

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
ЦЕНТР РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ТАШКЕНТСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ.**

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник Главного
управления науки и учебных
заведений МЗ РУз,
профессор Ш. Э. Атаханов

2011 г «_____» _____

№ _____ протокол

«СОГЛАСОВАНО»
Директор Центра развития
медицинского образования,
МЗ РУз,
М.С.Юсупова

2011г «_____» _____

№ _____ протокол

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСОБО ОПАСНОЙ
КАРАНТИННОЙ ИНФЕКЦИИ ХОЛЕРЫ.**
Учебно–методическое руководство для студентов 2-3 курса медицинских
ВУЗов

Ташкент – 2011г

Составители:

1. Мирзаева М.А. – ТошПМИ, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, доктор медицинских наук.

2. Тургунова Х.З. – ТошПМИ, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, кандидат медицинских наук.

3. Каримова З.К. – ТошПМИ, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, кандидат медицинских наук.

Рецензенты:

1. Исхакова Х.И. Тошкентский институт усовершенствования врачей, профессор, зав. кафедрой микробиологии, доктор медицинских наук.

2. Умаров Т.У. Ташкентский Педиатрический Медицинский институт, доцент кафедры детской инфекции, кандидат медицинских наук.

«Микробиологическая диагностика особо опасной карантинной инфекции холеры»-учебно–методическое руководство для студентов 2-3 курса медицинских ВУЗов

Методическое руководство обсуждено на МУК ТошПМИ.

2011 г «20» апрель № 8 протокол

Методическое руководство утверждено на Научном совете ТопшПМИ.

2011 г «27» апрель № _____ протокол

Секретар научного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Шамонсурова Э.О.

Гербовая печать высшего учебного заведения

Цель работы: Ознакомить студентов с возбудителями особо опасных заболеваний. Студентам важно знать для установления диагноза, правила забора крови, остатков пищи, испражнений, также бактериологические, бактериоскопические, серологические методы исследования при ООКИ. Кроме того, большое значение имеет дифференциальная диагностика ООКИ с другими ОКИ. Имеет большое значение постановка правильного диагноза, правильного лечения и профилактика данного заболевания.

Аннотация.

Одним из представителей ООКИ является возбудитель «Холеры». Это заболевание отличается от других кишечных инфекций своим клиническим течением, эпидемиологическими особенностями.

Холера антропонозное заболевание, источником являются больные, носители вириона и носители атипичных, бессимптомных типов холеры. Наличие пептонов в тонкой кишке способствует размножению вирионов. После этого вибрионы прикрепляются к микроворсинкам эпителиальных клеток кишечника и размножаются, выделяя большое количество экзотоксинов (энтеротоксинов). Этот токсин активирует фермент аденилатциклазу который находится в эпителиальных клетках кишечника.

Следовательно, усиливается синтез 3,5 аденозин монофосфата. Под действием аденозин монофосфата в слизистой оболочке кишечника выделяется большое количество изотонического раствора. Большое количество воды не успевает рассосаться в толстой кишке и это приводит к диарее.

Нарушение функции кровообращения, сердечно-сосудистой и нервной системы приводит к летальному исходу. Большое значение имеет постановка правильного диагноза, правильное лечение в целях предотвращения осложнений заболеваний.

Мы надеемся что данное пособие поможет студентам медицинских институтов. Авторы будут признательны читателям за указанные недостатки.

План занятий:

1. Таксономия, классификация возбудителей холеры который входит в ООКИ.
2. Морфология, среды для посевов, также методы поставки диагноза при ООКИ.
3. Микробиологическая диагностика ООКИ.
4. Меры профилактики ООКИ.

Изучение темы:

Изучение морфологии и общей характеристики возбудителей ООКИ. Создать схему микробиологической диагностики холеры.

Микробиологическая диагностика особо опасной карантинной инфекции холеры.

В русском языке слово «холера» иногда используется для обозначения человека, который возникает внезапно, как чертик из табакерки и начинает всем мешать. После изучения клинической картины этого достаточно неприятного заболевания, становится понятным с каким именно основным симптомом холеры ассоциируется такой человек.

Холера (cholera)- острая, вызванная холерными вибрионами антропонозная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи

возбудителей, протекающая с развитием дегидратации и деминерализации в результате водянистой диареи и рвоты.

Ввиду способности к пандемическому распространению холера относится к группе болезней, предусмотренных международными медико-санитарными правилами.

Из-за способности в короткое время поражать значительное количество людей и 50-процентной летальности в нелеченных случаях может рассматриваться в качестве биологического оружия.

