

 2

образованию пузырьков газа, свидетельствует о продукции штаммами каталазы.

Определение плазмокоагулазной активности

Б)Плазмокоагулазную активность изучают, используя сухую цитратную кроличью плазму или плазму крови, взятую из сердца. Перед исследованием сухую плазму разводят 1:5 0,9%-ным раствором хлорида натрия, затем 0,5 мл разведенной плазмы вносят в стерильную пробирку и в ней суспендируют одну петлю 18 - 20-часовой агаровой культуры. Пробирки помещают в термостат при (37 +/- 1) °С и через 1, 2, 3, 18 и 24 ч проверяют наличие свертывания плазмы. Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы. В качестве контроля ставят реакцию со стафилококком, обладающим и не обладающим плазмокоагулазой. Одновременно у испытуемого штамма можно установить наличие фибринолитической активности.

**20) методы изучения протеолитич. Акт. Бактерий(р. На индол, сероводород и др.)**

Протеолитическая активность – это способность микроорганизмов расщеплять белки с образованием различных продуктов (H2S, NH3, индола и т.д.). Изучение этих свойств применяется для идентификации бактерий.

2. Протеолитические свойства бактерий изучают:

а) по способности разжижать желатин: делают посев изучаемой культуры бактерий уколом в столбик мясопептонного желатина (МПБ + 10-20 % желатина) и оставляют при комнатной температуре (20-22° С) на несколько дней. Через 3-5-10 дней просматривают посевы и отмечают форму разжижения желатина, характерную для различных видов микробов. Разжижать желатин способны микробы, выделяющие фермент типа ***коллагеназы***;

б) по конечным продуктам распада белков: делают посев на МПБ и выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение 2-3 дней; для определения продуктов распада белков (индола, аммиака, сероводорода) используют специальные индикаторные бумажки, которые помещают между горлышком и ватной пробкой в пробирку с МПБ.

Индол обнаруживают по способу Мореля, для чего используют индикаторную бумажку, смоченную насыщенным раствором щавелевой кислоты, которая розовеет при образовании индола. Для обнаружения аммиака используют лакмусовую бумажку, в присутствии которого она синеет. Для обнаружения H2S используют полоску фильтровальной бумаги, смоченную уксуснокислым свинцом, которая чернеет в присутствии H2S.

**18) Заражение куриного эмбриона(вирусологич. Метод)**

Куриный эмбрион используется для культивирования вирусов, микоплазм. Используют эмбрионы в возрасте 8-14 дней в зависимости от вида вируса и способа заражения: на хорион-аллантоисную оболочку, в аллантоисную и амниотическую полость, в желточный мешок. Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона в овоскопе и отмечают карандашом на скорлупе границы воздушного мешка. Заражение куриных эмбрионов производят в боксе в строго асептических условиях, пользуясь инструментом, стерилизованным кипячением.

1этап

Скорлупу над воздушным пространством протирают спиртом, обжигают в пламени, смазывают 2% раствором йода, снова протирают спиртом и обжигают. Вирусный материал в количестве 0,05 - 0,2 мл наносят на хорион-аллантоисную оболочку туберкулиновым шприцом или пастеровской пипеткой.

II этап

Вскрытие эмбрионов проводят через 48-72 часа инкубации в термостате. Наличие вируса в хорион-аллантоисной оболочке определяют:

1. по белесоватым непрозрачным пятнам разной формы;

2. в реакции гемагглютинации.

**19)РГА**

Реакция гемагглютинации- это один из методов индикации вирусов. Ставится двумя методами:

1) капельным на стекле;

2) в пробирках - развернутая реакция.

**Компоненты:**

1) исследуемый материал: аллантоисная жидкость, суспензия

хорионаллантоисной оболочки куриного эмбриона, экстракт из

культуры клеток, зараженных вирусом;

2) 5% взвесь куриных эритроцитов;

3) физиологический раствор.

На чистое обезжиренное стекло наносят 1 каплю взвеси эритроцитов и 1 каплю исследуемого материала.

При «+» результате - хлопья агглютинации эритроцитов**.**

**20)методы индикации и титрования бактериофагов по грация и аппельману**

А. Выделение бактериофага проводят по следующему алгоритму.
1. Материал, их которого выделяется бактериофаг (объект внешней среды или бактериальная культура), фильтруют через бактериальный фильтр.
2. Фильтрат помещают в жидкую питательную среду, куда засевают чувствительную к выделяемому фагу бактериальную культуру.
3. После термостатирования проводят учет опыта.
а. Рост бактерии свидетельствует об отсутствии в исследуемом материале искомого бактериофага.
б. Отсутствие роста бактерий свидетельствует, что искомый бактериофаг в исследуемом материале присутствует.
Б. Титрование бактериофага проводят или по методу Аппельмана или по методу Грациа.
1. Титрованием фага по Аппельману можно определить концентрацию бактериофага в единице объема с точностью до порядка. Для этого используется жидкая питательная среда.
а. Фагосодержащий материал десятикратно разводится («титруется») в жидкой питательной среде.
б. Каждое разведение засевается чувствительной к данному фагу бактериальной культурой.
в. Посевы инкубируются в термостате.
г. Последнее разведение фагосодержащего материала, в котором не будет роста – это и есть титр бактериофага.
2. Титрованием фага по Грациа можно определить концентрацию бактериофага в единице объема с точностью до одной фаговой корпускулы.
а. Фагосодержащий материал десятикратно разводится («титруется») в полужидкой питательной среде.
б. К каждому разведению добавляется чувствительная культура с таким расчетом, чтобы в отсутствие бактериофага получился рост в виде газона.
в. Каждое разведение фагосодержащего материала в полужидкой среде с добавлением чувствительной культуры заливается в чашку Петри на слой плотной питательной среды, используемой в роли под-ложки.
г. Посевы инкубируются в термостате.
д. Низкие разведения бактериофага полностью лизируют бактерии и роста не наблюдается. По мере разведения фага появляются отдельные изолированные бляшки, каждая из которых – результат репликации одной фаговой корпускулы. Для подсчета титра бактериофага следует количество бляшек умножить на то разведение, в котором эти бляшки подсчитаны.

**21)реакция фаголизиса**

Реакция фаголизиса ставится для идентификации возбудителя дизентерии.

Постановка реакции:

1) чистая культура шигелл на скошенномагаре;

2) 2 пробирки с МПБ - «опыт» и «контроль»;

3) дизентерийный бактериофаг

На I этапе:

1) Проверка культуры шигелл на чистоту (окраска по Граму);

2) Посев в 2 пробирки с МПБ

3) В пробирку «опыт» добавить 2 капли (0,1 мл) дизентерийного

бактериофага;

4) Посевы инкубировать в термостате 18-20 часов при темпратуре 37°С

На II этапе:

1) Регистрация результатов посева

В пробирке «контроль» имеется равномерное помутнение МПБ, т.к. культура шигелл оказалась жизнеспособной. В пробирке «опыт» МПБ прозрачный, т.е. дизентерийный бактериофаг вызвал лизис одноименной культуры бактерий.

**22) Определение фаготипа**

Определение фаготипа проводится с помощью специальных наборов типовых фагов и является одним из методов внутривидовой дифференциации бактерий. Цели фаготипиривания:

1. Помощь эпидемиологу в выявлении источников и путей

циркуляции инфекции при внутрибольничном

заражении;

2. Для идентификации микроба.

Определение фаготипа стафилококка проводят при помощи фагов, разведенных до тест- разведения, обозначенного на этикетке. Каплю 4-х часовой бульонной культуры распределяют на поверхности подсушенного агара в чашке Петри. Дно чашки расчерчивают на 22 квадрата по числу фагов, затем капают фаги по одному в каждый квадрат. Посев инкубируют в термостате 18 часов\* при температуре 37°С. На 2-й день проводят учёт результатов; фаготип культуры соответствует тому фагу, который в тест-разведении вызывает её полный лизис. В зависимости от чувствительности культуры к фагу наблюдается разная степень лизиса:

+ + + + - сплошной лизис

+ + + - сливной лизис с вторичным ростом

+ + - более 50 негативных колоний (стерильных пятен)

+ - единичные негативные колонии (стерильные пятна)

- лизиса нет

Также проводится фаготипирование брюшнотифозных (44 типа) и паратифозных бактерий (15 типов), энтеропатогенныхэшерихий (24 типа).