Исторические сведения. Холера известна с древнейших времён. До 1817г холера была эндемической болезнью для стран Юго-Восточной Азии (в районах Ганги и Брахмопутры). С 1817г по 1926 наблюдался выход холеры за пределы эндемических очагов с развитием 6 пандемий, сопровождающихся опустошительными эпидемиями болезни почти на всех континентах. Крупные эпидемии холеры с высокой летальностью наблюдались в XIXв на многих территориях Росси (Астрахань, центральные районы Росси и др.). В этот период флорентийский исследователь Ф.Пачини (1853-1856), Э.Недзвецкий в России (1872-1874) и Р.Кох в Египте (1883-1885) описали возбудителя холеры-классического холерного вибриона и обосновали водный путь распространения инфекции. В 1906г. Ф.Готшлихт на карантинной станции Эль-Тор выделил еще один биовар вибрионов-вибрион Эль-Тор, признанный ВОЗ в 1962г возбудителем холеры. В этот же период были разработаны Международные Конвенции и правила по борьбе с распространением холеры.

На протяжении с 1960 по 1962г холера вновь наблюдалась преимущественно в эндемических районах Юго-Восточной Азии.

С 1961 г развилась седьмая пандемия холеры, начавшаяся на о.Сулавеси (Индонезия). Особенности этой пандемии холеры явились: смена возбудителя (вибрион Эль-Тор), относительно доброкачественное течение болезни с большой частотой вибрионосительства, быстрое распространение по всем континентам, значительная продолжительность периода повышенной заболеваемости. В настоящее время заболевания холерой регистрируются более чем в 40 странах мира, преимущественно в зонах с теплым климатом. Спорадические случаи болезни наблюдаются и в настоящее время.

Морфология. *Vibrio cholerae* относится к семейству Vibrionaceae, роду *Vibrio*. Вид *Vibrio cholerae* подразделяется на 4 биовара: Cholerae, Eltor, Proteus и Albensis.

Vibrio cholerae биовар Cholerae и биовар Eltor являются возбудителями холеры у человека; *Vibrio cholerae* биовар proteus вызывает у птиц понос, у людей-гастроэнтерит; *Vibrio cholerae* биовар albensis обнаружен в свежей воде, в испражнениях и желчи человека.



рисунок 1

рисунок 2

Холерные вибрионы имеют вид небольших $1,5-3 \times 0,2-0,6$ мкм, изогнутых палочек с полярно расположенным жгутиком (рисунок 2), обеспечивающим высокую подвижность возбудителей. Спор и капсул не образуют, грам-отрицательны, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями (рисунок 1).

Холерные вибрионы подвержены изменчивости. На искусственных средах и в старых культурах они могут принимать форму зерен, шаров, колбовидных образований, палочек, нитей, спиралей, образовывать L- формы; при пересеве на свежие среды вибрионы возвращаются к своим исходным формам.

Жгутики имеют толщину 25нм, клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана трехслойная. Между стенкой и цитоплазматической мембраной имеются мелкие вакуоли. Содержание Г+Ц в ДНК нуклеоида 45-49%.

Культивирование. Холерные вибрионы - облигатные аэробы- хорошо культивируются в присутствии натрия хлорида на простых и щелочных

питательных средах. Оптимум роста 18-37°C, крайние границы 14-42°C. Хорошо развиваются на средах с рН 7,2-8,6. на плотных средах образуют прозрачные, с голубоватым оттенком выпуклые дисковидные колонии с ровными краями. На щелочном бульоне и пептонной воде через 6ч роста появляется пленка, состоящая из холерных вибрионов.

Ферментативные свойства. Холерные вибрионы разжижают свернутую сыворотку, желатин, образуют индол, аммиак, ферментируют с образованием кислоты глюкозу, левулезу, галактозу, мальтозу, сахарозу, маннозу, манит, крахмал, медленно- глицерин; не ферментируют в первые 48ч лактозы и арабинозы; молоко свертывают постоянно; обладают лизинорнитин-декарбоксилазной и оксидазной активностью(таблица №1). По способности ферментировать маннозу, арабинозу и сахарозу Б.Хейберг разделил вибрионы на хемовары; холерные вибрионы биовар Cholerae и

биовар Eltor относятся к I хемовару.

Таблица№1

Тесты		Vibrio cholerae	Vibrio cholerae eltor	Серовар 139 (Бенгал)	НАГ вибрионы
Ферментация углеводов	лактоза	-	-	-	-
	глюкоза	+	+	±	±
	сахароза	+	+	-	-
	манноза	+	+	-	-
	арабиноза	-	-	±	±
	сорбит	-	-	±	±
Протеолитический свойства	Разжижения желатина	+	+	±	±
	Восстанавливает нитраты в нитриты	+	+	±	±
	свертывают молоко	+	+	±	±

Токсинообразование. У холерного вибриона обнаружен ряд токсичных субстанций: термостабильный липопротеиновый комплекс, связанный с

клеточной мембраной, имеющей свойство эндотоксина и обладающий иммуногенным действием; термолабильный экзотоксин (энтеротоксин, или холероген), состоящий из 2-х пептидных фрагментов, определяющий возникновение основных проявлений холеры- деминерализации и дегидратации, и так называемый фактор проницаемости, включающий нейроминидазу, взаимодействующую с GMJ- ганглиозидами энтероцитов; липазу, протеазы и другие ферменты.

Антигенная структура. Холерные вибрионы имеют термостабильные O антигены (соматические) и термолабильные H-антигены (жгутиковые). O-антиген обладает видовой и типовой специфичностью, H-антиген является неспецифическим, общим для всего рода *Vibrio*. Вибрионы разделяют на O-подгруппы, которых насчитывается более 40. Холерные вибрионы биовары Cholerae и Eltor принадлежат к O-1 подгруппе. Внутри O-1 подгруппы различают три O-антигена- A, B, C, по комбинации которых выявлены 3 серовара- Огава (AB), Инаба (AC) и Гикошима (ABC).

Резистентность. Холерные вибрионы длительно сохраняются при низких температурах; в испражнениях выживают до 5мес, в почве- 2мес, в устрицах, крабах, креветках, на поверхности рыб и в их кишечнике- от 1 до 40сут., в воде- несколько суток. Холерный вибрион Эль-Тор обладает большой устойчивостью. Он сохраняется свыше 4нед в морской и речной воде, 1-10сут на продуктах, 4-5сут в кишечнике мух. При благоприятных условиях холерные вибрионы Эль-Тор могут размножаться в различных водоемах, в иле.

Холерные вибрионы малоустойчивы к действию солнечного света, высушиванию. При 100°C они погибают мгновенно, при 80°C в течение 5мин. Они весьма чувствительны к дезинфицирующим веществам, особенно к кислотам. Холерные вибрионы очень чувствительны к действию желудочного сока. Холерные вибрионы чувствительны к тетрациклиновым производным, к ампициллину, левомицетину.

Для того, чтобы заболеть холерой, необходимо проглотить от миллиона до триллиона микроорганизмов. Такой большой разброс объясняется крайней неустойчивостью возбудителя к соляной кислоте. Если кислотность понижена (при атрофическом гастрите) или соляная кислота значительно разведена (при употреблении большого количества жидкости), количество вибрионов, необходимое для инфицирования, снижается в 100тыс раз.

Патогенез для животных. В естественных условиях животные холерой не болеют. Внутрибрюшное введение культуры кроликам и морским свинкам

сопровождается у них общим токсикозом, перитонитом, который приводит к их гибели.

Внутривенное введение вибрионов кроликам и собакам обуславливает у них смертельную интоксикацию.

Патогенез заболевания у человека. Холерные вибрионы передаются от больных и носителей через пищу, воду, мух и грязные руки. Микробы проникают через рот в тонкий кишечник. Кислое содержимое желудка обычно является неблагоприятной средой для холерных вибрионов. Благодаря наличию щелочной среды и обилия продуктов белкового распада, в кишечнике создаются благоприятные условия для размножения холерных вибрионов (рисунок 3). Вырабатываемый ими энтеротоксин (холероген) активизирует фермент аденилациклазу в эпителиальных клетках тонкого кишечника, повышает продукцию аденозилмонофосфата, который приводит к изменению механизма проницаемости эпителиальных клеток, что и обуславливает развитие профузного поноса.

Инкубационный период от нескольких часов до 6 дней.

В развитии болезни различают 3 периода:

- 1) холерный энтерит (холерный понос или диарея) продолжительностью 1-2сут.
- 2) холерный гастроэнтерит, при котором обильный понос и многократная рвота приводят к обезвоживанию организма больных, что влечет за собой снижение температуры, уменьшение диуреза, резкое уменьшение минеральных и белковых веществ в крови, появление судорог; испражнения напоминают рисовый отвар.
- 3) холерный алгид (рисунок 4), проявляющийся тяжелыми симптомами: тургор кожи снижен, она собирается в складки (рисунок 7), появляется цианоз, голос становится охриплым, иногда наблюдается полная афония; температура тела снижается до $35,5-34^{\circ}\text{C}$, развивается резкое ослабление сердечной деятельности вследствие повышения вязкости крови, задержки мочеиспускания. В ряде случаев развивается холерная кома, приводящая к прострации и смерти.



рисунок 3

рисунок 4

В типичных случаях болезнь развивается остро, часто внезапно: ночью или утром больные ощущают императивные позывы на дефекацию без тенезмов и болей в животе. Часто отмечается дискомфорт, ощущение урчания и переливания жидкости в животе. Стул обычно обильный; испражнения вначале имеют каловый характер с частицами непереваренной пищи, затем становятся жидкими, водянистыми, желтого цвета с плавающими хлопьями, в дальнейшем светлеют, обретая вид рисового отвара, без запаха или с запахом рыбы. Число дефекаций может быть от 3 до 16 в сутки. У больного снижается аппетит, быстро появляется жажда и мышечная слабость. Температура тела обычно остается нормальной, или субфебрильной. Учащение пульса, сухость языка. Живот втянут, безболезнен, определяется урчание и переливание жидкости по ходу тонкой кишки. При благоприятном течении болезни диарея продолжается от нескольких часов до 1-2сут.