**23)ПЦР**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод амплификации ДНК invitro, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс — комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Способы учета результатов ПЦР:

Качественная оценка (электрофоретический метод)

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно получить ответ "да" или "нет", как, например, при первичном выявлении инфекционных возбудителей, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкогенов и др. Обычным способом разделения продуктов ПЦР и идентификации специфического гена является электрофорез в агарозном или (реже) полиакриламидном геле. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты. Результат должен быть безусловно отрицательным в контроле без изучаемой ДНК и положительным - в пробе с ДНК, содержащей искомый участок гена. Положительный контроль может представлять собой целевую ДНК или участок гена, клонированный в плазмиде или амплифицированный с помощью ПЦР

Для учета результатов качественной ПЦР может быть использован и метод флуоресцентной детекции. Для этого по окончании ПЦР определяют наличие или отсутствие специфического сигнала с помощью специальныхфлуориметров (так называемый flash-метод). Поскольку здесь нет необходимости и в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия рабочих зон и реагентов для лаборатории.

Методы учета результатов ПЦР без применения электрофореза наиболее уместны и выгодны для многопрофильных лабораторий, где ПЦР-методы составляют лишь некоторую часть общего производственного процесса.

В таких крупных лабораториях часто определяется лишь ограниченный круг наиболее востребованных микроорганизмов. На российском рынке предлагается целый ряд flash-наборов для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, и ряда вирусных инфекций. Этот ассортимент патогенов вполне достаточен для многих больничных лабораторий, и они могут с начала своей деятельности сделать акцент на подобных методах анализа.

**Количественная оценка результатов ПЦР**

В ряде клинических ситуаций возникает вопрос о динамике патологического процесса и/или эффективности проводимой терапии. Эти вопросы наиболее актуальны при обследовании пациентов с хроническими инфекциями (гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека и др.). При диагностике исходят из того, что накопление продуктов ПЦР (ампликонов) пропорционально содержанию копий искомого гена в исследуемой пробе.

Естественно, учет результатов количественной ПЦР можно проводить и с помощью гель-электрофореза с анализом интенсивности специфических сигналов ПЦР. Обязательным условием правильной количественной оценки результатов ПЦР являются надежные положительные контрольные пробы с известным содержанием копий искомого гена (например, 1000 копий гена гепатита С на одну ПЦР-реакцию). Ряд последовательных разведений количественного контроля дает возможность построить калибровочные кривые, по которым можно оценивать содержание генокопий в клинических образцах .

Ключевым достижением в проведении количественной ПЦР стала разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь наряду с "обычными" праимерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени (так называемая геа1-timе-ПЦР), которая в 1993-1994 гг. была внедрена в.соответствующих приборах и диагностических системах (принцип ТаqМаn). Существует еще несколько методов конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР.

Методология ТаqМаn предусматривает синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих на концах две метки. Одна из них - флуоресцентная молекула, другая - молекула-гаситель этой флуоресценции. Таq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом флуоресцирующая метка выходит в свободное состояние, освобождаясь от влияния гасителя. Поэтому интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке (принцип геаl-timе-ПЦР). В результате после 20-40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Важная особенность проведения ПЦР флуоресцентным методом состоит в том, что пробирки с ПЦР-смесью не нужно открывать при учете результатов. Благодаря этому уменьшается вероятность загрязнения помещений продуктами амплификации и отпадает необходимость в выделении специальных рабочих зон для проведения электрофореза.

**24)этапы получения рекомбинантных молекул**

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением in vitro (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами.

В исследованиях по генной инженерии часто используют кишечную палочку Е. coli. Геном этой бактерии представлен одной хромосомой (молекулой ДНК), прикрепленной к мембране, и плазмидами, «плавающими» в цитозоле. Плазмида представляет собой кольцевую ДНК;

Для получения рекомбинантной ДНК плазмиды выделяют из Е. coli и удаляют из них часть кольцевой молекулы ДНК. Для этого применяют рестриктазы. Комплементарные цепи молекулы ДНК разрезаются в разных местах, в результате чего образуются «липкие» концы — неспаренные участки цепей, способные присоединять комплементарные им полинуклеотиды. На фрагменте ДНК, выбранном для пересадки, тоже создают «липкие» концы, используя ту же рестриктазу, и, следовательно, на фрагменте ДНК образуются «липкие» концы, комплементарные «липким» концам рестриктированной плазмиды. Если теперь смешать фрагмент ДНК (ген) и плазмиду, то они соединятся «липкими» концами. Затем с помощью фермента лигазы образуют фосфодиэфирную связь между концевыми нуклеотидами обеих молекул, и вновь получают кольцевую молекулу ДНК, но теперь она вместе с плазмидной ДНК содержит ген, выбранный для пересадки. Это и есть рекомбинантная ДНК, т. е. ДНК, содержащая новую комбинацию последовательностей (или генов).

**25)Метод бумажных дисков**

Биологическая активность антибиотиков выражается в международных единицах (ME). За единицу активности принимается то минимальное количество антибиотика, которое задерживает рост стандартного штамма, определенного вида микроорганизма в строго определенных условиях. Степень чувствительности к антибиотикам необходимом определять для успешного проведения лечения. Наиболее распространен метод «бумажных дисков»: в чашку Петри с МПА «газоном» засевают взвесь изучаемой культуры микроба. На засеянную поверхность агара пинцетом накладывают бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Диски располагают на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии от края чашки 15 мм. Чашки выдерживают в термостате 18-20 часов при температуре 37 °С. Учёт результатов проводят на 2-ой день путем измерения зон задержки роста. Диаметр зоны задержки роста:
Меньше 10 мм - штамм устойчивый
11-15 мм - штамм малоустойчивый
15-25 мм - штамм чувствительный
больше 25мм - штамм высокочувствительный.

**26)бактериологич. Диагностика дисбактериоза киш-ка.**

Наиболее прост качественный метод исследования. Он позволяет выявить качественные изменения облигатной (постоянной) и факультативной (привнесенной) микрофлоры кишечника. В основе его лежит определение процентного соотношения колоний микроорганизмов.

Методом, отвечающим требованиям клиники, является количественный метод с обязательным посевом на бифидобактерии. Он же позволяет выявить снижение или повышение содержания кишечной палочки, ее гемолитических (расщепляющих белки) или лактозонегативных колоний, количество стафилококка и энтерококка. В основе метода лежит подсчет указанных микроорганизмов на 1 г фекалий. Выявление бактерий типа протея в любом количестве есть проявление кишечного дисбактериоза.

Состояние анаэробной микрофлоры кишечника (бифидобактерии) осуществляется указанием минимального разведения, в котором она выявляется. Доказательством наличия дисбактериоза является отсутствие роста бифидобактерии в разведении 10/7, резкое снижение количества кишечной палочки (менее 1 млн) при среднем содержании 300-400 млн на средах Эндо и Левина и 800 млн - на кровяном агаре, появление расщепляющей белки кишечной палочки, лактозонегативных бактерий более 20 млн/г, расщепляющего белок стафилококка и протея, грибковых микроорганизмов типа кандида, а также в случаях, когда кокковая микрофлора кишечника составляет более 25 % от количества кишечной палочки.

**27)определение общего микробного числа воздуха по м. Коха и Короткова.**

Для определения микробного числа воздуха в помещениях применяют следующие методы:

1. *Седиментационный метод* основан на принципе осаждения(седиментации). Две чашки Петри с питательным агаром оставляют открытыми в течение 60 минут, после чего инкубируют при 370 С 1 сутки. Результаты оценивают по суммарному числу колоний, выросших в обеих чашках:

менее 250 колоний – воздухчистый,

250-500 –загрязненныйв средней степени,

500 – загрязненный.