Потеря жидкости не превышает 1-3% массы тела-**1 степень дегидратации**. **Дегидратация II степени** (4-6%) - характеризуется незначительным уменьшением объема циркулирующей плазмы и тканевой жидкости. При **дегидратации III степени** (7-9%) отмечается существенное уменьшение объема циркулирующей плазмы, снижение пульсового давления, некоторое уменьшение почечного кровотока, умеренное расстройство периферического кровообращения, сопровождающиеся проходящими метаболическими сдвигами.

Дегидратация IV степени- потеря жидкости в объеме 10% массы тела и более- характеризуется уменьшением объема циркулирующей плазмы, венозного возврата и систолического объема, с увеличением гематокрита и резким нарушением периферической гемодинамики, тканевой гипоксией, декомпенсированным метаболическим ацидозом и респираторным алкалозом. Наблюдается выраженная гипотония, практически полное прекращение клубочковой фильтрации, азотемия, мышечные фибрилляции.

Патоморфологические изменения в органах и тканях различны в зависимости от клинической формы холеры. У умерших в стадии холерного

алгида, вследствие резкого обезвоживания и деминерализации отмечается характерное «лицо Гиппократа» с запавшими глазами и заострившимися чертами, землистым цветом кожи, иногда принимающей синюшный оттенок (рисунок 4,5). Судорожное сокращение мышц конечностей напоминает «позу бойца или боксера», морщинистость и синюшность кожи, особенно пальцев рук- «руки прачки»(рисунок 6), выступающая кровь имеет дегтеобразную консистенцию, напоминает «смородиновое желе».



рисунок 5



рисунок 6

В случаях прогрессирующего течения болезни потери жидкости достигают 10% массы тела и более, развивается декомпенсированный дегидратационный шок. В тяжелых случаях холеры, шок может развиваться в течение первых 12ч болезни. Состояние больных неуклонно ухудшается: обильная диарея и многократная рвота, наблюдается выраженный диффузный цианоз, нередко кончик носа, ушные раковины, губы приобретают фиолетовую или почти черную окраску. Черты лица ещё больше заостряются, появляется синюшность вокруг глаз (симптом «темных очков»), глазные яблоки западают, повернуты кверху- симптом «заходящего солнца». На лице больного выражены страдание, мольба о прощении- *facies cholerae*. Голос беззвучный, сознание длительное время сохранено. $t^{\circ} 35-34^{\circ}C$, кожные покровы холодные на ощупь, легко собираются в складки и длительное время не расправляются- «холерная складка». Выражена тахикардия, тоны сердца почти не слышны, АД не определяется. Продолжительность от нескольких часов до нескольких суток. Может наступить кома и асфиксия. Летальность достигает 60%.

Сухая холера, протекает без поноса и рвоты, характеризуется острым началом, быстрым развитием дегидратационного шока, резким падением АД, учащением дыхания, афонией, анурией, судорогами всех групп мышц, менингеальными и энцефалитическими симптомами. Смерть наступает в течение нескольких часов. Эта форма встречается очень редко у ослабленных больных.

Иммунитет. После болезни у человека вырабатывается выраженный иммунитет, который сохраняется длительное время, поэтому случаи пов-торных заболеваний холерой крайне редки. Опыты на добровольцах показали, что в течение 3 лет (срок наблюдения) у людей, переболевших. Холерой рецидив не наблюдалось.



рисунок 7



рисунок 8

Лабораторная диагностика. Для исследования берут испражнения, рвотные массы, органы трупа, воду, предметы, пищевые продукты(9,10,11-рисунок).



9-рисунок



10-рисунок



11-рисунок

Метод массового исследования на вибрионосительство. Материал берется непосредственно из кишечника при помощи стеклянной трубочки диаметром 0,5 см (для детей), 1,5 см (для взрослых) и длиной 15 см с оплавленными концами (при отсутствии трубочек используют ватные тампоны на деревянных палочках). Трубочку немедленно погружают во флакон, содержащий 100 - 200 мл 1% пептонной воды и агглютинирующую холерную O сыворотку в разведении до половины ее титра. В один и тот же флакон берут материал от 10 лиц. Флаконы помещают в термостат при 37°C. Через 3-4 часа холерные вибрионы начинают агглютинироваться и постепенно (в течение ближайших 2 часов) падают в виде хлопьев на дно флакона. Исследуя под микроскопом окрашенные мазки и «висячую каплю», обнаруживают склеившихся и частично свободных вибрионов. Через 6 часов дается ответ и в случае обнаружения холерных вибрионов немедленно производится посев индивидуально от каждого из 10 лиц. Такой метод дает возможность исследовать до 16 000 человек за 3 - 4 дня(11-рисунок).