1. А*спирационный метод–*аспирация определенного объема воздуха с высеванием содержащихся в нем бактерий на поверхность питательной среды с применением щелевого прибора Кротова.

Прибор Кротова устроен  [таким образом](http://chem21.info/info/461013), что воздух с [заданной скоростью](http://chem21.info/info/1715038) просасывается через [узкую щель](http://chem21.info/info/793996) пластины, закрывающей чашку Петри с [питательным агаром](http://chem21.info/info/1345160) при этом [частицы аэрозоля](http://chem21.info/info/72278) с содержащимися на них микроорганизмами равномерно фиксируются на [всей](http://chem21.info/info/1469882) его поверхности, поскольку чашка находится в [постоянном вращении](http://chem21.info/info/917414). После инкубирования отобранных проб при температуре 37 0С в течение 1-2 суток в зависимости от выделяемых микроорганизмов производится подсчет выросших колоний.

**28) определение фекального загрязнения воды по коли-индексу.**

**Коли-индекс** — количественные показатели фекального загрязнения воды, пищевых продуктов, почвы и других объектов окружающей среды, основанные на исследовании содержания в них кишечной палочки.

*Коли-индекс* — количество кишечных палочек, обнаруживаемое на 1 *л*жидкости. Для определения коли-индекса используют метод мембранных фильтров. Сущность метода мембранных фильтров заключается в фильтровании определенных объемов исследуемой жидкости (или твердого вещества, разведенного в воде) через мембранные фильтры №2 или №3, на которых задерживаются бактерии. Фильтры переносят на чашки со средой Эндо, инкубируемые при *t°*37°, а затем исследуют выросшие на поверхности фильтра темно-красные с металлическим блеском, розовые и прозрачные колонии. Из колоний каждого типа готовят мазки и окрашивают их по Граму. Колонии разных типов проверяют на оксидазную активность, которая должна быть отрицательной. Бесцветные и розовые колонии дополнительно засевают на полужидкую среду с глюкозой и индикатором, на которой в течение 24-часовой инкубации при *t°*37° должны образовываться кислота и газ. Для определения коли-индекса подсчитывают выросшие на фильтре колонии кишечной палочки и затем проводят перерасчет на 1 *л*.

**29)заражение эксперемент-х животных(биол.метод)-в\б**

Экспериментальное заражение лабораторных животных производится с целью:

- выделения из исследуемого материала чистой культуры возбудителя болезни,

- определения вида бактерий при диагностике болезни, т.е. идентификации;

- определения вирулентности;

- испытания на эффективность вакцин и лечебных сывороток.

Принцип метода:

А)Заражение-в/б

Б)оснащение: 1.исс.материал.(ЧК)

2. лаб.животное- белая мышь

3. инструменты.

Ход работы: 1. Приготовить взвесь исс.культуры

 2. набрать взвесь в шприц (2мл)

 3. зафиксировать животное в положении брюшком вверх, головой вниз под углом 45гр, диафрагма смещается к гр. Полости

 4.проколоть левую паховую обл. перпендикулярно и вводить под углом 45гр. 0,5-1мл. перед введением кожу обработать спиртом и йодом, после тоже самое.

 5. животное промаркировать.

**30) метод выявления ф. верулентности, адгезивности, капсулообр-я, аг-инг. Фагоцитоза**.

А)Вирулентность определяют путем [выявления факторов](http://chem21.info/info/207723)патогенности, заражения [экспериментальных животных](http://chem21.info/info/1354564), [культур ткани](http://chem21.info/info/509792) или на [экспериментальных моделях](http://chem21.info/info/330485).

В     [настоящее время](http://chem21.info/info/1707373) для [определения вирулентности](http://chem21.info/info/1894267) стараются не использовать [лабораторных животных](http://chem21.info/info/1741727) (в связи с высокой стоимостью исследования и по [этическим соображениям](http://chem21.info/info/1904743)). С этой целью [широко применяются](http://chem21.info/info/1658751) [другие методы определения](http://chem21.info/info/220585) вирулентности [заражение культур](http://chem21.info/info/1391819) тканей, [куриных эмбрионов](http://chem21.info/info/1375764), культур простейших.

Б)Тест на адгезины. В адгезии бактерий принимают участие различные компоненты оболочки. Это свойство выявля­ют по способности исследуемого микроорганизма сорбироваться на различных эукариотических клетках (эритроциты, энтероциты) или других частицах (латекс). Еще один метод обнаружения адгезинов связан с их использованием в качестве антигенов в се­рологических реакциях. У эшерихий адгезивные свойства часто определяют по их способности агглютинировать эритроциты.

В лунки планшетов вносят по 50 мкл 4%-й суспензии отмытых эритроцитов морской свинки, 1%-й раствор D-маннозы, суспен­зию исследуемых бактерий с концентрацией клеток 109/мл. Па­раллельно ставят реакцию в отсутствие маннозы. Результат учи­тывают через 30...60 мин. Положительная реакция — склеивание и оседание эритроцитов в виде «зонтика». Торможение агглюти­нации маннозой обозначают как маннозочувствительную ГА (гемагглютинация), отсутствие ингибирования — как маннозорезистентную ГА.

В)Метод выявления капсулообразования in vitro

Для изучения капсулообразования in vitro делают посевы нескольких капель исходной испытуемой взвеси в среду Государственного контрольного института медицинских биологических препаратов им. Тарасевича (ГКИ) и ставят в термостат при 37 °C.

Через 30 - 120 минут начинается капсулообразование in vitro. Следует считать, что через 16 - 18 часов все или абсолютное большинство B. anthracis, если таковые находятся в исследуемом материале, образуют на среде ГКИ капсулу.

Для наблюдения за капсулообразованием мазки из культур со среды ГКИ после подсыхания и фиксации в течение 15 минут метанолом окрашивают 5 - 10 минут синькой Леффлера и просматривают в микроскопе (х900). Микробы окрашиваются в синий цвет, а капсула - в розовый.

**31)методы выявления ф.патогенности(токсигенности,гемолизины)**

**Выявление токсинов микроорганизмов.** Обнаружение экзоток­синов лежит в основе лабораторной диагностики многих инфек­ционных заболеваний (ботулизма, энтеротоксемии овец и др.), а также микотоксикозов. В этих случаях материал, предположи­тельно содержащий токсин, вводят (скармливают, наносят на поверхность кожи) чувствительным биологическим моделям (ла­бораторные, сельскохозяйственные животные и др.) и по их ги­бели, заболеванию, изменениям в органах и тканях судят о нали­чии токсина.

Кроме того, обнаружение токсинов и определение их количе­ства необходимы для приготовления биопрепаратов. Например, иммунитет при ботулизме. Поэтому необ­ходимо точно определять количество токсина в культуральной жидкости. В этом случае устанавливают содержание токсина в 1 мл культуральной жидкости на чувствительных животных, рас­считывая LD50, например, по методу Кербера.

**Тест на гемолизин**. Бактериальные гемолизины — обширная группа веществ-мембранотоксинов, которые вызыва­ют нарушение целостности мембраны эритроцитов и их лизис.

Исследуемую культуру уколом или дробно засевают в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посевы инкубируют при 37 °С 24 ч. Гемолизин, выделяемый растущей культурой бактерий, диффундирует в толщу агара и вызывает лизис эритроцитов, что проявляется в виде светлой (бета-гемолиз) или полупрозрачной (альфа-гемолиз) зоны вокруг колоний. Гемолитическую актив­ность микроорганизма можно также определять его посевом в 1 ...5%-й кровяной бульон, который после культивирования вы­деляющего гемолизин микроба становится прозрачным за счет лизиса эритроцитов.