Метод иммунодиагностической микропленки. Изучение антигенных свойств холерных вибрионов проводят путем постановки пробирочной или пластинчатой реакции агглютинации с использованием сухих лиофилизированных диагностических агглютинирующих холерных O-сывороток и сывороток Огава и Инаба. Сыворотку разводят в физиологическом растворе или дистиллированной воде и смешивают при постановке агглютинации на стекле с исследуемой культурой вибрионов. При подготовке сыворотки используется дополнительная посуда, что усложняет работу бактериолога, а в оставшейся разведенной сыворотке быстро прорастает бактериальная микрофлора и инактивирует ее.

Для изучения антигенной структуры холерных вибрионов был разработан иммунодиагностический препарат в виде микропленок разового применения, который обладал достаточной специфичностью, демонстративностью и экономичностью. Иммунодиагностические холерные микропленки (ИХМП) в виде полимерной пленки с нанесенными высушенными каплями, фиксированными на бумаге, содержат минимальное количество сыворотки, пленкообразующий компонент и консервант. Пленкообразующий компонент связывает, склеивает и фиксирует микроколичества ингредиентов к поверхности носителя, исключает крошение микропленок; консервант - 14 - предохраняет препарат от разрушения при длительном хранении.

Концентрация диагностической сыворотки в ИХМП является достаточной, поскольку после эмульгирования в капле физраствора, антитела содержатся в

титре 1:100, что полностью обеспечивает ход реакции. Тем самым обеспечивается достаточная концентрация антител, снижается расход диагностической сыворотки и исключается возможность ее неиспользования. При этом создаются условия для быстрого растворения ИХМП, контакта ее с холерными вибрионами и проведения реакции непосредственно на полимерной пленке.

Готовые ИХМП хранят в темном сухом месте при 4— 7°С в картонных коробках (срок годности 3 года — срок наблюдения) и по мере надобности ИХМП используют для определения холерных вибрионов. Для исключения случайного заражения окружающих предметов ИХМП помещают в чистую чашку Петри. На поверхность ИХМП наносят каплю физиологического раствора, в которой

Таблица 1. Бактериологическая диагностика холеры

Кал, рвота, желч, патологоанатомический материал, вода и другие

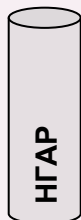
Бактериоскопическая метод

Приготовления мазки, окрашивания по Грамму и с фуксином, увидеть подвижность

Бактериоскопия



Реакция имобилизации



Проба с С IV фагом

С Эль-Тор фагом

Чувствительность к антибиотикам

Биохимические свойства

Приготовление холерного и Эль-Торного биовара

Ускоренные методы:

- бактериоскопия (грам отрицательные палочки)
- иммунофлюоресценция (АТ)
- По мазку «раздавленная капля» (подвижность)
- ПГАР (с эритроцитарным диогностикумом)

Бактериологический

Щелочной агар

TCBS-агар

Специальная среда

Бактериоскопия и РА

РА с O1 и O139

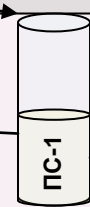
РА

Огава

Инаба

Оксидаза +

РГА



растворяют ее. Разведенную сыворотку смешивают с изучаемой культурой вибрионов, снятой бактериологической петлей с питательной среды. При другом варианте постановки реакции ИХМП снимают скальпелем с бумажной подложки и переносят на предметное стекло, растворяют в капле физиологического раствора и смешивают с изучаемой культурой вибрионов.

При положительной реакции через 1—3 мин появляются зерна агглютината, окрашенные в зеленый цвет, а капля просветляется. При отрицательной реакции капля остается гомогенно-мутной.

Использованную часть полимерной пленки отрезают, а оставшуюся часть пленки с ИХМП сохраняют в той же чашке Петри для дальнейших исследований. Использование ИХМП в исследованиях вибрионов и других микроорганизмов позволяет получить статистически достоверные результаты, сэкономить дорогостоящие диагностические сыворотки, повысить качество и эффективность исследований.