**32)методы выявления ф. верул-сти(ф.агрессии:лизоцима, гиалуронидаза, лецитоветиллазы)**

**Тест на гиалуронидазу**. Гиалуронидаза — фер­мент, расщепляющий гиалуроновую кислоту и, как следствие, деполимеризующий межклеточное вещество. Рассматривают как фактор инвазивности бактерий

На поверхность агара в чашке Петри дробно засевают культу­ру *P. multocida* или *S. equi*. Затем в виде линии высевают на поверхность среды культуру микроорганизма, у которого выявля­ют способность к синтезу гиалуронидазы. Чашки с посевами ин­кубируют при 37 °С 16...24 ч. Если исследуемый микроорганизм выделяет гиалуронидазу, то она диффундирует в толщу питательной среды и разрушает капсулу тест-микроба. При анализе посе­вов в косопроходящем пучке света колонии *S. equi (P. multocida*) вблизи «штриха» исследуемой культуры меньше по размеру, се­рого или голубого цвета в отличие от флуоресцирующих отдален­ных колоний.

**Тест на лецитиназу.** Лецитиназа расщепляет гидро­лизом лецитин. Готовят желточный агар: пептон — 20 г, гидро­фосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза—1 г, агар—12,5 г, вода дистиллиро­ванная — 500 мл. Устанавливают рН 7,2...7,4, стерилизуют при 121 °С 15 мин, охлаждают до 55 ºС, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь раз­ливают в чашки Петри.

Исследуемую культуру засевают дробно на желточный агар, культивируют при 37...38 °С 24...48 ч. Положительный резуль­тат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

**33)методы определения персистентных свойств бактерий**

Антилизоцимный фактор, направлен на инактивацию лизоцима и обеспечивает выживание возбудителя в макрофагах.

Антикомплементарный признак обеспечивает персистирование микробной клетки и характеризует способность инактивировать бактериальными клетками системы комплемента макроорганизма.

**34)РА на стекле**

Реакция агглютинации на предметном стекле используется для ускоренной постановки диагноза (идентификации аозбу-дитепя). Для этого на предметном стекле пастеровской пипеткой наносят каплю диагностической сыворотки и рядом на том же стекле помещают каплю физиологического раствора для контроля. Петлёй снимают небольшое количество исследуемого материала бактерий (можно брать бактерии из колоний на чашке, со скошенного агара) и вносят их в каплю сыворотки; размешивают до получения равномерной мути. Второй же комочек микробной массы размешивают в капле физиологического раствора. Через несколько минут при положительной реакции агглютинации в капле с сывороткой появляются хлопья, видимые на глаз на темном фоне, тогда как контрольная капля остаётся равномерно мутной. Мы работаем с брюшнотифозными сыворотками и соответствующими культурами.

Реакция широко применяется для серологической идентификации

выделенных микробов, а также при постановке ускоренных серологических

реакций.

Постановка реакции:

Пастеровской пипеткой наносят на предметное стекло каплю сыворотки в

нужных разведениях. В каждую каплю сыворотки вносят петлю 24-часовой

агаровой живой культуры или каплю диагностикума. Постановка реакции

должна сопровождаться контролем антигена и контролем сыворотки. Учет

реакции производят через 5-10 минут.

Компоненты:

1. Антигены неизвестного вида;

2. Известная иммунная сыворотка;

3. Физиологический раствор.

**35)РА Вейгля**

Вейгля реакция — макроскопическая реакция [агглютинации](http://www.medical-enc.ru/1/aggljutinacija.shtml), применявшаяся ранее для диагностики сыпного тифа. Обнаруживается на 4—6-й день заболевания и достигает максимума ко времени падения температуры, причем высота титров соответствует тяжести заболевания. К сыворотке больных добавляют [антиген](http://www.medical-enc.ru/1/antigen.shtml), выделенный из [риккетсий](http://www.medical-enc.ru/16/rickettsia.shtml) Провацека, культивированных в кишечнике зараженных вшей. Реакция Вейгля положительна при темном осадке на дне пробирки с прозрачной жидкостью над ним; при отрицательной реакции Вейгля жидкость остается мутной. В настоящее время реакция Вейгля не применяется.

**36) РА Райта**

Реакция агглютинации является одним из основных методов диагностики бруцеллеза у людей. Наибольшую диагностическую ценность реакция агглютинации представляет при острой и подострой форме бруцеллеза.

Техника постановки реакции.

В пробирки разливают физиологический раствор: в первую - 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. В первую пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки, перемешивают, переносят 0,5 мл в третью пробирку и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси выливают, в результате получают в каждой пробирке по 0,5 мл следующих разведений 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. Из первой пробирки 0,5 мл переносят в чистую пробирку и добавляют туда 0,5 мл физиологического раствора (контроль сыворотки в разведении 1:50), а 1,0 мл выливают.

Диагностикум разводят физиологическим раствором согласно прилагаемому к нему наставлению и добавляют по 0,5 мл во все пробирки, кроме контроля. После добавления диагностикума разведение сыворотки соответственно удваивается, т.е. получается 1:50, 1:100 и т.д. Сыворотки с антигеном смешивают путем встряхивания и помещают в термостат (37 °C ) на 18 - 20 часов. После инкубации пробирки выдерживают 1 - 2 часа при комнатнойтемпературе и проводят учет реакции.

Учет реакции проводят по стандарту мутности в зависимости от степени осаждения агглютината и просветления жидкости.

Для приготовления стандарта мутности антиген, применяемый для постановки РА, еще раз разводят в два раза.

Дальнейшее разведение антигена физиологическим раствором производят по схеме 1.

РАЗВЕДЕНИЕ АНТИГЕНА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ РАСТВОРОМ

|  |  |
| --- | --- |
|  | Степень агглютинации |
| ++++ | +++ | ++ | + |  |
| Антиген, разведенный 1:2 | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 |
| Физ. раствор | 1,0 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0 |
| % просветления | 100 | 75 | 50 | 25 | 0 |

Стандарт мутности готовят каждый раз при постановке РА и ставят в термостат одновременно с основной реакцией.

Титром сыворотки является максимальное ее разведение, дающее 50% агглютинации, - просветление, оцениваемое на 2+.

При применении стандартизированного диагностикума титры исследуемых сывороток соответствуют количеству международных единиц антител (ме/мл).

Так, титры 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. соответственно равны 50, 100, 200 и т.д. ме/мл.

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

- титр сыворотки 1:100 (100 ме/мл) - результат положительный;

- титр сыворотки 1:200 (200 ме/мл) - результат положительный;

- титр сыворотки 1:400 (400 ме/мл) - результат резко положительный.

Диагностическим титром принято считать реакцию агглютинации не менее 2+ при разведении сыворотки 1:100 и выше.

Недостатком реакции агглютинации признают также необходимость частых кровопусканий у животных, что создаёт почти непреодолимые трудности при реализации этого метода в крупных хозяйствах, в особенности У овец и свиней. У последних неудобство усугубляется тем, что изъятие крови производят из хвоста.

**37)РА Видаля**

Реакция агглютинации широко применяется в лабораторной практике для серодиагностики. Реакция агглютинации протекает в две фазы:

1 фаза - соединение антигена с антителом;

2 фаза - адсорбция на комплексе антиген+антителофизиологического

раствора и выпадение осадка двух видов:

а) крупнохлопчатого - у жгутиковых бактерий (Н-агглютинация);

б) мелкозернистого - агглютинат образуется в виде компактных зерен

(О-агглютинация).

Компоненты реакции Видаля:

1) испытуемая сыворотка в разведениях 1:100, 1:200, 1:400, 1:800,

1:1600;

2) диагностикумы - взвесь убитых сальмонелл трех видов: брюшного

тифа, паратифа А и В;

3) физиологический раствор.

Цель реакции: определение титра антител в испытуемой сыворотке.

Реакция агглютинации должна сопровождаться контролем антигена и сыворотки. Реакция ставится в трех рядах. Учет результатов проводят через 18-20 часов.