Таблица №2

РА с сыворотки крови О1	+	+	–	–
РА с сыворотки крови Огава и Инаба	+	+	–	–
Лизис С фагом: Лизис с фагом С (IV фаг)	+	–	–	–
Лизис с фагом Эль-Тор	–	+	–	–
Реакция Фогес-Проскауэр	–	+	±	±
Аггл. с эритроцитами кур	–	+	±	±
Гемоллиз с эритроцитами баран	–	+	±	±

Чувствительность к полимиксину	+	–	–	–
Тест гексамином	–	+	±	±

Реакция агглютинации микрометодом. В последнее время в бактериологической практике нашел довольно широкое применение микрообъемный метод постановки серологических реакций с использованием специальных планшеток и микротитровальных игл (таблица №2). Реакции агглютинации микрометодом ставят с холерными агглютинирующими референс-сыворотками в полистроловых микротитровальных планшетках с плоским или V-образным дном, предназначенных для иммунологических реакций, используются микротитровальные планшетки с объемом лунок 0,4 мл или в пробирках параллельно. Предварительно планшетки тщательно промывают проточной водой, каждую лунку прополаскивали дистиллированной водой и хорошо просушивали, затем делали надписи простым карандашом.

Во все лунки четырех рядов пипеткой-капельницей из микротитратора Такачи вносят 0,85% раствор хлористого натрия (рН 7,2) в объеме 0,05 мл, затем в первую лунку каждого ряда-того же объема соответствующей сыворотки в разведении 1:25 и проводят ее титрацию микротитровальной иглой с головкой (объем 0,05 мл), удаляя из последней лунки по 0,05 мл.

После титрации сывороток во все лунки, кроме их контролей, вносят 0,05 мл взвеси исследуемой агаровой культуры. Эту манипуляцию проводят на подносе.

По окончании титрации планшет накрывают крышкой и ставят на подносе в термостат при 37° С. После 2 - часовой экспозиции проводят окончательный учет реакции под стереомикроскопом (МБС-1, МБС-2) в косопадающем свете. При учете реакции крышку с планшетки не снимают, в случае ее запотевания заменяют другой.

После учета реакции планшетку и крышку складывают в кювет и заливают 5% хлорамином так, чтобы все лунки планшетки были заполнены дезраствором.

Исследования показали, что все холерные вибрионы классического и эльтор биоваров агглютинируются холерной видовой 0-сывороткой в микрообъемах.

Что касается агглютинабельности типоспецифическими сыворотками, то прослеживается следующая закономерность: при постановке с сывороткой Инаба в микрометоде агглютинировались 100, а в пробирках - 90% штаммов классического холерного вибриона серовара Инаба. Холерные вибрионы биовара эльтор серовара Инаба агглютинировались в планшетках и пробирках соответственно в 95 и 96% случаев. У холерных вибрионов классического и эльтор биоваров серовара Огава соотношения в обеих методиках были практически те же.

Интересен факт, что при постановке реакции агглютинации с КО-сывороткой наибольшее число штаммов, агглютинирующихся НО-сывороткой до титра, было выявлено в микрометоде; в пробирках агглютинация установлена у одного штамма.

Все штаммы вибрионов 040 - 056 сероваров в микрометоде не агглютинировались холерными агглютинирующими сыворотками, а в пробирках штамм II 258-1099 (040 серовара) агглютинировался всеми холерными сыворотками.

Большинство изученных штаммов представителей семейства Enterobacteraceae также не агглютинировалось холерными агглютинирующими сыворотками, за исключением *Sh. flexneri* 2503, у которого в пробирках была выявлена агглютинация со всеми сыворотками, и штамма *S. typhimurium* 21, у которого отмечена неспецифическая реакция агглютинации со всеми сыворотками как в пробирках, так и в планшетках.

При пользовании этим методом расход агглютинирующих сывороток уменьшается в 10 раз, значительно сокращается время, необходимое для постановки реакции, и ускоряется срок выдачи ответа. Кроме того, описанный метод менее трудоемок. Таким образом, стандартность, достоверность полученных результатов, высокая экономичность метода позволяют рекомендовать его при идентификации холерных вибрионов, изучении штаммов и популяции штаммов холерных вибрионов по признаку агглютинабельности.

А также:

Иммобилизация вибрионов холерными сыворотками и типовыми холерными фагами. Капли испражнений или материала с поверхности

пептонной воды обрабатывают холерной О-сывороткой, типовыми сыворотками Огава и Инаба или типовыми холерными фагами. Готовят из них препараты «раздавленная капля», которые исследуют с помощью темнопольной и фазово-контрастной микроскопии. В положительном случае через 3-5 минут движение вибрионов прекращается.

РИФ. Препараты из исследуемого материала обрабатывают флюоресцирующей противохолерной сывороткой и исследуют в люминесцентном микроскопе. Положительным результатом считается обнаружение в препарате даже единичных вибрионов с ярким желто-зеленым свечением в виде блестящего ободка по периферии клетки. Положительный результат можно получить через 1-2 часа после начала исследования при концентрации вибрионов не менее 10^6 клеток в 1 мл., поэтому рекомендуется предварительно подраживание материала на питательных средах.

Профилактика.

1. Проведение общих противоэпидемических мероприятий.
2. Санитарная охрана территории от заноса холеры (12-рисунок).

В очаге:

1. Обнаружение первых случаев холеры, тщательный учет больных и немедленное информирование вышестоящих органов здравоохранения.
2. Обязательная госпитализация, обследование и лечение, обсервация и лабораторное обследование контактных лиц в течение 5 дней.
3. Текущая и заключительная дезинфекция в отделении для больных холерой и в очаге.
4. Эпидемиологическое обследование в очаге.
5. Санитарно-гигиенические мероприятия и санитарно-просветительная.
6. Строгое соблюдение правил личной гигиены, кипячение или тщательное хлорирование воды, обеззараживание посуды.
7. Специфическая профилактика: иммунизация холерной моновакциной, содержащей 8 млрд микробных тел в 1 мл, или холерным анатоксином. Ревакцинация может быть осуществлена не ранее чем через 3 мес после первичной ревакцинации.

Вопросы и ответы для закрепления темы:

Вопрос №1. Морфология возбудителя холеры?

Ответ. Холерные вибрионы имеют форму изогнутой палочки длиной 1,5-3,0 мкм, толщиной 0,3 мкм. Очень подвижны, обычно монотрихи, не образуют спор и капсул, грамотрицательны. На искусственных средах и в старых культурах они могут принимать форму зерен, шаров, колбовидных образований, палочек, нитей, спиралей, образовывать L-формы: при пересеве на свежие среды вибрионы возвращаются к своим исходным формам.

Вопрос №2. Кто и когда открыл возбудителя холеры?

Ответ. Возбудителями холеры являются биовар классического холерного вибриона, описанного впервые в 1854г Пачини и подробно исследованного Р.Кохом в 1883г и биовар холерного Эль-Тор, выделенного из трупа паломника на Синайском полуострове Ф.Готшлихтом в 1906г.

Вопрос №3. Пути передачи холеры?

Ответ. Холерные вибрионы передаются от больных и носителей через пищу, воду, мух и грязные руки. Микробы проникают через рот.

Вопрос №4. Резистентность холеры?

Ответ. Холерные вибрионы длительно сохраняются при низких температурах; в испражнениях выживают до 5мес, в почве- 2мес, в устрицах, крабах, креветках, на поверхности рыб и в их кишечнике- от 1 до 40сут., в воде- несколько суток. Холерный вибрион Эль-Тор обладает большой устойчивостью. Он сохраняется свыше 4недел в морской и речной воде, 1-10 сут, на продуктах, 4-5 сут в кишечнике мух.

Холерные вибрионы малоустойчивы к действию солнечного света, высушиванию. При 100°C они погибают мгновенно, при 80°C в течение 5мин. Они весьма чувствительны к дезинфицирующим веществам, особенно к кислотам.

Вопрос №5. Токсинообразование.

Ответ. Холерные вибрионы продуцируют экзотоксин (холероген) обладающий энтеротоксическим действием и играющий важную роль в патогенезе холеры: сильное токсическое действие оказывает и эндотоксин.

Вопрос №6. Иммунитет после холеры?

Ответ. У лиц, перенесших холеру, развивается прочный антиинфекционный иммунитет, который связан с наличием в крови антитоксинов, лизинов, агглютининов и нормальных физиологических ингибиторов. В естественном физиологическом механизме защиты большую роль играет нормальная функция желудка, содержимое которых является бактерицидным в отношении холерного вибриона. В эпидемических районах возможно реинфекции холеры.

Вопрос №7. Какой материал берется от больных для лабораторной диагностики холеры?

Ответ. Для исследования используют испражнения, рвотные массы, промывные воды, кровь, мочу, органы трупа, остатки пищи.

Вопрос №8. Лабораторная диагностика холеры.

- Ответ.**
1. Микроскопический метод
 2. Бактериологический метод
 3. Серологический (РПТ) метод
 4. Иммунизация
 5. Иммунофлюоресцентный метод.

Сценарий занятий с применением новых педагогических технологий.

Раздел: Частная микробиология

Тема: Микробиологическая диагностика ООКИ холера.

Организационная форма обучения.

Метод №1. По схеме «Цветок лотоса»—предназначен для выяснения исходного уровня знаний студента. Схема «Цветка лотоса» состоит из 9ти кругов: один основной круг в центре, а вокруг него 8 остальных, напоминающих лепестки. Основная задача в раскрытии темы вписывается в центральный круг. В оставшиеся 8 кругов вписываются идеи, раскрывающие основную задачу. Далее в процессе раскрытия темы каждая идея, вписанная в «лепестки», аналогично рассматривается, как центр схемы.

В обсуждении основной задачи «цветка лотоса» участвуют все студенты группы. Для обсуждения идей, вписанных в лепестки, основная группа делится на 8 подгрупп, и высказывают своё мнение. Каждая подгруппа должна доказать значительность и приоритетность своей идеи. В обсуждении участвуют все студенты.