Степень положительной реакции агглютинации обозначается плюсами: + + + + полная агглютинация + + + неполная агглютинация + + слабая агглютинация - осадка нет (отрицательная реакция) б) реакция Вейгля

Ставится с 8 дня болезни при сыпном тифе и болезни Брилля-Цинссера для обнаружения антител в испытуемой сыворотке крови. Компоненты реакции Вейгля:

1) испытуемая сыворотка в разведениях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800;

2) риккетсиозныйдиагностикум - взвесь убитых риккетсий Провачека

3) физиологический раствор

Реакция применяется при рецидивах эпидемического сыпного тифа (болезни Брилля-Цинссера), обусловленных реактивацией риккетсий Провачека в сыпнотифозных гранулемах.

Специфические антитела (агглютинины) обнаруживаются в крови больного со 2-ой недели болезни. Для постановки реакции Видаля берут шприцем кровь из локтевой вены в количестве 2-3 мл и дают ей свернуться. Образовавшийся сгусток отделяют, а сыворотку отсасывают в чистую пробирку и готовят из неё 3 ряда разведений сыворотки больного от 1:100 до 1:800 следующим образом: во все пробирки разливают по 1 мл (20 капель) физиологического раствора; затем этой же пипеткой наливают 1 мл сыворотки, разведенной 1:50 в первую пробирку, перемешивают с физиологическим раствором, таким образом получают разведение 1:100, Из этой пробирки переносят 1 мл сыворотки в следующую пробирку, перемешивают с физиологическим раствором, получают разведение 1:200 также получают разведения 1:400 и 1:800 в каждом из трёх рядов. Реакция агглютинации Видзля ведётся в объеме 1 мл жидкости, поэтому из последней пробирки после смешения жидкости удаляют 1 мл. В отдельную контрольную пробирку наливают 1 мл физиологического раствора без сыворотки. Этот контроль ставится для проверки возможности спонтанной агглютинации антигена (диагностикума) а каждом ряду {контроль антигена). Во все пробирки каждого ряда, соответствующего надписям, закапывают по 2 капли диагностикума. Штатив ставят в термостат на 2 часа при 37 «С и затем на сутки оставляют при комнатной температуре. Учёт реакции производится на следующем занятии.

В сыворотках больных могут быть как специфические, так и групповые антитела, которые различаются по высоте титра. Специфическая реакция агглютинации идёт обычно до более высокого титра. Реакция считается положительной, если агглютинация произошла хотя бы в первой пробирке с разведением 1:200. Обычно она наступает в больших разведениях. Если наблюдается групповая агглютинация с двумя или тремя антигенами, то возбудителем болезни считают того микроба, с которым произошла агглютинация в наиболее высоком разведении сыворотки.

**Недостатки реакции:**

1. реакция положительна, начиная со 2-ой недели заболевания;

2. реакция положительна в 3-х случаях: у больных (инфекционная реакция), у переболевших (анамнестическая) и у вакцинированных (прививочная).

Для дифференциации реакций прибегают к повторной постановке ее через 5-6 дней. У больных отличается резкое нарастание титра антител При прививочной и анамнестической реакциях титр антител не изменится.

Реакцию Видаля можно поставить одновременно с Н- и О-антигенами бактерий брюшного тифа, что помогает дифференцировать инфекционную реакцию от прививочной, так как у привитых обнаруживаются только Н-антитела, О-агглютинин в высоком титре отмечается только в разгар болезни.

**38)РПГА(п/дифтирийный)**

Антитоксический противодифтерийный иммунитет проверяют с помощью РПГА с дифтерийным эритроцитарным диагностикумом (анатоксином).

Неимунными считаются лица с титром антитоксина менее 0,03 МЕ/мг

Ингредиенты:

1. Испытуемая сыворотка, адсорбированная бараньими эритроцитами;

2. Эритроцтарный диагностикум;

3. Физиологический раствор;

4. Противодифтерийная контрольная сыворотка активностью 10 ME.

Постановка реакции:

1) Сыворотку разводят физиологическим раствором в 12 лунках от

1:10 до 1:20480(1:40-1:5120)

2) В каждую лунку добавляют по 1 капле диагностикума;

3) Противодифтерийную контрольную сыворотку разводят также от

1:10 до 1:20480 и вносят по 1 капле диагностикума;

4) Оставляют на 3 часа при комнатной температуре.

**39)РПГА(п/скарлатинозный)**

**40)РА по Асколи**

Реакция Асколи ставится для диагностики сибирской язвы с целью обнаружения антигена сибиреязвенных бацилл. Для постановки реакции преципитации необходимо иметь: преципитиноген — гаптен B. Antrachis (экстракт из тканей), преципитин (преципитирующая сибиреязвенная сыворотка) и физиологический раствор.

Приготовление термопреципитиногена.
1. 8 колбочку, содержащую 1 г измельчённой кожи или 1 мл культуры В. ап1Ьгас!3, налить 10 мл физиологического раствора.
2. Колбу поместить в кипящую баню на 30-45 минут.
3. Просрильтровать через асбестнуюэату. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен.
Для реакции преципитации фильтрат разводится в 100 раз и более.

Постановка реакции кольцепреципитации.
1) В преципитэционную пробирку наливается 0,3 мл пре-ципитирующей сыворотки цельной или в разведении 1:5, 1:10.
2) По стенке пробирки осторожно наслаивается преципи-тиноген-
Реакция считается положительной, если на границе двух жидкостей образуется мутное кольцо выпадающего белка не позднее 5-15 минут.

При постановке реакции преципитации применяют следующие контроли:
а) антиген и физиологический раствор;
б) специфическая сыворотка и физ. раствор;
в) антиген и неспецифическая сыворотка.

Во всех контрольных пробирках помутнения не должно быть Для реакции преципитации пользуются специальными преципитационными пробирками высотой 40-60 мм и диаметром 4-5 мм, преципитация в узких пробирках наступает значительно скорее и проявляется более чётко, чем в обычных пробирках, их тщательно моют и высушивают, чтобы стекло их было совершенно прозрачным и сухим.

**41)РН токсина антитоксином по Оухтерлони**

Одна из разновидностей РП в геле (реакция Оухтерлони) позволяет определять токсигенность дифтерийной палочки с помощью антитоксической сыворотки. В чашку Петри с питательной средой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной антитоксической противодифтерийной сывороткой и засевают исследуемыми культурами в виде штрихов, перпендикулярных к полоске бумаги. Инкубируют при 37 ПС в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с антитоксином образуются линии преципитации.

Реакция преципитации в геле носит название иммунодиф-фузии. Часто форезом в геле — иммуноэлектрофорез. Принцип метода: исследуемый антиген фракционируют электрофорети-чески. полученные фракции анализируют методом двойной диффузии при помощи антисыворотки.

В чашку Петри с МПА накладывают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной антитоксической дифтерийной сывороткой. По обеим сторонам бумаги засевают изучаемые культуры в виде штрихов и бляшек. В каждой чашке делают контрольный посев штамма PV-8. Через 24-48 часов инкубации в термостате при наличии у культуры токсина, последний диффундирует в агар. На месте встречи токсина с антитоксином образуются белые линии преципитата.

**42)РСК Борде-Жангу**

Реакция ставится для диагностики хронической гонореи с целью обнаружения антител к гонококку.

В РСК участвуют 2 системы: основная система — испытуемая сыворотка, антиген, комплемент и вспомогательная, индикаторная или гемолитическая система — гемолитическая сыворотка и эритроциты барана.

Если в первой системе образуются специфический комплекс антиген + антитело, то комплемент адсорбируется (соединяется с этим комплексом) и гемолиза во второй системе не происходит.

Для реакции требуется:

1. Испытуемая сыворотка, которая получается из крови, взятой пункцией локтевой вены больного. После свёртывания крови сыворотка отсасывается в отдельную пробирку и инакти-вируется 30 минут при 56 °С на водяной бане.