Схема «Цветок лотоса»

Саблюдовать чистоту окруж.сред.	Не бросать в воду мусор	кан-оную сис-му чинит
Лаб.диагностика питевой воды	Экология окруж.сред.	Хлоризация воду
Пить кипяченную воду	дезинфекция	дезинсекция

Источник больной человек	Алиментарным путём через воду	Из за обезвоживания падает давления
Инкубационный период от несколько часов до 6 дней	Клиническая картина	Диффузная панос и рвота
Энтеритная форма	Гастроэнтеритная форма	Алгидная форма

Выявить больного и	Госпитализиров	Объявить
--------------------	----------------	----------

Личная гигиена	Убитой холерной вакцина	Вакцинация с анатоксином холеры
Охранят от загрязнения воды	Профилактика	Химическая бивалентная вак-на
Контроль пищевые помещение	дезинсекция (против мух)	Подозрева. Контакт. 3 дня тетрациклин

Экология окруж.сред.	Профилактика	Открытие водоём
Клиническая картина	Заболевания холера	Лабораторная диагностика
Эпидемиология	иммунитет	Лечения

После	Образуются	Образуются
-------	------------	------------

Артизианский воды	Проточный вода	Отстоянная вода
Колодский воды	Открытие водоём	Грязный, болотный вода
Водоканальный воды	Салённый морская воды	Канализационный воды

Проба из воды	Приготовит нативный мазок	Култивирование на питателном среде
Проводит серологическая диагностика	Лаб-ная. диагностика	Выделения чистой культуры
Оприделить токсигенность	Оприделить б/х свойства	Приготовит мазок и окрашивать по Грамму

По антибиотико-	Антиби-	Плазма,кров,
-----------------	---------	--------------

взять на учет	ать больного, бакт-ерионосителя	карантин	заболевание остаются стойкий иммунитет	антитоксин, лизин	IgA, агглютинин, опсонины	грамме	отико терапия	кровенной препа-раты
Здрав.храни. учрежден. оповещать	Эпидемиология	Сотрудникам СЭСа оповещать	Желуд. сок вырабатывает сч в норме	иммунитет	бактерионосителя м становится в течение 3-4 неделя	Пить биопрепараты, жидкости.	Лечения	Диета
Изолировать	Наблюдать контактирующим	Вести профилактический работы на источнике	Фагоцитарный активность макрофагов	Против микроба резистентный	Против токсина резистентный	Цифлокс, таривид, триметопримсульфаметоксазол	Пол синтетик тетрациклин, левомицетин через венау, рот	Na, K растворы

Метод № 2. Кот в мешке проводится в конце занятия для оценки итоговой подготовки и возможности применения теоретических знаний по практике. Преподаватель предлагает своей группе заранее заготовленные карточки с вариантами заданий. Студенты наугад берут карточки. Ответы выполняют письменно в течении 10-15 минут. Затем все работы сдают и проводят общий разбор правильных и неправильных ответов с их оценкой.

Примеры заданий:

1. Морфология возбудителя холеры.
2. Токсинообразование
3. Лабораторная диагностика холеры

Эталон ответа:

1. Холерные вибрионы имеют форму изогнутой палочки длиной 1,5-3,0 мкм, толщиной 0,3 мкм. Очень подвижны, обычно монотрихи, не образуют спор и капсул, грамотрицательные. На искусственных средах и в старых культурах они могут принимать форму зерен, шаров, колбовидных образований, палочек, нитей, спиралей, образовывать L-формы. При пересеве на свежие среды вибрионы возвращаются к своим исходным формам.
2. Холерные вибрионы продуцируют экзотоксин (холероген) обладающий энтеротоксическим действием и играющий важную роль в патогенезе холеры: Сильное токсическое действие оказывает и эндотоксин.
3. Микроскопический метод
Бактериологический метод

Серологический (РПТ) метод

Иммунизация

Имунофлюоресцентный метод.

Лабораторная диагностика холеры.

Литература:

1. «Микробиология», К.Д.Пяткин, Ю. С. Кривошеи, М.Медицина, 1980г.
2. «Микробиология», В.Д.Тимаков, В.С.Левашев, Л.Б.Борисов, М. Медицина, 1983 г.

3. «Медицинская микробиология в графах», С.А.Павлович, Минск, «Высшая школа», 1986 г.
4. «Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии», Л.Б.Борисов, М. Медицина, 1984 г.
5. «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология», Л.Б.Борисов, А.М.Смирнова, М. Медицина, 1994 г.
6. «Микробиология, вирусология и иммунология», И.Мухамедов, Э.Эшбоев, Н.Зокиров, М.Зокиров Ташкент, 2002 й.
7. «Эпидемиология» Ш.К.Усманов, Ташкент 1980 й.