2. Антиген — взвесь убитых гонококков.

3. Эритроциты барана получают из стерильно взятой де-фибринированной крови. Их отмывают, центрифугируя 3 раза с новыми порциями физиологического раствора. В реакции используют 3 %-ю взвесь эритроцитов.

4. Гемолитическая сыворотка готовится заранее путём иммунизации кроликов эритроцитами барана. Перед употреблением производится титрование сыворотки.

5. Комплемент — свежая сыворотка морской свинки. Из сердца морской свинки шприцем насасывается кровь, после свёртывания отделяется сыворотка. Перед опытом вытитровы-вается рабочая доза комплемента. Для этого берут основное разведение комплемента 1:10 и разливают его по пробиркам от 0.1 до 0,5, после чего объем в каждой пробирке доводят физиологическим раствором до 1,5 мл.

Одновременно заготавливают гемолитическую систему -разведенная в тройном титре, гемолитическая сыворотка + 3 % взвесь эритроцитов барана. Оба ингредиента в разных объемах и выдерживают в термостате 30 минут (сенсибилизация смеси), после чего смесь добавляют по 1 мл в пробирки и помещают в термостат на 30 минут. Контролем служат 2 пробирки:

1. 1 мл гемолитической системы + 1,5 мл физиологического раствора;

2. 0,5 мл комплемента 1:10 + 0,5 мл взвеси эритроцитов + 1,5 мл физиологического раствора.

Титром комплемента называется его минимальное количество, при котором ещё происходит гемолиз. Для постановки реакции берут рабочую дозу комплемента, увеличенную против титра на 20-25 %, т.е., обычно то количество комплемента, которое имеется в предпоследней пробирке с гемолизом. Увеличение дозы комплемента необходимо потому, что в реакции активность комплемента может оказаться несколько подавленной другими ингредиентами реакции (антиген, сыворотка).

**43)РСК Вассермана**

Ставится для диагностики сифилиса с целью обнаружения антител, а также для определения эффективности специфической терапии. Она основана на принципе реакции связывания комплемента Борде-Жангу. Существенным отличием реакции Вассермана является неспецифичность антигена: в качестве антигена употребляют липоидные экстракты из нормальных органов животных

Для постановки реакции Вассермана необходимо иметь сыворотку больного, диагностикумыперекрестнореагирующие антигены № 1, № 2, комплемент, гемолитическую сыворотку, эритроциты барана, физиологический раствор.

Диагностикум № 1 — специфический, трепонемный.

Диагностикум № 2 — неспецифический, кардиолипиновый антиген, которые представляют собой высокоочищенные экстракты бычьего сердца, имеющие постоянный химический состав липоидов. Липоиды, экстрагированные из сердца, по химическому составу близки к липоидам бледной трепонемы, поэтому, хотя и не являются специфическими, но фиксируют антитела против спирохеты.

Указанные антигены выпускаются централизованно и в реакцию употребляются разведёнными согласно титру, указанному на этикетке.

Одновременно с основным опытом ставят 2 контроля: с заведомо отрицательной и с заведомо положительной сыворотками.

Постановка основного опыта

Вначале в 4 пробирки разливается инактивированная и разведённая 1:5 испытуемая сыворотка. Затем в 2 пробирки разливаются антигены (№ 1, № 2), в 3-ю пробирку — физиологический раствор. После этого во все пробирки добавляется рабочая доза комплемента. После смешивания ингредиентов штатив с пробирками помещается в термостат при 37 °С на 30 минут. После выдерживания в термостате во все пробирки добавляется гемолитическая система. Пробирки снова помещают в термостат на 2 часа, в затем оставляют при комнатной температуре. На следующий день отмечают результат Степень интенсивности реакции оценивается, четыре плюса (++++), три (+++) два (++) и один (+) — в зависимости от интенсивности окраски жидкости и величины осадка эритроцитов на дне. Полный гемолиз обозначается (-) минусом. При резком расхождении результатов с различными антигенами опыт повторяют с новой порцией крови.

**44)РИТ-р. Иммобилизации бледной трепонемы.**

Эту реакцию применяют как в диагностических целях, так и для распознавания ложноположительных результатов стандартных серологических реакций, особенно при скрытом сифилисе.

РИБТ заключается в том, что в присутствии иммобилизинов сыворотки больных сифилиса и активного комплемента бледные трепонемы теряют подвижность.

РИБТ ставят в стерильных боксах. В реакции участвуют испытуемая сыворотка, комплемент и антиген.

В РИБТ антигеном является взвесь бледных трепонем из яичка кролика в ранние сроки (7-8 суток после заражения) сифилитического орхита. Специальная среда взвеси сохраняет жизнеспособность бледных трепонем не менее суток. В РИБТ применяют комплемент морских свинок. РИБТ протекает в анаэробных условиях. Пробирки с ингредиентами помещают в микроанаэростат, из которого отсасывается атмосферный воздух и нагнетается газовая смесь (95 частей азота и 5 частей углекислого газа). Микроанаэростат с пробирками помещают в термостат (35°С) на 18-20 часов.

Параллельно с постановкой реакции производят контрольные исследования с положительной и отрицательной сывороткой крови, взятыми из предыдущего опыта.

Оценку результатов РИБТ производят после извлечения пробирок из термостата (т.е. через 18-20 часов опыта). Пастеровской пипеткой на предметное стекло наносят каплю содержимого пробирки, которую накрывают покровным стеклом и исследуют в темном поле микроскопа (объектив 40, окуляр 10). При иммобилизации до 20% бледных трепонем реакцию считают отрицательной, от 21 до 30% — сомнительной, от 31 до 50% слабоположительной, от 51 до 100% — положительной. Процент иммобилизации бледных трепонем определяют по специальной таблице.

**45) Опсоно-фагоцитарная реакция**

Механизм: усиление фагоцитоза микробных клеток под влиянием содружественного воздействия антител, иммунной сыворотки и комплемента.

Компоненты реакции:

1) антиген - суточная микробная культура;

2) испытуемая сыворотка больного;

3) комплемент - свежая сыворотка морской свинки;

4) фагоциты - лейкоцитарная взвесь.

Опсонины - это антитела, которые содержатся в нормальных и иммунных сыворотках и подготавливают микробы к фагоцитозу.

Реакция ставится в специальных пробирках при t=37°» минут. Затем из каждой пробирки готовят мазки, считают по, 100 фагоцитов и определяют число фагоцитированныхмикрсконтроле.

Опсонический индекс = фагоцитарный показате. сыворотки/фагоцитарный показатель нормальной сывороп

Чем выше опсонический индекс (должен быть >1), исследуемая сыворотка, и, следовательно, тем выше им! бруцеллезе).

Применяется для олределения опсонинов — антител, стимулирующих фагоцитарную активность лейкоцитов, т.е. серодиагностики инфекций, например, бруцеллёза.

Усиление фагоцитоза происходит за счёт присоединения опсонинов с активными центрами (Рав-фрагмент) к детерминантам бактерий, а затем с помощью Рс-фрагментов к Рс-рецепторам фагоцитов. В нормальной сыворотке содержится небольшое количество опсонинов, которые проявляют свое действие в присутствии комплемента. В иммунной сыворотке опсонинов больше, и их активность в меньшей степени зависит от комплемента.

Компоненты:

- Исследуемая сыворотка

- Нормальная сыворотка

- Суточная микробная культура (напр., стафилококковая)

- Фагоциты — взвесь нейтрофилов

Инкубация при 37 °С в течение 30 минут. Из каждой пробирки готовят мазки, окрашивают по Романовскому-Гимзе и считают под микроскопом количество микробов, в 100 и более нейгрофилах, т.е. определяют фагоцитарный показатель.

Фагоцитарный показатель — количество микробов, поглощенных одним нейтрофилом.

Опсонический индекс фагоцитарный показатель иммунной (исследуемой) сыворотки / фагоцитарный показатель нормальной сыворотки.

Чем выше опсонический индекс (должен быть > 1), тем выше иммунитет.

Опсоно-фагоцитарный индекс — это цифровой показатель = количество фагоцитов х оценка фагоцитоза (в зависимости от количества поглощенных микробов). Максимальный показатель -75.

**46) РН на мышах с целью установления экзотоксина**

В основе этой реакции лежит способность специфической антитоксической сыворотки нейтрализовать экзотоксин.

Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их нейтрализацией.

Реакцию нейтрализации (РН) проводят путем введения смеси антиген—антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы). При отсутствии у животных и тест-объектов повреждающего действия микро­организмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о спе­цифичности взаимодействия комплекса антиген—антитело.

 Для проведения реакции исследуемый материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой, выдерживают в термостате и вводят животным (морским свин­кам, мышам). Контрольным животным вводят фильтрат исследу­емого материала, не обработанный сывороткой. В том случае, если произойдет нейтрализация экзотоксина антитоксической сыво­роткой, животные опытной группы останутся живыми. Контрольные животные погибнут в результате действия экзотоксина.

Реакция нейтрализации экзотоксина происходит при его взаимодействии с антитоксической сывороткой (антитела-антитоксины). В результате образовании комплекса антиген-антитело токсин теряет свои ядовитые свойства.

Реакцию нейтрализации проводят с целью обнаружения и титрования токсинов, анатоксинов или антитоксинов.

Токсины получают путем фильтрования жидкой питательной среды или исследуемого материала, где размножались токсигенные бактерии. При обработке формалином в течение 30-45 дней при температуре 37°С токсин превращается в анатоксин, который используют для иммунизации животных с целью получения антитоксической сыворотки.

Реакция нейтрализации invivo. Для определения типа токсина его смешивают с диагностической антитоксической сывороткой и эту смесь вводят белым мышам. При нейтрализации токсина антитоксической сывороткой мыши не погибают.

Реакцию нейтрализации используют для определения антитоксического иммунитета у детей при дифтерии (проба Шика) и скарлатине (проба Дика). Для этого в область предплечья внутрикожно вводят определенное количество соответствующего токсина (1/40 DLM). При наличии в организме антитоксинов произойдет нейтрализация токсина и реакция будет отрицательной. При отсутствии антитоксинов в организме возникает воспалительная реакция на месте введения токсина.

**47)РН(**[**Реакция Нейтрализации) на мышах с целью идентификации вируса клещевого энцефалита**](http://www.google.ru/search?ie=UTF-8&hl=ru&q=%D0%A0%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F%20%D0%9D%D0%B5%D0%B9%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8%20%D0%BD%D0%B0%20%D0%BC%D1%8B%D1%88%D0%B0%D1%85%20%D1%81%20%D1%86%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D1%8E%20%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8%20%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%B0%20%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%89%D0%B5%D0%B2%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D1%8D%D0%BD%D1%86%D0%B5%D1%84%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B0)

Вирус КЭ патогенен для ряда лабораторных и диких животных. Наибольшей чувствительностью обладают новорожденные и молодые белые мыши. После заражения в мозг, интраперитонеально, внутримышечно у этих животных развивается энцефалит, заканчивающийся гибелью животных. Из сельскохозяйственных животных наиболее восприимчивы к вирусу КЭ козы, менее восприимчивы овцы и коровы, и слабо восприимчивы лошади. Вирус КЭ обладает цитопатогенным действием (ЦПД), вызывая цитопатические изменения в первичных и перевиваемых культурах клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ и ПЭС) и размножается без выраженного ЦПД во многих других клеточных культурах. В мозге инфицированных мышей и культуральной жидкости зараженных культур происходит накопление вируса КЭ и специфических вирусных антигенов: комплементсвязывающих, гемагглютинирующих, преципитирующих и др.

Вирус КЭ длительное время сохраняется при низких температурах (оптимальный режим -60 град. С и ниже), хорошо переносит лиофилизацию, в высушенном состоянии сохраняется много лет, но быстро инактивируется при комнатной температуре. Кипячение убивает его через 2 минуты, а в горячем молоке при 60 град. С погибает через 20 минут.

Инактивирующим действием обладают также формалин, фенол, спирт и другие дезинфицирующие вещества, ультрафиолетовое излучение.

Реакция нейтрализации основана на способности специфических иммунных сывороток гасить инфекционное действие вирусов. Применяется в двух направлениях:

1) для типирования выделенных вирусов;

2) для титрования антител в сыворотках переболевших.

**Постановка реакции:**

1. На лабораторных животных. Критерием наличия вируса

служит гибель лабораторных животных. Высчитывается LD50

- предельное разведение вирусной суспензии, которое

вызывало гибель 50% зараженных животных. Для

идентификации вируса клещевого энцефалита проводят

внутримозговое заражение белых мышей.

2. В тканевых культурах. Учет результатов проводят

- по цитопатическому действию (ЦПД)

- по методу цветной пробы, основанной на изменении цвета

индикатора среды в результате дегенерации клеток;

- по гемадсорбции.

3. В Курином эмбрионе. Учет результатов проводится по

появлению оспин по хорионаллантоисной оболочке.

**48)РТГА**

Эта реакция применяется в вирусологической практике:

- для определения типа вируса (на стекле);

- для обнаружения в сыворотке больных (развернутая).

При постановке ориентировочной реакции торможения гемагглютинации на стекло наносят по 1 капле типоспецифических иммунных сывороток, затем добавляют по 1 капле испытуемого материала и 1 капле 5% взвеси эритроцитов.

Учет результатов: тип вируса определяют по той сыворотке, с которой реакция не произошла, так как иммунная сыворотка, специфическая для выделенного вируса, подавляет его гемагглютинирующую активность, и эритроциты не агглютинируются.

**49)РИФ**

В качестве метки используются светящиеся флюорохром-ные красители (изотиоционатфлюорисцеина и др.).

Существуют различные модификации РИФ. Для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний — для выявления микробов или их антигенов в исследуемом материале применяется РИФ по Кунсу.

Выделяют два метода РИФ по Кунсу: прямой и непрямой.

Компоненты прямой РИФ:

1) исследуемый материал (испражнение, отделяемое носоглоткой и др.);

2) меченая специфическая иммунная сыворотка, содержащая АТ-ла к искомому антигену;

3) изотонический раствор хлорида натрия.

Мазок из исследуемого материала обрабатывают меченойантисывороткой.

Происходит реакция АГ-АТ. При люминесцентном микроскопическом исследовании в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ, обнаруживают флюоресценцию — свечение.

Компоненты непрямой РИФ:

1) исследуемый материал;

2) специфическая антисыворотка;

3) антиглобулиновая сыворотка (АТ-ла против иммуноглобулина), меченая флюорихромом;

4) Изотонический раствор хлорида натрия.

Мазок из исследуемого материала сначала обрабатывают иммунной сывороткой к искомому антигену, а затем — меченой антиглобулиновой сывороткой.

Светящиеся комплексы АГ-АТ — меченые АТ обнаруживаются при помощи люминесцентного микроскопа.

Преимущество непрямого метода состоит в том, что нет необходимости приготовления широкого набора флюоресцирующих специфических сывороток, а применяется лишь одна флюоресцирующая антиглобулиновая сыворотка.

Также выделяют 4-компонентную разновидность непрямой РИФ, когда дополнительно вводится комплемент (сыворотка морской свинки). При положительной реакции образуется комплекс АГ-АТ — меченые — АТ-комплемент.

Реакция относится к серологическим реакциям с участием меченых антигенов или антител.

Проводится прямым и непрямым методами.

При прямом методе обнаруживают антиген в материале от больного. Используется диагностическая флюоресцирующая сыворотка, которая содержит иммуноглобулины, выделенные из иммунных сывороток и меченные флюорохромами.

Специфический антиген обнаруживается в виде ярко-зеленых люминесцирующих конгломератов, а фон препарата окрашивается в оранжево-красный цвет.

Компоненты реакции прямой иммунофлюоресценции:

Для поиска антигена при экспресс-диагностике:

1) исследуемый материал;

2) специфическая люминесцентная сыворотка;

3) люминесцентный микроскоп.

При диагностике гриппа проводят дифференциацию от возбудителей парагриппа и аденовирусной инфекции. Носоглоточный мазок обрабатывают флюоресцирующей гриппозной сывороткой или гриппозным иммуноглобулином.

«+» результат в виде зеленого свечения получают через 3 часа.

При непрямом методе проводят обнаружение и титрование специфических антител. Титром сыворотки называется ее максимальное разведение, при котором отмечается флюоресценция на «+ +».

Компоненты реакции непрямой иммунофлюоресценции

Для поиска антигена при экспресс-диагностике:

1) исследуемый материал (антиген);

2) специфическая сыворотка;

3) антиглобулиновая люминесцентная сыворотка

4) люминесцентный микроскоп.

/ фаза специфическая

Сывороточные антитела адсорбируются на антигене.

// фаза неспецифическая

Используется антиглобулиновая сыворотка с антителами, меченными флюорохромами. Образуется комплекс антиген+антитело (I) + антиглобулиновая сыворотка (II), который светится.

**50)ИФА(конкурентный способ)-опр-ие АГ гепатита В**

Конкурентный тип.

Назначение.

Предназначена для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (НВз Ад) в сыворотках и плазме крови при диагностике вирусного гепатита В и определения носительства НВ5 Ад.

Компоненты:

1) исследуемый материал сыворотка или плазма крови;

2) антитела к НВз Ад, адсорбированные на поверхности лунки полистироловогомикропланшета;

3) коньюгат — мышиные моноклониальные антитела к НВз Ад, меченые пероксидазой,

4) ортофенилендиамин (ОФД) -субстрат;

5) фосфатно-солевой буфер;

6) контрольные сыворотки:

— положительная (сыворотка с НВе Ад);

— отрицательная (сыворотка без НВз Ад). Ход работы

1) Внесение контрольных и исследуемых сывороток.

2) Инкубация 1 час при 37 «С.

3) Отмывание лунок.

4) Внесение конъюгата.

5) Инкубация 1 час при 37 «С.

6) Отмывание лунок.

7) Внесение ОФД. При наличии НВз Ад раствор а лунках желтеет.

Учёт ИФА проводят по оптической плотности с помощью фотометра. Степень оптической плотности будет обратно пропорциональной концентрации исследуемых НВз Ад.

Механизм

Реакция протекает в три фазы:

1) НВз Ад исследуемой сыворотки (плазмы) связывается с гомологичными АТ, адсорбированными на поверхности лунки. Образуется ИК АГ-АТ. (НВз Ад — агл\ НВз АТ).

2) Антитела НВз Ад, меченые пероксидазой, связываются с оставшимися свободными детерминантами НВз Ад комплекса АГ-АТ. Образуется комплекс АТ-АГ-меченые АТ {ап!1 НВз АТ-НВз Ад-ап(1 НВз АТ, меченые пероксидазой).

3) ОФД взаимодействуют (с пероксидазой) комплекса АТ-АГ-АТ и происходит жёлтое окрашивание.

Непрямой тип

Является основной тестовой реакцией диагностики ВИЧ-инфекции.

Цель: серологическая диагностика ВИЧ-инфекции — обнаружение антител к антигенам ВИЧ, Компоненты:

1) исследуемый материал — сыворотка крови;

2) синтетические пептиды, имитирующие 2-х антигенов ВИЧ: др 120 и др 41, адсорбированные на поверхности полистироловой лунки;

3) антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой, полученная путём иммунизации кроликов глобулинами человека (АТкАТ-м);

4) ОФД;

5) фосфатно-солевой буфер;

6) контрольные сыворотки:

- положительная;

- отрицательная.

Ход работы

1) Внесение контрольных и исследуемых сывороток. 2} Инкубация 30 минут при 37 «С.

3) Отмывание.

4) Внесение антиглобулиновой сыворотки, меченой ферментом.

5) Инкубация 30 минут при 37 «С.

6) Отмывание.

7) Внесение ОФД. Механизм

Реакция протекает в 3 фазы:

1) Антитела к ВИЧ исследуемой сыворотки связываются с гомологичными антигенами (др 120 и др 41), и на поверхности сорбента образуется ИК АГ-АТ {АТ к ВИЧ — АГ ВИЧ).

2) Образование ИК АГ-АТ-АТ, меченое пероксидазой, т.к. АТ исследуемой сыворотки являются антигенами для антиглобулиновой сыворотки.

3) ОФД взаимодействует с пероксидазой комплекса АГ-АТ-АТ, и происходит жёлтое окрашивание раствора лунки. Степень ферментативной активности прямо пропорциональна концентрации исследуемых АТ.

**51)ИФА(непрямой способ)-д. СПИДа**

При ИФА в качестве метки применяют ферменты.

Непрямой тип
Является основной тестовой реакцией диагностики ВИЧ-инфекции.
Цель: серологическая диагностика ВИЧ-инфекции — обнаружение антител к антигенам ВИЧ, Компоненты:
1) исследуемый материал — сыворотка крови;
2) синтетические пептиды, имитирующие 2-х антигенов ВИЧ: др 120 и др 41, адсорбированные на поверхности полистироловой лунки;
3) антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой, полученная путём иммунизации кроликов глобулинами человека (АТкАТ-м);
4) ОФД;
5) фосфатно-солевой буфер;
6) контрольные сыворотки:
- положительная;
- отрицательная.
Ход работы
1) Внесение контрольных и исследуемых сывороток. 2} Инкубация 30 минут при 37 «С.
3) Отмывание.
4) Внесение антиглобулиновой сыворотки, меченой ферментом.
5) Инкубация 30 минут при 37 «С.
6) Отмывание.
7) Внесение ОФД. Механизм

Реакция протекает в 3 фазы:
1) Антитела к ВИЧ исследуемой сыворотки связываются с гомологичными антигенами (др 120 и др 41), и на поверхности сорбента образуется ИК АГ-АТ {АТ к ВИЧ — АГ ВИЧ).
2) Образование ИК АГ-АТ-АТ, меченое пероксидазой, т.к. АТ исследуемой сыворотки являются антигенами для антиглобулиновой сыворотки.
3) ОФД взаимодействует с пероксидазой комплекса АГ-АТ-АТ, и происходит жёлтое окрашивание раствора лунки. Степень ферментативной активности прямо пропорциональна концентрации исследуемых АТ.

**52)Серологическая диагностика Вич,с помощью реакции иммуноблотинга**

Разработана на основе ИФА. Является самым специфичным и чувствительным методом иммунохимического анализа. Иммуноблотинг (от англ Ыо\* — промокать, пягно) сочетает ИФА с электрофорезом. Применяется для выявления спектра антител к антигенным смесям Относится к экспертным (подтверждающим) реакциям диагностики ВИЧ-инфекции.

Принцип метода на примере выявления антител к ВИЧ Реакция проводится в несколько этапов:
1) Антигены, экстрагированные из исследуемого объекта — ВИЧ (белки-р гликопротеины-др), подвергаются электрофорезу в полиакриламидном геле — разделению антигенов на фракции по молекулярной массе.
2) Гель покрывают нитроцеллюлозной мембраной, и на неё при помощи электрофореза переносятся фракции антигена.
Нитроцеллюлоза ведёт себя подобно промокательной бумаге Мембрану разрезают на полоски (стрипы).
3) Стрип с нанесёнными на него антигенами ВИЧ погружают в сыворотку обследуемого и затем отмывают от несвязавшегося материала.
4) Сгрипы инкубируют антиглобулиновой сывороткой, меченой пероксидазой, отмывают.
5) Добавляют субстрат и отмечают число окрашенных фракций (пятен), которые соответствуют зоне локализации комплекса АГ-АТ.